

条斑紫菜多糖超声提取及其对 U 937 细胞生长抑制影响的研究

何荣海, 马海乐, 骆新峥

(江苏大学生物与环境工程学院, 镇江 212013)

摘要: 采用超声辅助提取技术进行条斑紫菜多糖的提取, 并进行柱层析纯化。经正交试验确定的条斑紫菜粗多糖提取的最佳工艺条件为: 15 g 干紫菜粉加入 2 L 水, 提取液循环转速为 12 r/s, 提取液温度为 40℃, 超声功率为 800 W, 超声处理时间/超声间隙为 3 s/2 s 和超声全程时间为 2 h, 对应的得率为 26.29%。粗多糖分别经 50%、60%、70% 和 80% 乙醇分步醇沉, 沉淀出四种不同级分的半纯品, 用 DEA E-52 纤维素和 Sephadex G-200 将其中两种多糖半纯品纯化, 分别得到 5 个和 3 个不同分子量的级分, 分别考察了这两种紫菜多糖半纯品及各自分级产物对人血癌细胞 U 937 细胞的体外生长抑制的抗肿瘤试验, 结果前者及其分级产物对 U 937 细胞生长有一定的抑制作用, 后者及其分级产物则有一定的促进作用。

关键词: 多糖; 超声提取; 条斑紫菜; U 937 细胞

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2005)08-0165-04

何荣海, 马海乐, 骆新峥 条斑紫菜多糖超声提取及其对 U 937 细胞生长抑制影响的研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(8): 165-168

He Ronghai, Ma Haile, Luo Xinzheng Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Porphyra yezoensis* and their inhibition effects on U 937 cell growth[J]. Transactions of the CSAE, 2005, 21(8): 165-168 (in Chinese with English abstract)

0 引言

条斑紫菜 (*Porphyra yezoensis* Ueda), 是中国长江以北养殖的紫菜主要品种, 产量较高, 是重要的经济海藻。条斑紫菜多糖具有抗病毒、抗肿瘤、降血糖血脂和增强免疫力等多种生物活性^[1-4]。

目前有资料显示的关于紫菜多糖的提取, 均为沸水提取法, 该法提取周期长, 且得率低, 一般在 8% 左右^[5-8]。超声辅助提取法可以大幅度地提高有效成分的提取率, 缩短提取时间, 提高工作效率, 节省溶剂, 简化提取操作步骤^[9-11]。本试验采取超声法提取紫菜多糖, 使多糖的提取时间大大缩短, 得率提高; 用层析柱对粗多糖进行分离纯化研究, 并进行抗肿瘤试验, 对研究紫菜多糖的结构与功能也很有意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料、仪器与试剂

条斑紫菜(江苏省南通市海安县兰波实业有限公司), 二乙胺基乙基纤维素 (DEA E-52, Whatman 公司), 葡聚糖凝胶 (Sephadex G-200, 瑞典 Pharmacia 公司), 人血癌细胞 U 937 (江苏大学医学技术学院提供), 新生牛血清 (杭州四季青公司), 四甲基偶氮唑 (MTT, Sigma 公司, 配制浓度为 5 mg/mL), 二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司); 隆达超声循环提取机 (HF-2 SB 型, 北京弘祥隆生物技术开发有限公司), 可见分光光度

计 (WFJ7200 型, 尤尼柯上海仪器有限公司), 电子天平 (BS200S-WE1 型, 德国沙多利斯公司), 层析柱 (上海华美试验仪器厂), 酶联免疫检测仪 (EL-340 型, BD-RAD 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 检测方法

紫菜多糖定量检测: 采用苯酚-硫酸法^[7,8]。较传统方法略有不同, 改葡萄糖为半乳糖作为标准测定紫菜多糖。

人血癌细胞 U 937 体外生长抑制的抗肿瘤试验测定方法: 溴化 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑 (MTT) 法^[14]。

1.2.2 条斑紫菜粗多糖的超声辅助提取试验方法

提取工艺流程: 干紫菜粉 超声辅助提取 浓缩 加 Sevage 试剂 离心分离 上清液加乙醇沉淀 离心分离 沉淀 干燥 称重 检测多糖。

试验所用超声辅助提取设备可控参数有: 全程超声辅助提取时间、超声功率、超声处理时间/间隙时间、料液温度、液体循环泵转速、料液比, 共 6 个可控参数。本文在前期完成的单因素试验的基础上, 确定了 15 g 干紫菜粉加入 2 L 水, 提取液循环转速为 12 r/s, 对料液温度、全程提取时间、超声功率和超声处理时间/间隙时间 4 个因素进行 L₉(3⁴) 正交试验研究, 试验方案如表 1 所示。

表 1 超声辅助提取多糖正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal tests for ultrasonic extraction of polysaccharides

水平	A 温度 /℃	B 全程时间 /h	C 功率 /W	D 超声处理时间/ 间隙时间
1	40	1	1200	2s/2s
2	20	2	800	3s/2s
3	60	3	1600	4s/2s

收稿日期: 2005-01-14 修订日期: 2005-04-12

基金项目: 江苏省高技术研究项目 (编号 BG2003319)

作者简介: 何荣海 (1971-), 男, 工程师, 博士生, 研究方向: 生物资源有效成分的分离与提纯。镇江 江苏大学生物与环境工程学院, 212013

通讯作者: 马海乐, 博士, 教授, 博士生导师, 从事食品生物技术与食品分离技术研究。镇江市学府路 301 号 江苏大学生物与环境工程学院, 212013。Email: mh1@ujs.edu.cn

1.2.3 条斑紫菜粗多糖纯化试验方法

纯化工艺流程: 紫菜多糖粗品 乙醇分步沉淀 DEAD-纤维素柱层析 葡聚糖凝胶 G-200 柱层析 多糖分级产物(纯品)。分步沉淀乙醇溶液的浓度分别为 50%、60%、70% 和 80%。采用 DEA E-52 柱进行纯化操作的条件为: 进样量 50 mg, 进样速度 0.5 mL/min, 蒸馏水洗脱, 洗脱速度 0.3 mL/min, 检测波长 490 nm; 采用 Sephadex G-200 柱进行纯化操作的条件为: 进样量 10 mL, 进样速度 0.5 mL/min, 蒸馏水洗脱, 洗脱速度 0.2 mL/min, 检测波长 490 nm。

1.2.4 条斑紫菜多糖对癌细胞 U937 体外抑制试验方法

U937 细胞培养 24 h, 加入样品后继续培养 24 h, 再加入 MTT 溶液后培养 4 h, 3000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 加入 150 mL DM SO 溶解, 用酶标仪测定吸光值(OD), 计算抑制率。同时以蒸馏水代替样品作空白对照。

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 条斑紫菜多糖超声辅助提取

条斑紫菜多糖超声辅助提取的正交试验结果如表 2 所示。对试验结果进行极差分析得出, 试验因素对得率影响的主次顺序为: A > C > D > B。最优组合: A₁B₂C₂D₂。在最佳提取参数条件进行了 3 次验证试验, 多糖得率平均值为 26.29%。比传统沸水提取法(20 g 干紫菜粉加入 1 L 水, 不加超声, 沸水浴提取 3 次, 每次 2 h, 其余步骤与超声提取法相同)的得率 11.4% 提高了 2 倍多, 提取时间也从 6 h 缩短为 2 h。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Layout and results of orthogonal tests

序号	A	B	C	D	得率/%
1	A1	B1	C1	D1	14.9079
2	A1	B2	C2	D2	26.9302
3	A1	B3	C3	D3	17.6008
4	A2	B1	C2	D3	9.9064
5	A2	B2	C3	D1	10.5798
6	A2	B3	C1	D2	9.9064
7	A3	B1	C3	D2	15.1001
8	A3	B2	C1	D3	12.9842
9	A3	B3	C2	D1	19.3321
K1	59.4389	39.9144	37.7985	44.8189	y _i = 137.2479
K2	30.3926	50.4942	56.1687	51.9367	
K3	47.4164	46.8393	43.2807	40.4914	
k1	19.8130	13.3048	12.5995	14.9396	Y =
k2	10.1309	16.8314	18.7229	17.3122	
k3	15.8055	15.6131	14.4269	13.4971	
R _j	9.6821	3.5266	6.1234	3.8151	

多糖提取效率提高的原因可能主要在于超声波对紫菜颗粒的热作用、机械作用和空化作用的综合效应。超声波空化可以产生微冲流, 能有效地打破边界层, 使扩散速度增加, 使萃取或浸出速度提高 7~10 倍, 浸提

过程中无化学反应, 被浸提的生物活性物质在短时间内保持不变, 生物活性不减, 同时提高了破碎速度, 缩短了破碎时间, 可极大地提高提取效率^[10,11]。

2.2 条斑紫菜多糖纯化

2.2.1 乙醇分步沉淀

用不同乙醇浓度可将不同分子量大小的多糖分离开来。乙醇浓度越低, 沉淀多糖的分子量越大; 乙醇浓度越高, 沉淀多糖的分子量越小。由 50% 乙醇沉淀多糖的质量占四次沉淀得到的多糖总质量的 39.6%, 60% 乙醇沉淀的为 13.2%, 70% 乙醇沉淀的为 18.7%, 80% 乙醇沉淀的为 29.4%。由此可见, 分子量大的紫菜多糖所占比例稍大。

2.2.2 多糖半纯品柱层析纯化

对 50% 和 70% 浓度乙醇沉淀的多糖(编号 1 号和 3 号)分别用 DEA E-52 柱和 Sephadex G-200 柱进行纯化。

图 1 是多糖半纯品 1 号 DEA E-52 柱洗脱图, 根据洗脱情况可将 1 号级分分成如下几个组分: 将 1~19 管收集液合并, 记为 1a; 20~37 管收集液合并, 记为 1b; 38~81 管收集液合并, 记为 1c; 82~115 管收集液合并, 记为 1d。分别将 1a、1b、1c 和 1d 组分经过 Sephadex G-200 柱纯化, 结果如图 2。

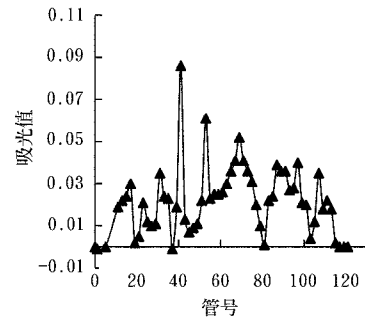


图 1 50% 乙醇沉淀的多糖 DEA E-52 柱洗脱图

Fig 1 DEA E-52 chromatogram of polysaccharides deposited by 50% ethanol

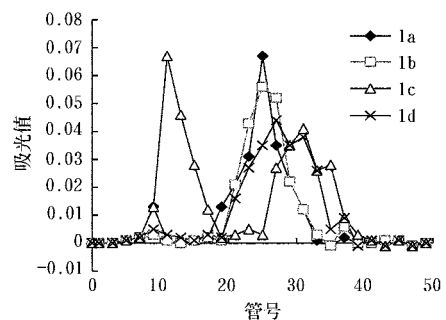


图 2 50% 乙醇沉淀的多糖各组分葡聚糖凝胶 G-200 柱层析图

Fig 2 Sephadex G-200 chromatogram of ingredients deposited by 50% ethanol

1a、1b 和 1d 经 Sephadex G-200 柱纯化各出现一个峰, 可以初步认为 1a、1b 和 1d 组分各为一种不同分子量大小的多糖, 1c 经 Sephadex G-200 柱纯化出现两

个峰, 组分为两种不同分子量的多糖(记为 1c1 和 1c2)。

多糖半纯品 3 号的 DEAE-52 纤维素柱层析结果如图 3 所示。根据洗脱情况可将 3 号组分分成如下几个级分: 3a、3b 和 3c。分别将其经过 Sephadex G-200 柱纯化, 结果如图 4。

可以初步认为 3a、3b 和 3c 组分均各为一种不同分子量大小的多糖。

2.3 条斑紫菜多糖对血癌细胞 U 937 的体外抑制试验

50% 和 70% 乙醇沉淀的紫菜多糖的分级产物(多糖半纯品 1 号和 3 号)及各自级分的抗肿瘤试验结果分别如图 5 和图 6。

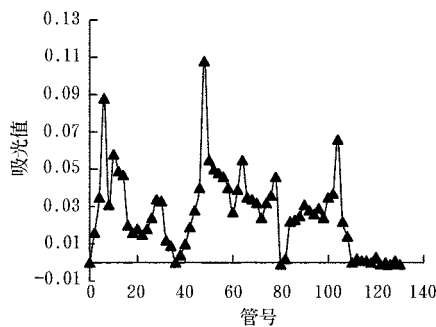


图 3 70% (V/V) 乙醇沉淀的多糖 DEAE-52 纤维柱洗脱图

Fig 3 DEAE-52 chromatogram of polysaccharides deposited by 70% (V/V) ethanol

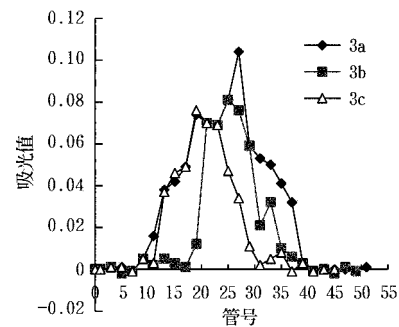


图 4 70% (V/V) 乙醇沉淀的多糖各组分葡聚糖凝胶 G-200 柱层析图

Fig 4 Sephadex G-200 chromatogram of ingredients deposited by 70% (V/V) ethanol

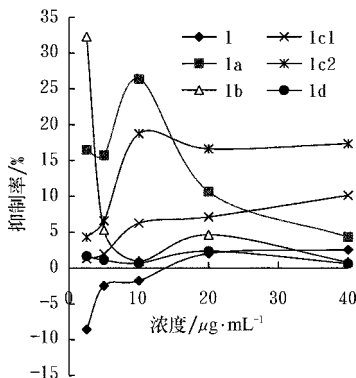


图 5 多糖半纯品 1 号及其纯化级分对 U 937 细胞体外抑制试验

Fig 5 Inhibition tests to U 937 cells for No. 1 polysaccharides and its ingredients

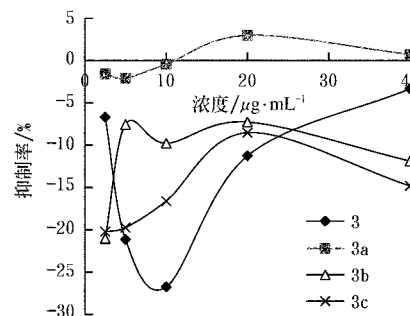


图 6 多糖半纯品 3 号及其级分对 U 937 细胞体外抑制试验

Fig 6 Inhibition tests to U 937 cells for No. 3 polysaccharides and its ingredients

3 结论与展望

1) 本文将超声辅助提取的方法用于紫菜多糖的提取, 经正交试验确定了提取紫菜粗多糖的最佳工艺参数为: 提取液温度 40℃, 超声功率 800W, 超声处理时间/超声间隙 3s/2s, 超声时间 2h, 对应的得率为 26.29%, 与试验中对照的沸水提取法的得率 11.4% 相比提高了 2 倍多, 提取时间从 6h 降到 2h, 效率大大提高。

2) 对于粗多糖分别用 50%、60%、70% 和 80% 的乙醇溶液进行分步沉淀, 对应得到多糖半纯品为 1 号、2 号、3 号和 4 号, 并用 DEAE-52 纤维素和 Sephadex

结果显示, 1 号半纯品在浓度大约 14 μg/mL 以下对 U 937 细胞生长有一定促进作用, 在浓度大约 14 μg/mL 以上有一定的抑制作用, 其分级产物 1a、1b、1c1、1c2 和 1d 对 U 937 的生长都有一定的抑制效果, 其中 1b 在浓度为 2.5 μg/mL 时抑制率达到 30% 以上; 其次是 1a 在浓度 10 μg/mL 时, 抑制率超过 25%。

3 号半纯品及其分级产物 3b、3c 对 U 937 的生长没有抑制效果, 而会促进细胞生长。3a 在浓度 10 μg/mL 以下, 对 U 937 细胞的生长有轻微促进作用, 在浓度 10 μg/mL 以上对细胞的生长有轻微的抑制作用。

G-200 将多糖半纯品 1 号和 3 号纯化, 分别得到 1 号组分的 5 个不同分子量的级分和 3 号组分 3 个不同分子量的级分。

3) 50% 乙醇沉淀得到的紫菜多糖(1 号半纯品)及其分级产物 1a、1b、1c1、1c2 和 1d 对人血癌细胞 U 937 的生长都有一定的抑制效果; 70% 乙醇沉淀得到的紫菜多糖(3 号半纯品)及其分级产物 3b、3c 对 U 937 的生长没有抑制效果, 而会促进细胞生长, 3a 在浓度 10 μg/mL 以上对 U 937 细胞有轻微抑制作用, 在 10 μg/mL 以下有轻微促进作用。据此结果, 为得到抑制 U 937 的紫菜多糖, 可以在提取过程从 50% 乙醇沉淀的

粗多糖中分离纯化。

由于时间关系,本试验只纯化了 50%、70% 乙醇浓度沉淀出多糖半纯品 1 号和 3 号,有待将另外的 60%、80% 乙醇浓度沉淀出多糖半纯品 2 号和 4 号进行纯化,得到不同的分级产物,进一步测定各个分级产物的分子量并进行结构分析。此外,试验中考察了不同样品浓度对 U 937 的影响,培养时间对其生长的影响有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 崔秀生,宋晓虹,陈 怡 紫菜多糖与天青 I 异染作用的研究[J] 中国海洋药物,2000,(3): 28- 30
- [2] 李明霞 紫菜多糖 Fe(III) 配合物的溶出性能研究[J] 微量元素与健康研究,2001,18(2): 32- 34
- [3] 张伟云,刘宇峰,陈 颢,等 紫菜多糖 PY4 对免疫细胞增殖的影响[J] 中国药科大学学报,2001,32(1): 57- 59
- [4] 张伟云,周建峰,陈 颢,等 紫菜多糖对免疫细胞及肿瘤细胞生长的影响[J] 生命科学研究,2002,6(2): 167- 170
- [5] Hrom álkov áZ, Ebringerov á A, Valachovic P. Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia officinalis* L. [J] Ultrasonics Sonochemistry, 1999, 5(4): 163- 168
- [6] Miyajima Toshihiro, Ogawa Hiroshi, Koike Isao. Alkali-extractable polysaccharides in marine sediments:

Aundance, molecular size distribution, and mono-saccharide composition [J] Geochimica et Cosmochimica Acta, 2001, 65(9): 1455- 1466

- [7] 张伟云,陈 颢,汪水娟,等 条斑紫菜中一种琼胶多糖的分离纯化及鉴定[J] 植物学通报,2000,17(5): 429- 434
- [8] 张伟云,陈 颢,汪水娟,等 条斑紫菜中四个多糖组分的提纯及组成分析[J] 食品科学,2000,20(11): 50- 52
- [9] Toma Maricela, Vinatoru M, Paniwnyk L, et al Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction[J] Ultrasonics Sonochemistry, 2001, 8(2): 137- 142
- [10] Hrom álkov áZ, Ebringerov á A, Valachovic P. Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.) [J] Ultrasonics Sonochemistry, 2002, 9(1): 37- 44
- [11] 胡爱军,丘泰球 超声技术在食品工业中的应用[J] 声学技术,2002,21(4): 192- 199
- [12] 钱 和,张 添,刘长虹 改进苯酚- 硫酸法测定芦荟多糖含量[J] 江苏食品与发酵,2002,(2): 3- 6
- [13] 黄伟坤 食品检验与分析(第一版)[M] 中国轻工业出版社,1997. 9
- [14] 唐东平 MTT 法实验技术在实体瘤研究中的应用新进展[J] 药物分析,2000,19(2): 246- 248

Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Porphyra yezoensis* and their inhibition effects on U937 cell growth

He Ronghai, Ma Haile, Luo Xinzhen

(School of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Polysaccharides were extracted from *Porphyra yezoensis* using ultrasonic extraction method and were purified the polysaccharides with DEA E-52 and Sephadex G-200 chromatogram. Through orthogonal tests, we achieved the best conditions of ultrasonic extraction process as follows: weight of *Porphyra yezoensis* is 15 g, volume of water is 2 L, rotation speed of pump is 12 r/s, extraction temperature is 40 °C, ultrasonic power is 800W, time ratio of ultrasonic processing and intermission is 3s/2s and ultrasonic processing time is 2 h. In this method, production rate of rough polysaccharides reaches 26.29%. Then we precipitated rough polysaccharides in order with 50%, 60%, 70% and 80% (V/V) ethanol and got four ingredients of rough polysaccharides. These ingredients were purified with DEA E-52 and Sephadex G-200 chromatogram and then 5 or 3 kinds of different molecular weight polysaccharides were obtained, respectively. The former parts have a little inhibition effects on U 937 cell growth, yet the latter parts have promotion effects.

Key words: polysaccharide; ultrasonic extraction; *Porphyra yezoensis*; U 937 cell