

工业大麻雌株花叶多糖抑菌活性及稳定性分析

郭孟璧, 郭蓉, 郭鸿彦, 张庆滢, 陈璇, 许艳萍, 杨若菡, 杨明*

(云南省农业科学院 经济作物研究所, 云南 昆明 650205)

摘要: 通过水提醇沉法制备工业大麻雌株花叶多糖 (polysaccharide from flowers and leaves of female plant in industrial hemp, PFLFIH), 采用 Kirby Bauer 纸片扩散法 (K-B 纸片琼脂扩散法) 测定该多糖对 9 种常见致病菌的体外抑菌活性, 同时研究了紫外线、温度、pH 值、氧化剂与还原剂对其抑菌效果的影响。结果表明: PFLFIH 对金黄色葡萄球菌具有杀菌效果, 最低抑菌浓度 (minimum inhibition concentration, MIC) 为 3.125 mg/mL, 最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 为 6.25 mg/mL, 对大肠埃希菌等其他 8 种人体致病菌无抑菌活性。该多糖具有良好的紫外稳定性和热稳定性, 对氧化剂和还原剂的耐受能力较好; pH 值对其抑制金黄色葡萄球菌活性的影响较大, 在 pH 值为 7 时抑菌活性最高。

关键词: 工业大麻; 多糖; 金黄色葡萄球菌; 抑菌活性; 稳定性

中图分类号: R 285 文章编号: 1673-1689(2019)06-0011-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.002

Antibacterial Activities and Stabilities of Polysaccharide from Flowers and Leaves of Female Plant in Industrial Hemp

GUO Mengbi, GUO Rong, GUO Hongyan, ZHANG Qingying,
CHEN Xuan, XU Yanping, YANG Ruohan, YANG Ming*

(Industrial Crop Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China)

Abstract: Polysaccharide from flowers and leaves of female plant in industrial hemp (PFLFIH) was extracted by decoction and alcohol sedimentation technique. Its antimicrobial activities *in vitro* of 9 kinds of normal pathogenic bacteria and fungi were determined by comparing the size of K-B inhibition zone. The effects of ultraviolet rays, temperature, solvents pH value, oxidant and reducer on its antimicrobial activities were also discussed. The results showed that PFLFIH had a good bactericidal effect on *Staphylococcus aureus*. Its minimum inhibitory concentration (MIC) was 3.125 mg/mL and minimum bactericidal concentration (MBC) was 6.25 mg/mL. Meanwhile, it has no antimicrobial activities of other 8 pathogenic bacteria and fungi. High temperature, ultraviolet rays, oxidant and reducer treatments did not affect its inhibitory effect. While pH value of the solvent environment is 7, the best antimicrobial activity could be shown.

Keywords: industrial hemp, polysaccharide, *Staphylococcus aureus*, antibacterial activities, stability

收稿日期: 2016-11-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360350); 国家麻类产业技术体系项目(CARS-16-E07); 云南省重点新产品开发专项(2016BB005)。

作者简介: 郭孟璧(1979—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事天然药物化学和农产品开发研究。 E-mail: gmb3618@126.com

* 通信作者: 杨明(1966—), 男, 博士, 研究员, 主要从事大麻遗传育种研究。 E-mail: ymhemp@163.com

引用本文: 郭孟璧, 郭蓉, 郭鸿彦, 等. 工业大麻雌株花叶多糖抑菌活性及稳定性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(06): 11-16.

工业大麻是经过遗传改良的大麻品种,其毒性成分四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol, THC) < 0.3%, 经许可可以合法种植加工利用^[1]。它是一种食用、药用、纤维用为一体的高经济价值的作物,其茎秆纤维可用于纺织、建材和造纸,籽实可用于食品和药品^[2],在云南、内蒙古、黑龙江等多个省份均有广泛的种植分布^[3]。在工业大麻纤维收获时,工业大麻雌株的花穗和叶片约占整个植株质量的 24%~25%^[4],若弃之不用则造成花叶资源的巨大浪费。因此,工业大麻雌株花叶的利用成为工业大麻多用途开发亟待解决的主要问题之一。

现有研究表明,大麻纤维对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、白色念珠菌和对造成人体脚气病的须癣毛癣菌、红色毛癣菌、犬小孢子菌 3 种真菌具有显著的抑制效果,其抗菌性可能与微量的脂溶性大麻酚类成分有关^[5-7]。大麻茎皮脱胶产生的果胶中提取的皂苷类成分具有显著的抗真菌作用^[8]。大麻花叶中含有多糖、大麻酚类、萜类及黄酮等多种活性物质,其中大麻酚类化合物对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有明显的抗菌性能,齐墩果烯、齐墩果酸对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和白色念珠菌的抑制作用明显^[9-18]。

植物多糖因其抑菌、抗肿瘤、增强免疫等方面的生理活性越来越受到广泛的重视,然而目前尚未见国内外对工业大麻花叶多糖抑菌活性进行研究的相关文献报道。

本文作者以云南省种植面积最大的工业大麻品种“云麻 1 号”(THC 质量分数为 0.15%)雌株花叶为材料,采用水提醇沉法得到工业大麻雌株花叶粗多糖(PFLFIH),研究其对 9 种常见人体致病菌的体外抑菌活性和稳定性,为开发成本低廉、天然无毒的新型工业大麻花叶抑菌剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物样品 工业大麻雌株花叶:采自云南省农业科学院经济作物研究所试验地,为纤维型种植模式下“云麻 1 号”雌株始果期的顶部花穗,室内阴干,粉碎后过 40 目筛,置于-4℃下保存。

1.1.2 供试菌种 肺炎链球菌(ATCC31001-19),购自北京生物制品检定所;蜡样芽孢杆菌(FSCC115002)、新生隐球菌(GIM2.209),购自广东省微生物菌种保藏中心;其余菌种均由昆明医科大学病原生物学与免疫学试验室提供。所选菌种见表 1。

表 1 供试菌种

Table 1 Testing microorganisms

编号.		类 别	菌 种
1	G+	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
2	G+	链球菌属 <i>Streptococcus</i>	肺炎链球菌(ATCC31001-19)
3	G+	芽孢杆菌属 <i>Bacillus Cohn</i>	蜡样芽孢杆菌(FSCC115002)
4	G-	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
5	G-	志贺氏菌属 <i>Shigella</i>	痢疾杆菌(<i>Shigella castellani</i>)
6	G-	埃希菌属 <i>Escherichia</i>	大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>)
7	G-	沙门氏菌属 <i>Salmonella Lignieres</i>	伤寒杆菌 (<i>Salmonella enterica</i>)
8	真菌 fungus	念珠菌属 <i>Candida Albicans</i>	白色念珠菌(<i>Saccharomyces albicans</i>)
9	真菌 fungus	酵母菌属 <i>Saccharomyces</i>	新生隐球菌(GIM2.209)

1.1.3 培养基 蜡样芽孢杆菌采用厂家自带液体培养基,大肠杆菌、绿脓杆菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌、金黄色葡萄球菌采用营养肉汤培养基,白色念珠菌、新生隐球菌用沙保弱培养基,肺炎链球菌用血清肉汤培养基^[19]。

1.1.4 仪器设备 VS-840K-U 超净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司产品;H6303i 生物显微镜,重庆光电仪器有限公司产品;Agilent 1260 高

效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司产品;立式压力蒸汽灭菌器 YXQ-LS-50S11,上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造;LRH-250A 生化培养箱,广东韶关市泰宏医疗器械有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 PFLFIH 的制备 取 1.1.1 中粉碎过的干燥花叶粉末放入索氏提取器中,依次用石油醚(60~90℃)和体积分数 70% 乙醇回流,除去色素、酚类等杂

质,避光自然干燥。取上述处理过花叶 500 g,加蒸馏水 3.5 L,沸水浴提取 2 h,期间适当补充蒸馏水。提取液过滤后,滤渣再重复提取 2 次。滤液合并后加热浓缩至生药与浸膏质量比为 1:5,加入体积分数 95%乙醇,至溶液中乙醇的体积分数为 80%,均匀搅拌,4 ℃静置 24 h,过滤,依次用体积分数 80%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚多次洗涤,干燥后即得 PFLFIH。

1.2.2 总糖和蛋白质质量分数的测定 PFLFIH 的总糖质量分数测定以葡萄糖为标准品,采用苯酚-硫酸法^[20]。蛋白质质量分数的测定以牛血清白蛋白为标准品,采用考马斯亮蓝染色法^[21]。

1.2.3 THC 含量的测定 称取干燥样品 0.200 0 g,用正己烷:乙酸乙酯(体积比 9:1)溶液 10 mL 超声提取 5 min,静置 30 min 后,用 0.425 μm 滤膜过滤后待测。采用液相色谱法^[22]测定样品的 THC 质量分数。

1.2.4 抑菌活性的测定 将供试菌种配置成菌液浓度为 1×10^7 CFU/mL 的菌悬液,接种于相应固体平板培养基上。将多糖配制成 300 mg/mL 的样品液,-4 ℃保存备用。采用 K-B 纸片法^[23],吸取 20 μL 样品液于直径为 6 mm 经灭菌的滤纸片上,以无菌水作空白对照,阴干后贴于各培养基表面,放 37 ℃培养箱培养 18~24 h 后,采用十字交叉法测量抑菌圈直径,设置 3 个重复。平均抑菌圈 >7 mm,则有抑菌活性。

1.2.5 最低抑菌浓度(MIC)的测定 将多糖用对倍稀释法分别配制成 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562、0.781、0.39、0.195 mg/mL(编号 1—10),设置不加药液的为阳性对照,各试管的菌液接种量均为 5×10^5 CFU/mL,同时设置不加药液、不接种菌的为阴性对照,37 ℃培养 24 h,设置 3 个重复。

1.2.6 最低杀菌浓度(MBC)的测定 将 1.2.5 中的含药菌液接种至相应的培养基平皿中,于 37 ℃继续培养 24 h,用活菌计数法记录试验平皿上的菌落,平均小于 5 个菌落的最小稀释度的药物浓度即记录为最低杀菌浓度(MBC),设置 3 个重复。

1.2.7 抑菌稳定性测定 将多糖分别进行紫外线照射、温度、氧化剂与还原剂、不同酸碱处理后,采用 1.2.4 操作,记录抑菌圈直径,设置 3 个重复。采用 Spss 软件中 LSD 方法进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

紫外线处理:用波长为 253.7 nm 的紫外线照射

样品,照射强度为 30 W/cm²,照射距离为 60 cm,照射时长设为 30、60、120 min;

温度处理:将样品于 50、80、121 ℃下分别烘干处理 2 h;

不同 pH 值溶液处理:用相同浓度(6 mol/L)的 HCl 和 NaOH 配制 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10 的水溶液,将样品分别溶解于不同 pH 值溶液中,室温下放置 24 h;

氧化剂与还原剂处理:分别用质量分数为 0.50、1.00、5.00 的 H₂O₂ 或 Na₂SO₃ 溶液处理样品,室温下放置 24 h。

2 结果与分析

2.1 PFLFIH 的产率及化学组成

用水提醇沉法提取 PFLFIH,得率为 7.25%。采用苯酚-硫酸法测得该粗多糖的总糖质量分数为 81.0%,采用考马斯亮蓝染色法测定得其蛋白质质量分数为 7.41%。

2.2 工业大麻雌株花叶及 PFLFIH 中的 THC 质量分数

按 1.2.3 方法检测,“云麻 1 号”干燥雌株花叶中的 THC 质量分数为 0.15%,而从 PFLFIH 中未检测到 THC。利用 THC 不易溶于水的性质,采用热水提取乙醇沉降的工艺有效避免了 THC 在多糖中的富集,得到的多糖无毒品滥用隐患。

2.3 PFLFIH 对不同供试菌种的抑菌活性

PFLFIH 对金黄色葡萄球菌有明显抑菌效果,对其他供试的人体致病菌无抑制作用(见表 2)。

表 2 PFLFIH 对不同供试菌种的抑菌活性
Table 2 Antimicrobial abilities of PFLFIH

供试菌种	抑菌圈直径/mm	供试菌种	抑菌圈直径/mm
空白	—	铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	—
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureas</i>	16±0.6	痢疾杆菌 <i>S. castellani</i>	—
肺炎链球菌 <i>S. pneumoniae</i>	—	伤寒杆菌 <i>S. enterica</i>	—
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	—	白色念珠菌 <i>S. albicans</i>	—
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	—	新生隐球菌 <i>C. neoformans</i>	—

注:—为没有观察到抑菌圈。

2.4 PFLFIH 对金黄色葡萄球菌的 MIC 和 MBC

PFLFIH 对金黄色葡萄球菌的 MIC 为 3.125

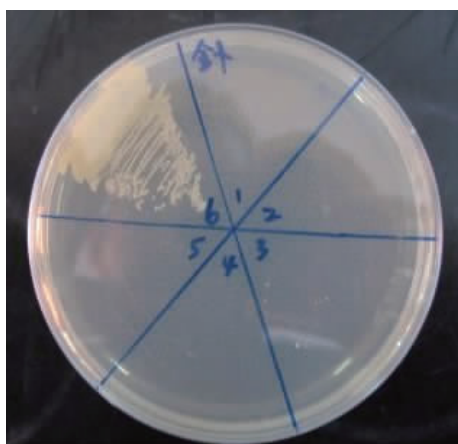
mg/mL(见表 3),MBC 值为 6.25 mg/mL(如图 1),杀菌效果显著。

表 3 工业大麻花叶多糖对金黄色葡萄球菌的 MIC 测定结果

Table 3 MIC of PFLFIH against *S. aureus*

	阴性对照	多糖质量浓度/(mg/mL)										阳性对照
		100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.562	0.781	0.390	0.195	
长菌情况	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	++	++

注:++为长菌很多;+为有菌生长;-无菌生长。



图中编号 1~6 质量浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.12 mg/mL 药液的含菌溶液

图 1 工业大麻多糖对金黄色葡萄球菌的 MBC 测定结果

Fig. 1 MBC results on *S. aureus* of PFLFIH

2.5 不同处理对 PFLFIH 抑制金黄色葡萄球菌活性的影响

2.5.1 紫外线照射对 PFLFIH 抑菌活性的影响

不同时长的紫外线照射后,PFLFIH 的抑菌圈直径在 15.3~15.7 mm 之间波动,与对照(16.3 mm)无显著性差异(图 2),抑菌活性基本保持不变,对紫外线照射耐受性能较好。

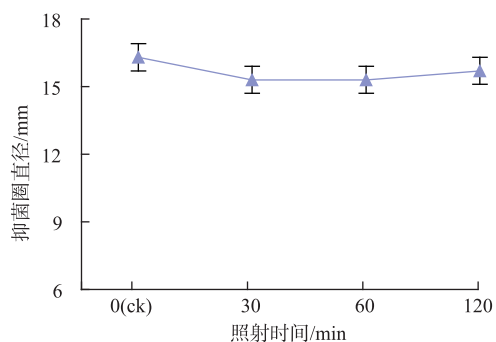


图 2 不同时长紫外线照射后 PFLFIH 抑制金黄色葡萄球菌活性的变化

Fig. 2 Antimicrobial activities of PFLFIH against *S. aureus* effected by UV irritation for different time

2.5.2 温度对多糖抑菌活性的影响

经温度 50~121 °C 的热处理后,抑菌圈直径在 14.7~15.3 之间波动,与对照相比无显著差异,抑菌活性表现稳定,具有较好的热稳定性。

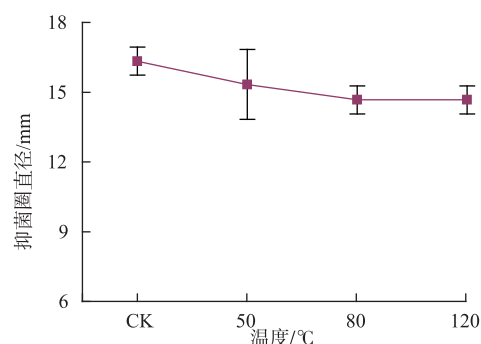


图 3 不同温度处理后 PFLFIH 抑制金黄色葡萄球菌活性的变化

Fig. 3 Antimicrobial activities of PFLFIH against *S. aureus* effected by different temperatures

2.5.3 pH 值对多糖抑菌活性的影响

PFLFIH 在中性(pH 为 7)水溶液中的抑菌活性最强,在酸性与碱性水溶液中其抑菌活性均显著降低(图 4)。pH 值分别为 4、6、8、10 时,与中性水溶液比较,多糖对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别缩小 9.8%、9.8%、9.8%和 14.1%。

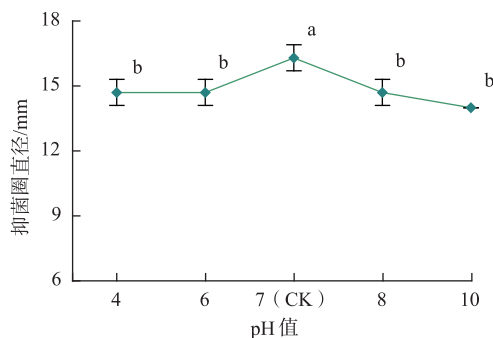


图 4 pH 值对 PFLFIH 抑制金黄色葡萄球菌活性的影响

Fig. 4 Antimicrobial activities of PFLFIH against *S. aureus* effected by pH values of solutions

2.5.4 氧化剂和还原剂对多糖抑菌活性的影响

PFLFIH 在质量分数为 0.5%~5.0%的氧化剂或还原剂溶液处理下,抑菌圈直径分别在 15.3~15.7 和 15.3~16.3 之间波动(图 5),和对照相比抑制金黄色葡萄球菌的活性基本保持不变,抗氧化还原能力较强。

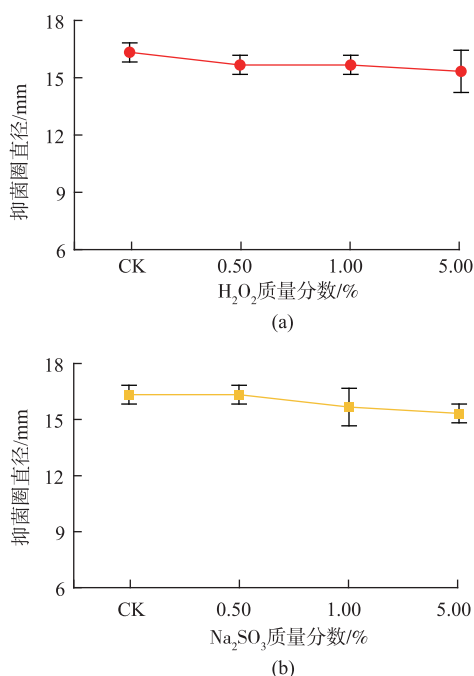


图 5 氧化剂和还原剂对 PFLFIH 抑制金黄色葡萄球菌活性的影响

Fig. 5 Effects of oxidant and reducer on the antimicrobial activities of PFLFIH

参考文献:

- [1] 陈其本,余立惠,杨明,等. 大麻栽培利用及发展对策[M]. 成都:电子科技大学出版社,1993:1-2.
- [2] 熊和平,王玉富,田玉杰,等. 麻类作物育种学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2008:297.
- [3] 郭鸿彦,杨明,郭孟璧,等. 旱地工业大麻高产优质栽培技术[M]. 昆明:云南民族出版社,2013:1-2.
- [4] DU Junqiang, HE Jinfeng, HE Congfen, et al. Review on active ingredients from *Cannabis sativa* leaves and its pharmacological characteristics[J]. China Medical Herald, 2011, 31(8): 9-11. (in Chinese)
- [5] DANG Yuping, YANG Xueqin, WAN Zhe. Inhibitory effect of Chinese hemp fibers against *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, and *Microsporum canis* [J]. Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Forces, 2008, 19(11): 1000-1001. (in Chinese)
- [6] DANG Yuping, YANG Xueqin, WAN Zhe. Study on hemp, flax and ramie fibers against *Trichophyton mentagrophytes* [J]. Chinese Journal of Mycology, 2008, 3(1): 12-14. (in Chinese)
- [7] ZHOU Yongkai, ZHANG Jianchun, ZHANG Hua. Bacteria resistant property of hemp fiber and its anti-bacterial mechanism [J]. Journal of Textile Research, 2007, 28(6): 12-15. (in Chinese)
- [8] CHEN Benchao, CAI Guangming, YUAN Ye, et al. Antibacterial activities *in vitro* of different extracts from hemp pectin [J].

3 结语

本研究中采用水提醇沉法得到的 PFLFIH 总糖质量分数为 81.0%, 蛋白质质量分数为 7.41%, 不含有 THC。该多糖对金黄色葡萄球菌有较强的抑菌活性, 并且具有杀菌效果, 最低抑制浓度 (MIC) 为 3.125 mg/mL, 最低杀菌浓度 (MBC) 为 6.25 mg/mL。

PFLFIH 具有较好的耐紫外线、耐高温和抗氧化剂与还原剂的能力, 在中性溶液环境下抑菌活性最强。酸性或碱性溶液的处理可能导致多糖发生变化, 从而降低了对金黄色葡萄球菌的抑菌活性。该多糖的组成及抑菌机理目前尚不明确, 尚需进一步研究和探讨。植物源抑菌剂因具有安全、来源广泛、专一性强等优点日益受到关注, 成为开发应用的热点。工业大麻雌株花叶多糖能够有效抑制并杀灭金黄色葡萄球菌, 稳定性较好, 提取工艺流程简单、成本低廉且无毒品安全隐患, 具有巨大的开发潜力。

- Chinese Traditional Patent Medicine**, 2013, 35(2):398-401. (in Chinese)
- [9] RADWAN M M, ELSOHLY M A, SLADE D, et al. Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*[J]. **Journal of Natural Products**, 2009, 72(5):906-911.
- [10] CHEN Xuan, YANG Ming, GUO Hongyan. Research advances in cannabinoids of *Cannabis sativa*[J]. **Bulletin of Botany**, 2011, 46(2):197-205. (in Chinese)
- [11] APPENDINO G, GIBBONS S, GIANA A. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure activity study[J]. **Journal of Natural Products**, 2008, 71(8):1427-1430.
- [12] FERENCZY L, GRACZA L, JAKOBEY I. An antibacterial preparatum from hemp (*Cannabis sativa* L.)[J]. **Naturwissenschaften**, 1958, 45(8):188.
- [13] GUPTA S K, BANERJEE A B. Screening of selected west bengal plants for antifungal activity[J]. **Economic Botany**, 1972, 26(3):255-259.
- [14] DAHIYA M S, JAIN G C. Inhibitory effects of cannabidiol and tetrahydrocannabinol against some soil inhabiting fungi[J]. **Indian Drugs**, 1977, 14(4):76-79.
- [15] TURNER C E, ELSOHLY M A. Biological activity of cannabichromene, its homologs and isomers[J]. **The Journal of Clinical Pharmacology**, 1981, 21(8-9 Suppl):283-291.
- [16] AHMED S A, ROSS S A, SLADE D, et al. Cannabinoid ester constituents from high-potency *Cannabis sativa*[J]. **Journal of Natural Products**, 2008, 71(4):536-542.
- [17] LI Chunlei, CUI Guangdong, SHI Gaofeng, et al. Chemical constituents from low toxic hemp leaves[J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**, 2009, 31(1):104-105. (in Chinese)
- [18] JUAN Huiling, SHI Gaofeng, LI Chunlei, et al. Study on the bacteriostasis of the extract of low toxic cannabis leaves and stems [J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2008, 36(32):14168-14196. (in Chinese)
- [19] CHEN Jianzhong, GE Shuilian, ZAN Lifeng, et al. Optimization of aqueous two-phase extraction of total flavonoids from *Farfugium japonicum* (L.f.) Kitam by response surface methodology and antibacterial activity[J]. **Food Science**, 2015, 36(24):57-62. (in Chinese)
- [20] ZHUANG Xiaowei, LIU Xiufang, MAO Guiyuan, et al. Determination of *Lethariella cladonioides* polysaccharide from Tibet[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2012, 18(4):103-106. (in Chinese)
- [21] WANG Wenping, GUO Siyuan, LI Lin, et al. The determination of protein content in polysaccharides from *Stanuntonia Chinensis* with coomassie brilliant blue method[J]. **Food Research and Development**, 2008, 29(1):115-117. (in Chinese)
- [22] GUO Mengbi, GUO Hongyan, XU Yanping, et al. The pre-treatment process optimization of HPLC analysis on cannabinoids in hemp[J]. **Plant Fiber Sciences in China**, 2009, 31(3):182-185. (in Chinese)
- [23] DUAN Weili, LIU Yanqiu, BAO Yihong. Study on antimicrobial activities and stability of essential oil from *Artemisia argyi*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(12):1332-1337. (in Chinese)