

钝顶螺旋藻多糖的提取工艺及其生物活性

张亚旗¹, 卢珍华¹, 黄世英¹, 李桂玲^{1,2}, 李健^{1,2}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省海洋功能食品工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 以钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)藻粉为原料,采用热碱浸提法提取螺旋藻中多糖类化合物。通过单因素实验及正交试验对螺旋藻多糖的提取工艺进行优化,用等电点沉淀与离子交换色谱分离技术联用工艺进行脱蛋白,并与Sevag法脱蛋白作对比。同时,对比探究了不同浓度下螺旋藻多糖的DPPH自由基的清除能力及其对正常细胞LO2和肿瘤细胞HepG2增殖的抑制作用。结果表明,影响最为显著的因素为提取时间,当料液比($m:V$)为1:20、浸提温度为80℃、浸提时间为3h、碱液质量分数为1.25%时,多糖提取率为8.78%;等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺法的多糖得率(7.55%)及蛋白质脱除率(89.54%)均高于Sevag法的多糖得率(6.33%)及蛋白质脱除率(48.40%);螺旋藻多糖对DPPH自由基具有较好的清除作用;500~2 000 mg/L质量浓度范围内的螺旋藻多糖对LO2细胞无毒,对HepG2细胞有显著的抑制作用。

[关键词] 螺旋藻多糖;正交设计;脱蛋白;抗氧化;细胞毒性

[中图分类号] TS 201.2

Extraction Technology and Bioactivity of Polysaccharide from *Spirulina platensis*

ZHANG Yaqi¹, LU Zhenhua¹, HUANG Shiyong¹, LI Guiling^{1,2}, LI Jian^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China)

Abstract: The single-factor test and orthogonal array design were used to optimize polysaccharide extraction from *Spirulina platensis* by hot alkali method. The efficiencies of various deproteinization methods including Sevag and isoelectric point precipitation combined with ion exchange chromatography were compared. The DPPH free radical scavenging ability of *Spirulina* polysaccharides was measured *in vitro*. The inhibitory effect of *Spirulina* polysaccharide on normal cell LO2 and tumor cell HepG2 proliferation was tested. The results showed that extraction time was the main factor affecting the polysaccharide yield, and the best extraction conditions were as follows: material-liquid ratio of 1:20, extraction temperature of 80℃, extraction time of 3 h, alkali concentration of 1.25%. Under the above conditions, the yield of polysaccharide was 8.78%. Isoelectric point precipitation combined with ion exchange chromatography method was more efficient than the Sevag method. *Spirulina* polysaccharide had a good scavenging effect on DPPH free radicals and it had no effect on the cell proliferation ability of LO2. Besides, it significantly inhibited the proliferation of liver cancer cells HepG2 at 500-2 000 mg/L.

Keywords: *Spirulina platensis* polysaccharide; orthogonal array design; deproteinization; antioxidant; cytotoxicity

[收稿日期] 2020-03-04

[基金项目] 福建省自然科学基金项目(2018J01585)

[作者简介] 张亚旗(1995—),男,硕士生,从事天然产物分离纯化技术研究。通信作者:李健(1980—),男,副教授,博士,从事食品化学及食品微生物技术研究。E-mail:lijian2013@jmu.edu.cn

0 引言

螺旋藻是蓝藻纲颤藻科的一类低等生物,由单细胞或多细胞组成的丝状体,体长 200 ~ 500 μm ,宽 5 ~ 10 μm ,圆柱形,呈疏松或紧密的有规则的螺旋形弯曲,形如钟表发条,故而得名^[1-2]。螺旋藻主要分为钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)和极大螺旋藻(*Spirulina maxima*),其中钝顶螺旋藻富含蛋白质、多糖、叶绿素、 β -胡萝卜素、 γ -亚麻酸、维生素、微量元素、藻蓝蛋白等^[3-5]。螺旋藻营养均衡,具有脂肪和胆固醇含量低、蛋白质含量高的特点,在人类保健食品领域逐渐扮演重要的角色。联合国粮农组织和世界卫生组织认为螺旋藻是 21 世纪人类最佳食物和最佳营养品^[6-7]。

植物多糖是一种重要的天然活性成分,广泛存在于自然界的植物体中,是由许多 α -糖苷键或 β -糖苷键连接所形成的化合物^[8]。其中钝顶螺旋藻多糖具有多种特殊的生理作用,能够有效起到抗单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)活性的作用^[9]、对角膜新生血管的抑制作用^[10],对免疫刺激活性增加^[11]、降血脂^[12]、调节肠道微生物^[13]以及肝素辅助因子 II 介导的抗凝活性等有重要作用^[14]。钝顶螺旋藻多糖提取的常用方法有热水浸提法、碱液浸提法、微波辅助提取法、超声波辅助提取法、反复冻融破壁提取法和酶辅助提取法等^[15-19]。Chaiklahan 等^[20]运用热水浸提法提取螺旋藻多糖,通过响应面优化最终多糖得率为 8.3%。由于钝顶螺旋藻中蛋白质含量高达 60%~70%,蛋白质脱除就成了钝顶螺旋藻多糖制备过程中一个非常关键的环节。目前常用的除蛋白质方法主要有蛋白酶水解法、Sevag 法、三氯乙酸法、加热浓缩法等^[21]。其中 Sevag 法是去除蛋白质的经典方法,它具有操作简便、试剂廉价、去除游离蛋白质效果好等优点^[22]。由于 Sevag 法使用有毒有害试剂,扩大生产易造成环境污染,从工业化生产的角度考虑,需要探究一种更加环保和低成本的生产工艺。

本文采用热碱浸提法提取钝顶螺旋藻粗多糖,等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺进行脱蛋白,并与 Sevag 法脱蛋白进行对比,研究了不同浓度下钝顶螺旋藻多糖的 DPPH 自由基的清除能力及其对正常细胞 LO2、肿瘤细胞 HepG2 增殖的抑制作用。通过单因素实验和正交设计试验优化钝顶螺旋藻多糖的最佳提取工艺,为钝顶螺旋藻多糖的提取和工业化生产提供科学依据,同时也为钝顶螺旋藻多糖的生物活性研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

钝顶螺旋藻干粉,购于福建神六保健品有限公司。

苯酚、浓硫酸、葡萄糖、NaOH、乙醇(体积分数 95%)、盐酸、正丁醇、二甲基亚砜(DMSO)、氯仿、二水柠檬酸钠、柠檬酸、十二水磷酸氢二钠、二水合磷酸二氢钠等均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;1 mL Uni SP/CM/Q/DEAE 50xs(预装柱),苏州纳微科技有限公司;硅藻土(DP20),青岛盛泰硅业有限公司;碧云天蛋白质测定试剂盒;四甲基噻唑蓝(MTT),南京奥多福尼生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-8000A 型紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;C-MAG HS 10 数显型加热磁力搅拌器,德国 IKA 集团;GE AKTA Pure 蛋白纯化仪,GE Healthcare,瑞典;冰箱,青岛海尔股份有限公司;PH211 酸度计,HANNA instruments;超滤平板膜小试设备,福建福美科技有限公司;布氏漏斗,化通天下实验仪器耗材;抽滤瓶,化通天下实验仪器耗材;5810R 高速冷冻离心机,德国艾本德股份有限公司;Synergy H1MF 多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验流程

等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺:螺旋藻藻悬液经过热碱浸提,在 pH = 4 条件下进行等电点沉淀,用质量分数 10% 硅藻土抽滤,收集滤液进行阳离子交换和色谱层析,得到螺旋藻

多糖。

Sevag 法脱蛋白：螺旋藻藻悬液经过热碱浸提，10 000 r/min 下离心 10 min，取上清液进行乙醇沉淀、静置，再 10 000 r/min 下离心 10 min，收集沉淀进行 Sevag 法脱蛋白，得到螺旋藻多糖。

1.3.2 热碱浸提螺旋藻多糖单因素试验

研究料液比、浸提温度、浸提时间及碱液质量分数对多糖提取率的影响。称取 2.00 g 样品 5 份，分别溶解于不同量的蒸馏水中，使料液比 ($m:V$) 分别为 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50；浸提温度分别取 50, 60, 70, 80, 90 ℃；浸提时间 1 ~ 5 h；NaOH 质量分数为 0.5%, 0.75%, 1.0%, 1.25%, 1.5%，进行水浴浸提。冷却至常温，10 000 r/min 离心 10 min 收集上清液，采用1:1盐酸溶液调节上清液 pH=7，测定多糖含量，并计算多糖得率。初步确定各单因素的最佳水平范围。每个处理做 3 次平行实验。

1.3.3 螺旋藻多糖提取工艺优化

在单因素试验的基础上，设计正交试验的因素与水平表，如表 1 所示。

表 1 正交试验因素与水平表
Tab.1 Actual levels of independent variables for orthogonal experiment factors

水平 Levels	因素 Factors			
	提取时间 Extraction time/h (A)	料液比 Material-water ratio ($m:V$)/(g: mL) (B)	提取温度 Extraction temperature /℃ (C)	NaOH 质量分数 Concentrations of NaOH /% (D)
1	2	1:10	70	1.00
2	3	1:20	80	1.25
3	4	1:30	90	1.50

1.3.4 脱蛋白方法

脱蛋白方法采用等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺法和 Sevag 法。

等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺法：在螺旋藻碱提液中加入 6 mol/L 的盐酸溶液，调节碱提液 pH=4，加入质量分数 10% 的硅藻土，搅拌均匀，使用布氏漏斗进行抽滤，将滤液脱盐。将脱盐后的滤液使用离子交换色谱进行脱蛋白，阳离子交换色谱柱使用 10 mmol/L pH=4 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液进行洗脱，阴离子交换色谱柱使用 20 mmol/L pH=7.8 的磷酸盐缓冲溶液进行洗脱，分别收集透过液，测定多糖及蛋白质浓度。

Sevag 法：氯仿与正丁醇混合体积比为 5:1，配制成 Sevag 试剂。样品溶液与 Sevag 试剂体积比为 4:1，然后用电动搅拌器以 200 r/min 的速度搅拌 5 min，于分液漏斗中静置 30 min。弃去下层液，并移取一定量上层液测定其蛋白质和多糖浓度，重复上述操作。

1.3.5 螺旋藻多糖对 DPPH 自由基的清除能力

用 DPPH 法测定螺旋藻的抗氧化活性^[23-24]。准确称取 DPPH 4 mg 溶解于体积分数 50% 乙醇溶液中，配制成 0.1 mmol/L 的 DPPH 工作液。将不同浓度的多糖样品溶液 100 μL 分别加入 100 μL 的 DPPH 工作液，混合均匀后避光反应 30 min，VC 作为对照，在 517 nm 处测定吸光度值 (A_1)，其中空白对照以体积分数 50% 乙醇代替样品，测定其吸光度值 (A_0)；样品对照以体积分数 50% 乙醇代替 DPPH 溶液，测定其吸光度值 (A_2)。DPPH 自由基清除率计算公式如下：清除率/% = $[1 - (A_1 - A_2)/A_0] \times 100$ 。

1.3.6 细胞毒性实验

通过 MTT 法测定 LO2 和 HepG2 细胞的活力^[25]。将处于对数生长期的细胞以每孔 100 μL (1×10^4 个) 接种于 96 孔细胞培养板中，置于体积分数 5% CO₂、37 ℃ CO₂ 细胞恒温培养箱中孵育 12 h

后,吸弃上清液,加入含有不同浓度多糖样品的 DMEM 高糖培养基,处理 24 h,吸弃上清液,加入含 15 μL 5 g/L MTT 溶液的 DMEM 高糖培养基 115 μL ,培养 4 h。待培养结束后,加入 150 μL DM-SO,振板 10 min,在 490 nm 下测定其吸光度值。

1.4 分析方法

1.4.1 葡萄糖标准曲线

采用苯酚-硫酸法测定多糖含量。称取 0.1 g 105 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥恒重的葡萄糖定容至 100 mL 容量瓶中,得到标准葡萄糖溶液 (1 g/L),摇匀备用。将配制好的标准葡萄糖溶液分别稀释配制成 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L 的溶液,精确移取以上不同浓度的葡萄糖溶液 1.0 mL,加入 1 mL 质量分数 6% 苯酚溶液,再加入 5 mL 的浓硫酸,混匀,静置 30 min 后在 490 nm 处测定其吸光度值,以吸光度值为纵坐标、葡萄糖浓度为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程为: $y = 0.009\ 47\ x - 0.007\ 47$, $R^2 = 0.999\ 7$ 。

1.4.2 多糖含量的测定

将螺旋藻多糖溶液适当稀释后,从中吸取 1 mL,加入 1 mL 质量分数 6% 苯酚溶液和 5 mL 浓硫酸,混匀,静置 30 min。在 490 nm 处测定吸光度值,代入标准曲线方程得到对应的葡萄糖浓度,按下列公式计算样品中多糖得率: $\text{多糖得率}/\% = (c \times V \times n \times 100)/m$,式中: c 为样品溶液中葡萄糖质量浓度 (mg/L); n 为样品溶液稀释倍数; V 为测定溶液体积 (mL); m 为螺旋藻藻粉质量 (g)。

1.4.3 螺旋藻多糖脱蛋白率和多糖损失率的测定

采用碧云天蛋白质测定试剂盒测定蛋白质含量,并以此计算不同脱蛋白方法对多糖溶液蛋白质脱除率的影响。

蛋白质脱除率公式如下: $\text{蛋白质脱除率}/\% = (N_1 - N_2) \times 100/N_1$,式中: N_1 为去除蛋白质前原液中蛋白质的含量; N_2 为去除蛋白质后原液中蛋白质的含量。

多糖保留率的计算公式为: $\text{多糖保留率}/\% = (M_2/M_1) \times 100$,式中, M_1 为去除蛋白质前原液中多糖的含量; M_2 为去除蛋白质后原液中多糖的含量。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

不同温度条件下螺旋藻多糖浸出效果见图 1a。可以看出,在 50 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内,50 ~ 80 $^{\circ}\text{C}$,螺旋藻多糖得率随温度的升高而不断增大,且增幅明显,当温度升高至 90 $^{\circ}\text{C}$ 时,多糖得率增大幅度明显减小。温度升高,能够增加反应速率,使分子运动加快,有利于多糖从细胞中溶出,并且增加了多糖在水中的溶解度^[26]。

碱质量分数对螺旋藻多糖浸出效果的影响见图 1b。可以看出,在碱性环境下,碱质量分数对多糖浸提的有利因素主要体现细胞壁被分解破坏,有利于胞内多糖及细胞壁中的多糖溶出^[27]。由图 1b 可以看出,粗多糖得率随 NaOH 浓度升高而呈增加趋势。而碱质量分数过高对多糖的浸提也会产生一些不利的影响,易使蛋白质变性产生絮状沉淀,包裹部分多糖,造成多糖的损失^[28]。由图 1b 可见,当 NaOH 质量分数为 1.25% 时,多糖得率达到最大值,之后多糖得率开始下降,说明过高的碱质量分数确实不利于多糖的浸提。

提取时间对螺旋藻多糖浸出效果的影响见图 1c。可以看出,多糖得率随着提取时间的增加而增大,这说明反应时间过短时,碱法提取不充分,因而得率随着时间的延长而提高,提取时间越长多糖得率越高^[29]。在提取时间为 3 h 时,粗多糖得率变化最小,曲线趋于平稳,甚至稍稍出现下降的情况,表明反应已经基本达到平衡状态。随着反应时间的增加,蛋白质变性和多糖水解也在不断进行,不利于多糖的提取。

料液比对螺旋藻多糖浸出效果的影响见图 1d。可以看出,不同的料液比会显著影响螺旋藻多糖

的得率^[30]。当料液比超过 1:20 时,随着溶剂用量的增加,多糖得率增长幅度减缓,表明此时螺旋藻已基本浸提完全。从整个提取工艺来看,增加提取剂的用量可降低浸出液体体系中蛋白质及多糖的浓度,有利于减少后续过滤过程中因浸出液流失及脱除蛋白过程中蛋白质沉淀对多糖的吸附造成的多糖损失^[31]。但是用水量过多,会导致后续工艺的能耗负担及用水成本的增加。

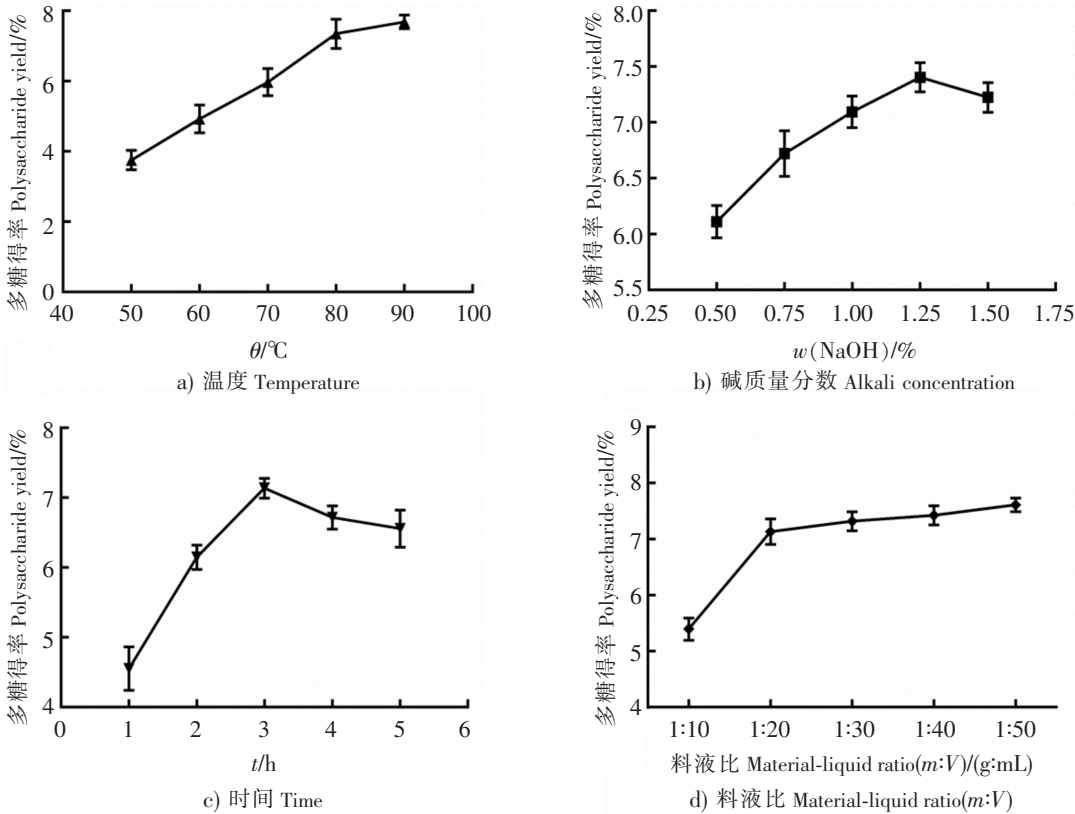


图 1 温度、碱质量分数、时间、料液比对螺旋藻多糖提取率的影响
Fig.1 Effects of temperature, alkali mass fraction, time, and material-liquid ratio on the extraction rates of polysaccharide from *Spirulina*

2.2 提取工艺正交试验结果

由表 2 可知,对螺旋藻多糖提取影响因素大小分别为:提取温度>碱质量分数>料液比>浸提时间。得到最佳组合为 $A_2B_2C_2D_2$, 即:提取时间为 3 h,料液比 ($m:V$) 为 1:20,提取温度为 80℃,碱质量分数为 1.25%。在此条件下进行 3 次验证实验,多糖提取率达到 8.78%。

由表 3 可知,校正模型具有显著性,其中 A、B 因素对提取率无显著影响,表明提取时间和料液比 2 个因素对螺旋藻多糖的提取基本无影响,提取温度、碱质量分数 2 个因素对螺旋藻多糖的提取影响极显著 ($P < 0.01$)。因此,提取温度和碱质量分数 2 个影响因素可作为提取过程中影响多糖提取率的首要考虑因素,且该提取方法可用于螺旋藻多糖的提取。

李会端等^[32]采用单因素试验分析螺旋藻多糖的碱提取最佳条件,发现碱提取工艺条件为:NaOH 浓度为 0.4 mol/L,料液比为 1:25 (g:mL),提取时间为 2 h,多糖提取率为 4.524%。郝志欣等^[33]采用单因素试验和正交试验对热碱浸提法提取螺旋藻多糖工艺进行优化,得到最佳提取工艺为:pH = 11,温度为 80℃,固液比为 1:30,浸提 2 次,浸提时间为 1 h,多糖得率为 4.213 %。这些研究报道与本研究相比,多糖得率均低于本研究的。

表 2 正交试验设计及结果
Tab.2 Orthogonal experiment design and experimental result

实验组号 Experiment number	水平 Level				多糖提取率
	A	B	C	D	Polysaccharide extraction rate/%
1	1	1	1	1	6.32 ± 0.099
2	1	2	2	2	8.58 ± 0.212
3	1	3	3	3	7.63 ± 0.353
4	2	1	2	3	7.67 ± 0.339
5	2	2	3	1	8.03 ± 0.311
6	2	3	1	2	7.59 ± 0.381
7	3	1	3	2	8.31 ± 0.169
8	3	2	1	3	6.79 ± 0.523
9	3	3	2	1	7.88 ± 0.664
k_1	7.510	7.433	6.900	7.410	
k_2	7.763	7.800	8.043	8.160	
k_3	7.660	7.770	7.990	7.363	
R	0.253	0.367	1.143	0.797	
主次因素 Primary and secondary factors	C > D > B > A				
最优组合 Optimal combination	$A_2B_2C_2D_2$				

表 3 正交试验的方差分析
Tab.3 Variance analysis of the orthogonal experiment

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares of deviations	自由度 Free degree	F 值 F value
校正模型 Correction model	8.021	8	7.039 **
截距 Intercept	1 051.876	1	7 384.462
A	0.195	2	0.683
B	0.431	2	1.513
C	4.996	2	17.538 **
D	2.399	2	8.420 **
误差 Error	1.282	9	

说明: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。
Note: ** indicated extremely significant difference ($P < 0.01$) .

2.3 螺旋藻多糖脱蛋白研究

2.3.1 等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺法脱蛋白

由图 2a 可知,随着螺旋藻多糖溶液 pH 值的上升,蛋白质的脱除率不断下降,多糖的保留率升高,说明螺旋藻粗多糖溶液中的杂蛋白的等电点主要在 2~4。在 pH = 2 时,蛋白质脱除率达到最高,但此时的多糖保留率低。推测可能是由两个原因造成:其一,由于酸性环境中部分多糖被水解,多糖损失过多;其二,由于蛋白质沉降时包裹了部分多糖一并沉降下来,导致多糖损失过多。因此,根据图 2a,选择 pH = 4 进行等电点沉淀最为合适,和陈昕等^[34]研究结果一致,此时多糖保留率为 90.75%,蛋白质脱除率为 48.24%。将经等电点沉淀后的粗多糖溶液使用不同的色谱柱进行脱蛋白处理。

由图 2b 可知,4 种色谱柱对多糖的吸附能力为 $Q > DEAE > CM > SP$,对蛋白质的吸附能力为 $SP > CM > DEAE > Q$ 。推测,经过等电点沉淀后,溶液中的大部分蛋白质带正电荷,流经树脂时,带正电荷的蛋白质和其他杂质被交换到树脂上,大部分螺旋藻多糖由于分子质量较大,所带电荷较弱无法交换到树脂内部,当粗多糖流过树脂时,多糖因不带电较快流出,大部分蛋白质被吸附在色谱柱上,只有少部分流出。阴离子交换树脂对螺旋藻多糖有部分吸附,可能是因为螺旋藻多糖中带有硫酸根离子的多糖被阴离子交换树脂吸附^[34]。综合考虑,选择强阳离子色谱柱层析作为进一步纯化螺旋藻多糖的方式。通

过等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺法脱蛋白得到多糖的保留率为 86.62%，蛋白质脱除率为 89.54%。经实验验证，等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺法脱蛋白最终多糖得率为 7.55%。

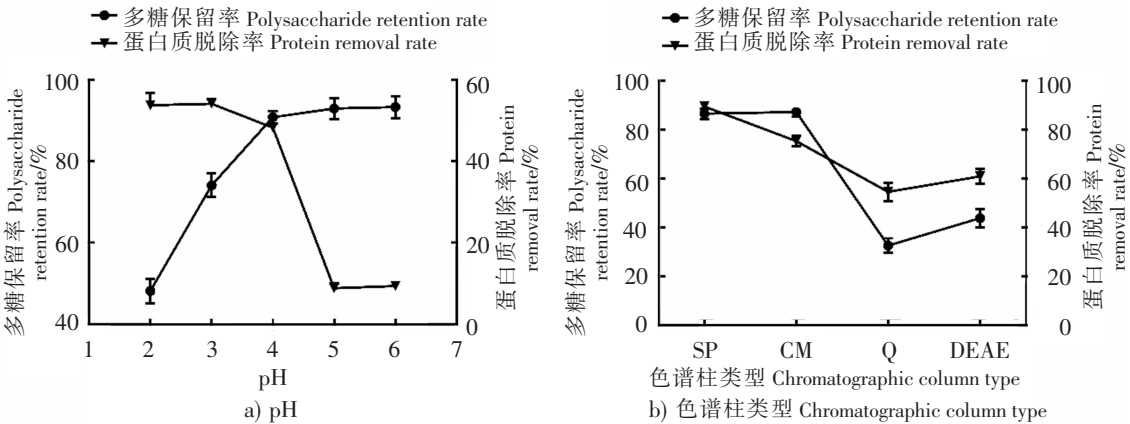


图 2 不同 pH 值和离子交换色谱柱对多糖保留率及蛋白质脱除率的影响
Fig.2 Effects of different pH values and different ion exchange chromatography column on polysaccharide retention rate and protein removal rate

2.3.2 Sevag 法脱蛋白

由于螺旋藻中蛋白质含量较高，Sevag 法脱蛋白过程中需要反复处理。由图 3 可以看出，随着脱蛋白次数的增加，蛋白质脱除率越来越高，但是多糖保留率越来越低。Sevag 法主要对游离蛋白质脱除效果较为明显，但对于多糖结合很牢固或被多糖包裹的蛋白质的效果较差。所以可能是因为少量的蛋白质与多糖结合紧密，以糖蛋白的形式存在不易被去除。在反复处理的过程中，每次去除蛋白质变性的胶状物时，不可避免溶有多糖，与蛋白质结合的蛋白聚糖和糖蛋白也会在处理时会沉淀下来，造成多糖损失^[35]。因此，一般脱蛋白次数不宜过多。由图 3 可以看出，脱蛋白次数为 3 次最为合理，此时蛋白质脱除率为 48.40%，多糖保留率为 72.03%。经实验验证，Sevag 法脱蛋白最终的多糖得率为 6.33%。

2.4 螺旋藻多糖对 DPPH 的清除能力

在 DPPH 测定中，抗氧化剂是单电子与 DPPH 自由基配对，使其在 517 nm 处的强吸收逐渐消失，其褪色程度与接受的电子数量相关^[36]。使用 DPPH 法测定螺旋藻多糖在 0.4 ~ 2.0 g/L 质量浓度下的抗氧化能力，结果如图 4 所示。可见，螺旋藻多糖具有一定的抗氧化能力，并且螺旋藻多糖的 DPPH 自由基清除能力与浓度呈正相关，随着浓度的不断提高，DPPH 自由基清除能力从 27.68% 提升至 59.09%。丁小梅等^[37]在 pH = 8、温度为 90 ℃、料

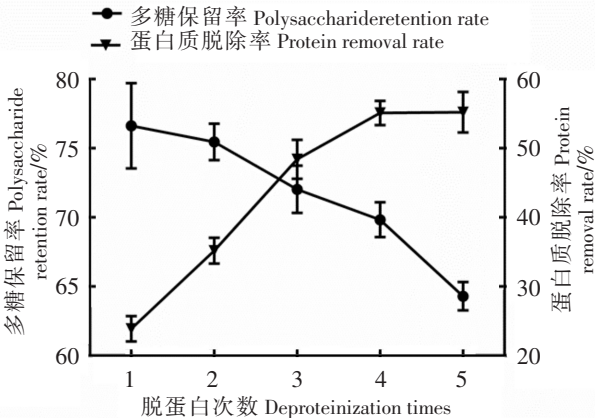


图 3 脱蛋白次数对多糖保留率及蛋白质脱除率的影响
Fig.3 Effect of deproteinization times on polysaccharide retention rate and protein removal rate

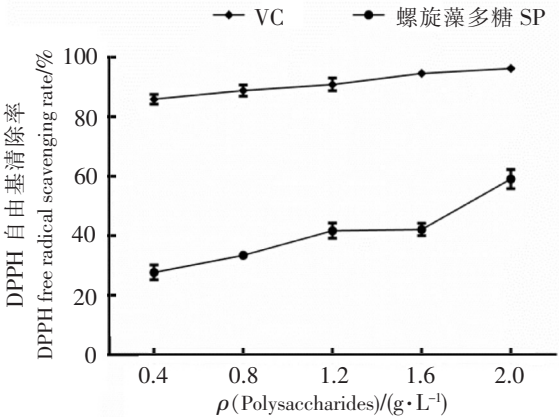


图 4 螺旋藻多糖对 DPPH 自由基的清除能力
Fig.4 Scavenging ability of *Spirulina* polysaccharides on DPPH free radicals

液比为1:40、提取时间为2 h的条件下提取出的螺旋藻多糖具有 DPPH 自由基清除能力,其 IC₅₀ 为 0.463 g/L。周志刚等^[38]采用热水浸提提取螺旋藻多糖,发现其无显著的抗氧化能力。可见,不同提取方法和提取条件所得到的螺旋藻多糖,其抗氧化能力与作用也不同。因此,可推测螺旋藻多糖的抗氧化能力与多糖结构相关,需进一步研究。

2.5 螺旋藻多糖细胞毒性实验测定结果

MTT 是一种可以被活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶还原的染料物质,可以形成水不溶性蓝紫色结晶甲臌而沉淀在细胞中,死细胞无法将其还原。二甲基亚砜 (DMSO) 可以溶解细胞中的蓝紫色甲臌,利用酶标仪在 490 nm 处测定其吸光度值,可以间接反映活细胞数量。在一定细胞数内,MTT 结晶甲臌形成的量与活细胞数成正比,从而反映活细胞的增殖情况^[39]。通过 MTT 法分别检测了螺旋藻多糖对正常的肝细胞 LO2 和肝癌细胞 HepG2 增殖能力的影响,结果如图 5 所示。图 5a 为螺旋藻多糖对正常的肝细胞 LO2 增殖能力的影响,可见,在 100~2 000 mg/L 范围内螺旋藻多糖对 LO2 细胞的增殖能力无明显影响。图 5b 为螺旋藻多糖对肝癌细胞 HepG2 增殖能力的影响,可见,螺旋藻多糖在 10~100 mg/L 范围内对 HepG2 细胞增殖能力无影响,但随着浓度的不断升高,500,1 000 和 2 000 mg/L 的螺旋藻多糖对 HepG2 细胞有明显的毒性作用,细胞存活率分别下降至 78.97%,74.96% 和 73.08%,细胞增殖能力显著下降 ($P < 0.05$),具有统计学意义。朱劲华等^[40]研究了螺旋藻多糖对回肠癌 HCT-8、神经胶质瘤 U251、宫颈癌 HeLa、肝癌 SMMC7721 和肺癌 A549 细胞增殖能力的影响,同时与人的正常肝细胞 LO2 进行比较,发现螺旋藻多糖对癌症细胞增殖能力有显著的抑制作用,但对正常肝细胞 LO2 的增殖能力影响较弱,并且存在浓度剂量效应,高浓度抑制作用强,与本研究结论一致。

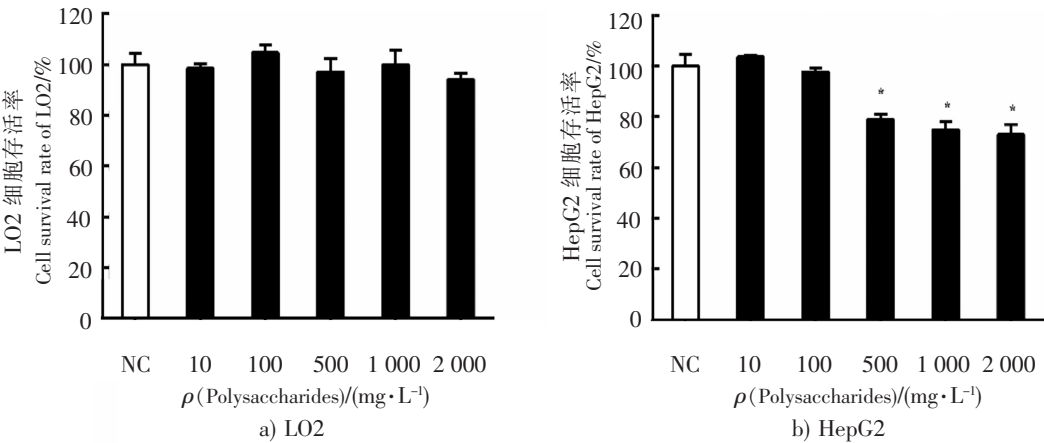


图 5 螺旋藻多糖对 LO2 和 HepG2 细胞存活率的影响
Fig.5 Effects of *Spirulina* polysaccharides on the survival rate of LO2 and HepG2 cells

3 结论

本研究通过单因素及正交试验,优化了热碱浸提法提取螺旋藻粗多糖。设计了一种等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用脱蛋白的新工艺,并与 Sevag 法脱蛋白作了对比。结果表明,热碱浸提的最佳工艺条件:料液比($m:V$)为 1:20,浸提温度为 80 ℃,浸提时间为 3 h,碱质量分数为 1.25%,在此条件下,使用等电点沉淀与离子交换树脂分离技术联用工艺法脱蛋白多糖总提取率达到 7.55%,蛋白质脱除率达到 89.54%。相对于 Sevag 法脱蛋白,多糖得率提高了 17.3%,蛋白质脱除率提高了 45%。此条件下获得的螺旋藻多糖具有一定的抗氧化能力,并且对正常细胞 LO2 无毒性,对肝癌细胞 HepG2 具有一定的抑制增殖作用。今后拟对螺旋藻多糖进一步分离纯化,并对其结构进行鉴定与解析,通过小鼠实验对抗癌作用进行深入探讨。

[参 考 文 献]

- [1] 何善生, 王力, 李健, 等. 螺旋藻研究进展 [J]. 食品工业, 2017, 38(12): 263-268.
- [2] AINAS M, HASNAOUI S, BOUARAB R, et al. Hydrogen production with the cyanobacterium *Spirulina platensis* [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2017, 42(8): 4902-4907. DOI:10.1016/j.ijhydene.2016.12.056.
- [3] CELEKLI A, YAVUZATMACA M. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations [J]. Bioresource Technology, 2009, 100(5): 1847-1851. DOI:10.1016/j.biortech.2008.09.042.
- [4] 余程明, 屈思雨, 许怡宁, 等. 钝顶螺旋藻蛋白提取物的延缓衰老功效研究 [J]. 食品科技, 2018, 43(4): 228-234.
- [5] 沈向阳, 梁霄, 付云, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 198-204, 136.
- [6] 徐惠娟, 徐桂花. 螺旋藻的营养保健功效 [J]. 农业科学研究, 2005, 26(1): 89-92.
- [7] ZHENG Y, ZHU F, LIN D, et al. Optimization of formulation and processing of *Moringa oleifera* and spirulina complex tablets [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2017, 24(1): 122-126. DOI:10.1016/j.sjbs.2016.08.017.
- [8] 申利红, 王建森, 李雅, 等. 植物多糖的研究及应用进展 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(2): 349-352.
- [9] CHIRASUWAN N, CHAIKLAHAN R, RUENGJITCHATCHAWALYA M, et al. Anti HSV-1 activity of *Spirulina platensis* polysaccharide [J]. Kasetsart Journal-Natural Science, 2007, 41(2): 311-318.
- [10] LEONARDS U, MOHR C. Schizotypal personality traits influence idiosyncratic initiation of saccadic face exploration [J]. Vision Research, 2009, 49(19): 2404-2413. DOI:10.1016/j.visres.2009.07.013.
- [11] PUGH N, ROSS S A, ELSOHLY H N, et al. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Planta Medica, 2001, 67(8): 737-742. DOI:10.1055/s-2001-18358.
- [12] 黑立新, 唐超, 王清吉. 复合螺旋藻多糖降血脂作用研究 [J]. 安徽农业科学, 2018, 46(35): 1-3.
- [13] 程宇娇, 马浩天, 毛雪, 等. 螺旋藻多糖对便秘小鼠肠道酶活性及微生物菌群的调节作用 [J]. 激光生物学报, 2019, 28(6): 563-570.
- [14] MAJDOUB H, BEN MANSOUR M, CHAUBET F, et al. Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis* [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 2009, 1790(10): 1377-1381. DOI:10.1016/j.bbagen.2009.07.013.
- [15] 胡炜东, 鲁富宽. 内蒙古地区天然螺旋藻多糖提取工艺研究 [J]. 内蒙古农业大学学报 (自然科学版), 2009, 30(4): 136-139.
- [16] 杨宝灵, 马堃, 王冰, 等. 螺旋藻多糖提取优选工艺条件的研究 [J]. 食品研究与开发, 2010, 31(10): 21-24.
- [17] 杨文杰, 黄惠华, 李琳, 等. 螺旋藻多糖的水提与微波辅助提取的比较 [J]. 食品工业科技, 2003, 24(8): 40-42.
- [18] 尚俊英, 谢裕安, 杨帆, 等. 螺旋藻多糖超声波提取方案的优化 [J]. 湖南师范大学学报 (医学版), 2007, 4(3): 23-26.
- [19] 吴文博, 董占军. 中药制剂中细胞破壁技术探讨 [J]. 中国药房, 2011, 22(3): 285-287.
- [20] CHAIKLAHAN R, CHIRASUWAN N, TRIRATANA P, et al. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. and its antioxidant capacity [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 58: 73-78. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2013.03.046.
- [21] 马丽, 覃小林, 刘雄民, 等. 不同的脱蛋白方法用于螺旋藻多糖提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 2004, 25(6): 116-119.
- [22] 丰朝霞, 张鸿. 分光光度法测定茯苓中多糖总糖含量 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(2): 17-18.
- [23] LUO W, ZHAO M M, YANG B, et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities [J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 499-504. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.09.077.
- [24] YANG B, WANG J S, ZHAO M M, et al. Corrigendum to "identification of polysaccharides from pericarp tissues of li-
<http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb>

- tchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities" [J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(11): 634-638. DOI:10.1016/j.carres.2006.04.005.
- [25] MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. Journal of Immunological Methods, 1983, 65(1/2): 55-63. DOI:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [26] HOU X J, CHEN W. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(1): 67-74. DOI:10.1016/j.carbpol.2007.07.034.
- [27] 石豪磊, 赵国正, 孔祥君, 等. 碱法破壁-酶法提取葡萄酒废酵母细胞壁多糖的工艺研究 [J]. 中国酿造, 2018, 37(12): 82-86.
- [28] 朱劼, 任淑振, 彭江晨. 细胞冻融辅助热水浸提螺旋藻多糖及脱蛋白工艺优化 [J]. 食品科学, 2012, 33(24): 111-116.
- [29] LIU Z D, WEI G H, GUO Y C, et al. Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 64(4): 548-552. DOI:10.1016/j.carbpol.2005.11.006.
- [30] GOVENDER S, PILLAY V, CHETTY D J, et al. Optimisation and characterisation of bioadhesive controlled release tetracycline microspheres [J]. Int J Pharm, 2005, 306(12): 24-40. DOI:10.1016/j.ijpharm.2005.07.026.
- [31] YIN G H, DANG Y L. Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box-Behnken statistical design [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 74(3): 603-610. DOI:10.1016/j.carbpol.2008.04.025.
- [32] 李会端, 秦志玉. 碱液冷提法提取程海螺旋藻中的多糖 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 255-257.
- [33] 郝志欣, 安东臣, 黄芬. 螺旋藻多糖提取优选工艺条件的研究 [J]. 大连民族学院学报, 2011, 13(5): 543.
- [34] 陈昕, 尹鸿萍, 王旻. 等电点除蛋白的 pH 值对螺旋藻酸性多糖硫酸基团含量的影响 [J]. 药物生物技术, 2004, 11(6): 381-384.
- [35] 曾庆帅, 李小定. 吴茱萸粗多糖碱法提取及脱蛋白方法研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(8): 111-114.
- [36] LI J, HUANG S Y, DENG Q, et al. Extraction and characterization of phenolic compounds with antioxidant and antimicrobial activities from pickled radish [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 136: 111050. DOI:10.1016/j.fct.2019.111050.
- [37] 丁小梅, 何善生, 王力, 等. 螺旋藻多糖对酪氨酸酶的抑制作用及抗氧化性能 [J]. 中国食品学报, 2019, 19(10): 86-92.
- [38] 周志刚, 刘志礼, 刘雪娟. 极大螺旋藻多糖的分离、纯化及其抗氧化特性的研究 [J]. 植物学报, 1997, 39(1): 77-81.
- [39] GAO X, LI C, TANG Y L, et al. Effect of *Hedyotis diffusa* water extract on protecting human hepatocyte cells (LO2) from H₂O₂-induced cytotoxicity [J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(7): 1148-1155. DOI:10.3109/13880209.2015.1056310.
- [40] 朱劲华, 张威, 王敏, 等. 极大螺旋藻多糖对 5 种人肿瘤细胞株生长的影响 [J]. 中国海洋药物, 2003, 22(6): 26-29.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)