

# 桑叶多糖提取及抑菌实验研究

王世宽<sup>a</sup>, 张代芳<sup>b</sup>, 陈欲云<sup>b</sup>

(四川理工学院 a. 生物工程学院; b. 化学工程学院, 四川 自贡 643000)

**摘要:**以超声波辅助水提醇沉法提取桑叶多糖,采用正交实验法优化桑叶多糖的提取工艺;采用滤纸片法进行抑菌试验评价桑叶多糖体外抑菌作用。实验考察提取时间、液固比、提取温度等因素对桑叶多糖提取率的影响,观察桑叶醇提物和桑叶多糖对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌抑制作用。实验结果证明:超声波提取时间 50 min,液固比 40:1(mL·g<sup>-1</sup>),提取温度为 70 ℃,其桑叶浸提液中的多糖得率率达到 5.50%,体外抑菌实验结果显示桑叶醇提物对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌有明显的抑制作用,桑叶多糖对这两种菌则没有抑制作用。

**关键词:**桑叶;多糖;水提醇沉;抑菌作用

**中图分类号:**Q814

**文献标志码:**A

## 引言

桑叶是桑科植物桑的叶,栽培或野生,完整叶片呈宽卵形,叶片基部心脏形,顶端微尖,边缘有锯齿,叶脉密生白柔毛。气淡,味微苦涩。中国多数地区多有生产<sup>[1]</sup>,特别是长江中下游及四川盆地。

桑叶不仅是蚕的“粮食”,在医学方面也有很大的用途,桑叶最早记载于《神农本草经》,具有祛风清热、凉血明目、补益之功效<sup>[2]</sup>。由于桑叶含有丰富的蛋白质、钙、铁、锌及维生素,并且还含有丰富的人体所需的必须氨基酸以及其他生物活性成分,所以很多学者已经在积极研究药食两用的桑叶<sup>[3]</sup>。

桑叶中含有丰富的活性物质,如黄酮及黄酮苷类、生物碱类、植物甾醇类、多糖类等<sup>[4]</sup>。生物碱是桑叶的主要活性成份<sup>[5]</sup>。桑叶中的桑叶多糖很丰富,具有显著的降血糖、降血脂、调节免疫、抗氧化和抗病毒等多种药理活性<sup>[6-7]</sup>。

我国桑叶资源丰富,但是目前桑叶利用只限于养蚕和加工叶类药材,用途单一。所以桑叶资源的利用与开

发势在必行。相关文献对桑叶多糖提取工艺的报道并不多见,本文通过正交实验法优化桑叶多糖的提取工艺。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

桑叶购自药房。其他药品均为分析纯。

### 1.2 仪器

恒温鼓风干燥箱(上海琅玕实验设备有限公司),SPX-150B-Z 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司),FA1004 电子天平(上海精科天平),250HL 恒温恒湿培养箱(金坛市医疗仪器厂),MP5002 电子天平(上海恒平科学仪器有限公司),UV1000 紫外可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 测定桑叶多糖含量和提取得率的方法

利用苯酚-硫酸法测定多糖含量<sup>[8-9]</sup>。10 mL 容量瓶中放入样品溶液 0.5 mL,通过加水稀释定容,吸取

收稿日期:2016-09-10

基金项目:酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(NJ2014-11)

作者简介:王世宽(1964-),男,重庆人,教授,硕士,主要从事食品科学与工程方面的研究,(E-mail)selgsuse@163.com

1 mL置于比色管中,加入 1.0 mL 6% 苯酚及 5.0 mL 98% 浓硫酸,摇匀冷却,室温放置 20 min,于 490 nm 测光密度,以 2.0 mL 水按相同显色操作为空白。根据多糖回归曲线方程求得浓度。

多糖得率(%) = (多糖浓度 × 提取液体积 × 100) / 样品质量

## 2.2 葡萄糖标准曲线的制作

采用苯酚-硫酸法。准确称取葡萄糖 0.020 g 于 500 mL 容量瓶中,加水至刻度,分别吸取 1.8 mL、1.6 mL、1.4 mL、1.2 mL、1.0 mL、0.8 mL、0.6 mL 及 0.4 mL,各以蒸馏水补至 2.0 mL,然后加入 1.0 mL 6% 苯酚及 5.0 mL 98% 浓硫酸,摇匀冷却,室温放置 20 min,于 490 nm 测光密度,以 2.0 mL 水按相同显色操作为空白,横坐标为多糖微克数,纵坐标为光密度值,绘制标准曲线,线性回归得到葡萄糖浓度与吸光度值的回归方程。

## 2.3 桑叶样品的处理

将购买的干桑叶粉碎,过 80 目筛。称取干桑叶粉末 10 g 于脂肪抽提器,加入石油醚 100 mL,90 °C 回流提取直至石油醚流为无色为止。

## 2.4 超声波辅助水提醇沉法单因素试验提取多糖

10 g 桑叶粉末脱脂后,抽滤去石油醚,滤渣置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 160 mL 80% 乙醇,80 °C 回流提取 1.5 h,减压抽滤取沉淀物。超声波功率控制在 280 W,将沉淀物置于烧杯中,分别加入一定量的蒸馏水,在一定温度和一定时间条件下超声波提取,4000 rpm 离心 10 min,减压抽滤,吸取滤液测定样品吸光度,然后计算多糖含量。最后通过设计单因素试验考查超声波提取时间、液固比、提取温度对多糖提取的影响。

### 2.4.1 超声波提取时间对多糖得率的影响

10 g 桑叶粉末脱脂后,抽滤去石油醚,滤渣置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 160 mL 80% 乙醇,80 °C 回流提取 1.5 h,减压抽滤取沉淀物。在液固比 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>) 和提取温度 60 °C 的条件下,选择超声波提取时间分别为 30 min、40 min、50 min、60 min 进行提取,考查提取时间对多糖得率的影响。

### 2.4.2 液固比对多糖得率的影响

10 g 桑叶粉末脱脂后,抽滤去石油醚,滤渣置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 160 mL 80% 乙醇,80 °C 回流提取 1.5 h,减压抽滤取沉淀物。在超声波提取时间 50 min 和提取温度 60 °C 的条件下,选择液固比 20:1、30:1、40:1、50:1 (mL·g<sup>-1</sup>) 进行提取,考查液固比对多糖得率的影响。

### 2.4.3 提取温度对多糖得率的影响

10 g 桑叶粉末脱脂后,抽滤去石油醚,滤渣置于 250 mL 圆底烧瓶中,加入 160 mL 80% 乙醇,80 °C 回流提取 1.5 h,减压抽滤取沉淀物。在液固比 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>) 和超声波提取时间 50 min 的条件下,选择温度 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 进行提取,考查温度对多糖得率的影响。

## 2.5 采用正交实验优化桑叶多糖的提取工艺

根据单因素实验结果,选取超声波提取时间(A)、液固比(B)、提取温度(C)做三因素三水平实验,具体正交实验设计见表 1。

表 1 正交实验因素与水平设计表

水平	A 提取时间 /min	B 液固比 /(mL·g <sup>-1</sup> )	C 提取温度 /°C
1	40	30:1	50
2	50	40:1	60
3	60	50:1	70

## 2.6 桑叶多糖体外抑菌实验

### 2.6.1 桑叶醇提物与桑叶多糖的准备

将干桑叶粉碎,过 80 目筛。称取 10 g,按照 30:1 的液固比加入 70% 乙醇,70 °C 水浴回流提取 4 h。4000 rpm 离心 10 min,取上清液,旋转蒸发后定容至 10 mL,得桑叶醇提物备用。

桑叶多糖提取液浓缩至 200 mL,加入粉末活性炭,于 60 °C 保温 30 min,抽滤,取清液,在清液中加入无水乙醇使乙醇浓度达到 80%,静止 12 h 后进行过滤,将滤渣放入恒温鼓风干燥箱中干燥,60 °C 烘干至恒重,得精制多糖<sup>[10]</sup>。配制浓度为 0.5%、1.0%、1.5%、2.5%、3.0% 多糖溶液。在 105 °C 下的高压蒸汽灭菌锅中灭菌 8~10 min,备用。

### 2.6.2 桑叶醇提物与桑叶多糖抑菌作用的比较

将枯草芽孢杆菌、大肠杆菌菌种用适宜的斜面培养基进行活化,用无菌生理盐水稀释制成菌悬液。选择吸水性强的滤纸用打孔器打成直径为 6 mm 的圆形滤纸片,灭菌,取一滤纸片在无菌的桑叶醇提取液中浸泡 1 h 后取出,挥干溶剂;另取滤纸片在无菌的桑叶多糖溶液中浸泡 24 h,于 37 °C 烘干备用。

无菌操作,吸取 0.1 mL 的菌液涂布做成含菌平板,平行三组,在培养基表面相应位置放上含有桑叶醇提物的滤纸片,每皿三片,三份样品;同法,含桑叶多糖的滤纸片,每皿四片,三份样品,一份用无菌生理盐水做对照。恒温培养(37 °C, 24 h),取出后测定抑菌圈直径,比较抑菌效果。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 葡萄糖标准曲线的绘制

按照 2.2 葡萄糖标准曲线的制作方法,以吸光度值为纵坐标,葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线,如图 1 所示。用最小二乘法进行线性拟合,标准曲线回归方程为  $Y = 0.0152x + 0.0004$ ,相关系数为  $R^2 = 0.9992$ 。

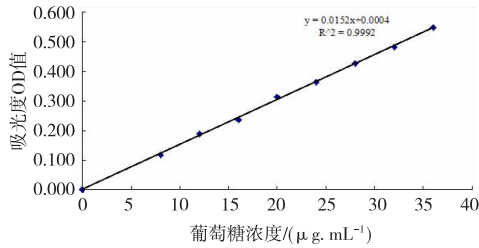


图 1 葡萄糖标准曲线

#### 3.2 超声波辅助水提醇沉法单因素实验结果

##### 3.2.1 超声波提取时间对多糖得率的影响

在提取温度为 60 °C 和液固比为 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>) 的条件下,提取时间对多糖得率的影响如图 2 所示。由图 2 可知,桑叶多糖得率受温度的影响较大,随着时间增加,桑叶多糖得率先升高再下降,在 50 min 时多糖得率最高。提取时间 50 min 为最佳。

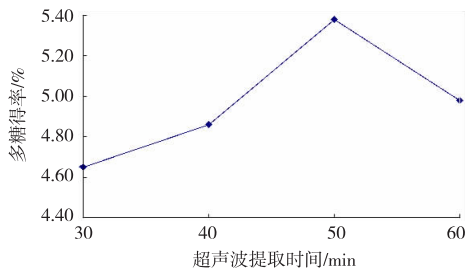


图 2 超声波提取时间对多糖得率的影响

##### 3.2.2 液固比对桑叶多糖得率的影响

在超声波提取时间 50 min 和温度 60 °C 提取条件下,选择不同液固比进行提取,结果如图 3 所示。由图 3 可知,多糖得率随着液固比的增加先升高再下降,当液固比超过 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>) 时,多糖得率减小,可见液固比选择 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>) 最佳。

##### 3.2.3 提取温度对多糖得率的影响

在超声波提取时间 50 min 和液固比 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>) 的条件下,选择不同提取温度进行提取,结果如图 4 所示。由图 4 可知,提取温度对多糖得率影响较大。多糖得率最佳温度是 70 °C,随后温度升高得率开始下降,而 60 °C ~ 70 °C 时,多糖得率没有显著变化,综合成本,温度 60 °C 时最佳。

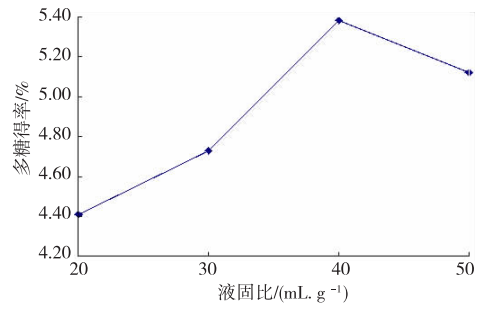


图 3 液固比对多糖得率的影响

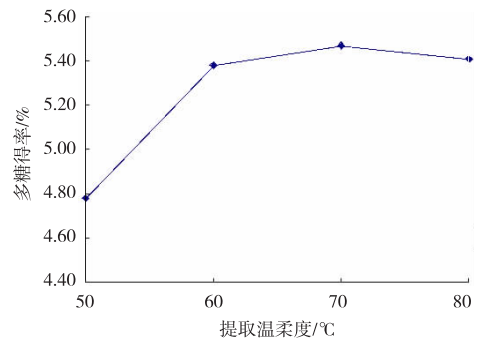


图 4 提取温度对多糖得率的影响

#### 3.4 桑叶多糖正交实验结果

由正交实验结果(表 2)可知,根据统计学原理,极差  $R$  值越大,说明此因素对实验的影响较大,由于  $R_C > R_B > R_A$ ,所以三个影响因素中 C(提取温度)对桑叶多糖的提取率影响最大,其次为 B(液固比),影响程度最小的是 A(超声波提取时间),影响多糖提取得率的主次因素是  $C > B > A$ 。

表 2 正交实验结果

实验号	因素			多糖得率 /%
	A	B	C	
1	40	30:1	50	4.59
2	40	40:1	60	4.92
3	40	50:1	70	4.83
4	50	30:1	60	4.69
5	50	40:1	70	5.50
6	50	50:1	50	4.87
7	60	30:1	70	5.25
8	60	40:1	50	4.91
9	60	50:1	60	4.80
$K_1$	14.34	14.53	14.37	—
$K_2$	15.06	15.34	14.41	—
$K_3$	14.96	14.50	15.58	—
$R$	0.72	0.84	1.21	—

由表 2 可知,A 因素中  $K_2$  值影响最大,B 因素中  $K_2$  值影响最大,C 因素中  $K_3$  值影响最大,桑叶多糖提取的最优搭配水平为  $A_2B_2C_3$ ,即超声波提取时间 50 min,液固比为 40:1 (mL·g<sup>-1</sup>),提取温度为 70 °C,最佳组合时桑叶多糖得率达到 5.50%。

由表3可知,在正交实验优化工艺基础上,超声波提取时间具有显著性,说明超声波缩短提取时间对桑叶多糖的提取率影响最大,这与丁锐<sup>[11]</sup>有关桑叶多糖的研究实验结果相类似。

表3 正交实验方差分析

因素	偏差平方和	自由度	均方	F	F <sub>a</sub>	显著性
提取时间/min	0.101	2	0.050	14.26	19.00	P < 0.05
液固比/(mL·g <sup>-1</sup> )	0.148	2	0.074	2.114	19.00	—
提取温度/℃	0.315	2	0.158	4.514	19.00	—
误差	0.070	2	0.035	—	—	—

注: F<sub>0.05(2,2)</sub> = 19.00。

### 3.4 抑菌实验结果

采用滤纸片法研究桑叶醇提取物对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌试验菌的抑制效果,以抑菌圈直径的大小为衡量指标,实验结果见表4和图5。

表4 桑叶醇提取物的抑菌结果

桑叶提取物	抑菌圈直径/mm
枯草芽孢杆菌	++
大肠杆菌	+

注:“+”表示抑菌圈在8.0~10.0 mm,“++”表示抑菌圈在10.0 mm以上。

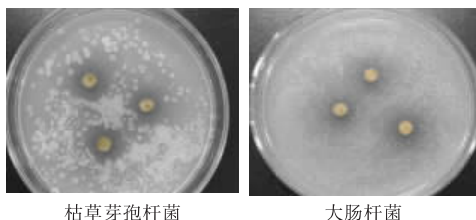


图5 桑叶醇提取物抑菌实验结果

由文献[12]可知,抑菌圈直径  $8.0 \text{ mm} \leq r \leq 10.0 \text{ mm}$  为抑菌较明显,抑菌圈直径  $r \geq 10.0 \text{ mm}$  为抑菌明显。由表4可知,桑叶醇提取物对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌均有较强的抑制作用,抑制效果为枯草芽孢杆菌 > 大肠杆菌,这与陈佳佳<sup>[13]</sup>发现桑叶醇提取物对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌有较强抑制作用的结论一致。桑叶醇提取物具有抑菌活性,其抑菌主要成分可能是黄酮类<sup>[14]</sup>。

桑叶多糖抑菌作用结果见表5和图6。由文献[12]可知,抑菌圈直径  $r < 6.5 \text{ mm}$  规定为无抑菌作用。在本次实验中,5个浓度的多糖溶液对两种试验菌的抑菌圈均小于6.5 mm,因此桑叶多糖对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌都没有抑菌作用。

表5 桑叶多糖的抑菌结果

	0.5%	1.0%	1.5%	2.5%	3.0%
枯草芽孢杆菌	--	--	--	--	--
大肠杆菌	--	--	--	--	--

注:“--”表示抑菌圈小于6.5 mm,无意义。

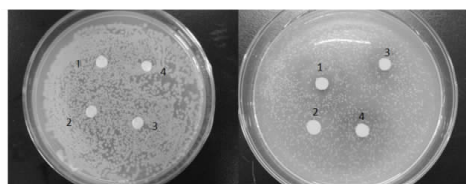


图6 桑叶多糖抑菌实验结果

注:1-空白对照;2,3,4-均为样品

图6 桑叶多糖抑菌实验结果

有资料显示,黄精多糖、黄芪多糖、香菇多糖、铁皮石斛多糖等许多中药多糖均具有抑菌活性<sup>[15-16]</sup>。沈建林<sup>[17]</sup>实验证明15%乙醇提取得到香蕉多糖对大肠杆菌具有抗菌作用。而在桑叶多糖抑菌实验中,以大肠杆菌、枯草芽孢杆菌为指示菌,桑叶多糖溶液对这两种试验菌都没有抑菌作用,结果与姜延伟<sup>[18]</sup>在黄连多糖的研究结论类似。这可能是因为桑叶多糖不具有抑菌活性,桑叶多糖的活性主要表现在其他方面,有待进一步深入研究。

## 4 结束语

桑叶多糖具有显著的药理活性,利用和开发前景广阔,本文通过对桑叶多糖提取工艺的优化,为桑叶多糖进一步开发利用做初步研究,其最佳提取工艺为超声波提取时间50 min,液固比为40:1(mL·g<sup>-1</sup>),提取温度为70℃,在此工艺下,桑叶多糖得率达到5.50%,桑叶多糖对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌没有抑制作用。

## 参考文献:

- [1] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编(上)[M].北京:北京人民卫生出版社,1986.
- [2] 高学敏.中药学[M].北京:人民卫生出版社,2000.
- [3] 徐爱良,熊湘平,文宁,等.桑叶的现在研究进展[J].湖南中医学院学报,2005,25(2):60-62.
- [4] 王储炎,范涛,代君君.桑叶的化学成分、生理功能及其在工业中的应用[J].中国食品添加剂,2008(2):148-151.
- [5] 李智辉.桑叶的药用价值及临床运用[J].亚太传统医药,2010,6(8):161-162.
- [6] 黄重席,彦军付,伟伟,等.汉中桑园及桑树副产物综合利用的方向及思路[J].现代农业科技,2009(19):317-318.
- [7] 应芝,励建荣,韩晓棒.桑叶多糖的研究进展[J].现代食品科技,2007,23(11):89-93.
- [8] 王玲,张富宝.中药大黄提取色素的抑菌作用研

- 究[J].食品工业科技,2000,21(6):27-28.
- [9] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药学杂志,1996,31(9):550-553.
- [10] 刘军海,黄宝旭,许恩庆.桑叶多糖提取工艺研究[J].中国食品添加剂试验研究,2009(5):90-95.
- [11] 丁锐.桑叶多糖的提取工艺研究[J].安徽农业科学,2011,39(35):21650-21652.
- [12] 周晶,刘景文,符敬伟,等.马齿苋中多糖的提取与含量的测定[J].中草药,2001,32(2):124-125.
- [13] 陈佳佳,刘凡,廖森泰,等.桑叶提取物抑菌活性及抑菌稳定性研究[J].食品工业科技,2012,33(9):88-91.
- [14] 张海青,曾红,杨洪涛,等.恩施藤茶硒多糖的体外抑菌作用研究[J].微量元素与健康研究,2009,26(2):12-141.
- [15] 赵丽玲,迟晓喆.桑叶中抑菌有效成分的提取及分离[J].酿酒科技,2012(7):217-219.
- [16] 王玲,唐德强,王佳佳,等.铁皮石斛原球茎与野生铁皮石斛多糖的抗菌及体外抗氧化活性比较[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2016,44(6):167-172.
- [17] 沈建林,沈红元.香蕉多糖的抗菌活性研究[J].食品研究与开发,2015,36(18):69-71.
- [18] 姜延伟,吴玉娟,许杰伦,等.黄连多糖活性粗探[J].时珍国医国药,2001(1):48-49.

## Extraction and Antibacterial Experiment Research of Polysaccharide From Mulberry Leaves

WANG Shikuan<sup>a</sup>, ZHANG Daifang<sup>b</sup>, CHEN Yuyun<sup>b</sup>

(a. School of Bioengineering, b. School of Chemical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract:** The polysaccharides from mulberry leaf were extracted by water and precipitated by alcohol with the help of ultrasonic. The extraction process of polysaccharides from mulberry leaves was optimized by orthogonal experimental method and the antibacterial effect of mulberry polysaccharide in vitro was evaluated by the filter paper method. The effects of extraction time, liquid-solid ratio and extraction temperature were investigated on the extraction rate of polysaccharide from mulberry leaves. The inhibitory effects of mulberry polysaccharide on *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* were observed. The experimental results show that the ultrasonic extraction time was 50min; liquid-solid ratio was 40:1; extraction temperature was 70°C; and the extraction of mulberry leaf polysaccharide liquid yield reached 5.50%. The ethanolic extract from Mulberry leaves had obvious inhibitory effect on *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. The polysaccharides of Mulberry leaves have no inhibitory effect on *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.

**Key words:** mulberry leaf; polysaccharide; water extraction and alcohol precipitation; antimicrobial effect