

文章编号:1001-6880(2018)6-1015-07

# 微波辅助提取石榴皮多糖工艺优化及其免疫调节作用研究

李 云,朱彩平\*,张 扬,段 振,孙静儒

陕西师范大学食品工程与营养科学学院,西安 710119

**摘要:**优化石榴皮多糖的微波辅助提取工艺并初步探究石榴皮多糖的免疫调节作用。在单因素试验的基础上,以液料比、微波提取时间、微波功率为自变量,石榴皮多糖得率为响应值,利用响应曲面分析方法,确定石榴皮多糖提取工艺的最佳条件为:液料比 44:1 mL/g,微波提取时间 10 min,微波功率 450 W,在该条件下石榴皮多糖的得率为 10.48%。通过 MTT 法、中性红法、NO 释放量测定和黏附试验初步表明石榴皮多糖对 RAW264.7 巨噬细胞具有一定的免疫调节作用。

**关键词:**微波;石榴皮;多糖;响应曲面法;免疫调节

中图分类号:R961;Q946.8

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.017

## Microwave Assisted Extraction and Immunomodulatory Effects of Pomegranate Peel Polysaccharide

LI Yun, ZHU Cai-ping\*, ZHANG Yang, DUAN Zhen, SUN Jing-ru

College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China

**Abstract:** In this paper, the microwave assisted extraction of pomegranate peel polysaccharide was optimized and its immunomodulatory activity was studied. Based on the single factor experiment, the optimum extraction condition was determined by response surface analysis method. The solid-liquid ratio, extraction time, and microwave power were chosen as independent variables and the yield of pomegranate peel polysaccharide was selected as response value. Under the optimum extraction condition of solid-liquid ratio of 44:1 mL/g, extraction time of 10 min, and microwave power of 450 W, the yield of pomegranate peel polysaccharide was 10.48%. In addition, the immunomodulatory effects of macrophage RAW264.7 was preliminarily verified by MTT, neutral red essay, NO release determination, and adhesion test.

**Key words:** microwave; pomegranate peel; polysaccharide; response surface method; immunomodulatory

多糖(Polysaccharide)主要是将 10 个以上的单糖通过糖苷键有效连接在一起的天然高分子化合物,广泛存在于植物、动物和微生物中,是生物有机体的重要组成部分<sup>[1]</sup>。目前从天然产物中提取的多糖种类很多,最为重要的是植物水溶性多糖,研究表明植物多糖具有抗肿瘤、抗病毒、降血糖以及免疫调节等功效<sup>[2-4]</sup>,早已成为生命科学的研究热点问题,同样也引起了食品科学研究者们的广泛关注。

石榴(*Punica granatum* Linn)属于落叶灌木或小乔木类,主要在亚热带及温带地区广泛种植,在我国南北各地区也均有种植。石榴皮为石榴的干燥果皮,主要含有鞣质、黄酮、有机酸、果胶、生物碱类、糖类等物质<sup>[5,6]</sup>。研究发现,石榴皮还具有抗病毒、抗

菌、抗肿瘤、免疫调节、抗氧化能力、抗炎等作用<sup>[7-10]</sup>。石榴皮多糖(Pomegranate peel polysaccharide, PPP)是从石榴皮中提取出的天然活性成分,有关 PPP 生物活性报道较少,主要包括抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等生理功能<sup>[11]</sup>。

随着生活和工作压力的增大,人们的身体易处于亚健康状态,主要原因是免疫系统受到了破坏,要想改变这种状态,首先应从增强免疫力出发。微波提取是一种现代提取技术,它的原理是根据不同结构的物质在微波场中吸收微能量的差异,而使有效成分被分离出来。与传统的水浸提、酶法辅助提取相比,微波辅助提取具有快速、高效、安全、节能等优点,此外还可以保护活性成分,污染小,被广泛用于植物有效功能成分的提取。本试验用陕西特有的水果副产物石榴皮为原料,通过响应面法探究 PPP 的微波辅助提取最佳工艺参数,并初步探究 PPP 对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用的影响,为石

收稿日期:2017-11-20 接受日期:2018-03-06

基金项目:国家自然科学基金(31301598);中央高校基本科研业务费专项(GK201803086)

\*通信作者 E-mail:zcaiping@snnu.edu.cn

榴皮的综合利用提供参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

石榴皮:市售临潼鲜石榴(陕西师范大学食品工程与营养科学学院朱彩平副教授鉴定为 *Punica granatum* Linn),剥皮,于烘箱中 55 °C 干燥 6 h,粉碎后过 60 目筛备用;无水乙醇:天津市天力化学试剂有限公司;DMEM 不完全培养基:陕西脉元生物科技有限公司;MTT:Sigma 公司;中性红:陕西晶博生物科技有限公司;DMSO:陕西晶博生物科技有限公司

### 1.2 实验仪器

101-1AB 型数显鼓风干燥箱,西安麒麟试验仪器有限公司;DFY-300 型摇摆式高速万能粉碎机,温岭市林大机械有限公司;BS 100 S 型分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;

XH-MC-1 型微波炉辅助反应仪,北京祥鹄科技发展有限公司;SHB-III 型循环水式多用真空泵,开封市宏兴科教仪器厂;N-1100 型旋转蒸发仪,上海爱郎仪器有限公司;ESCO AC2-4S1 型生物超净工作台,新加坡艺思高科技有限公司;ESCO CCL-170B-8 型二氧化碳培养箱;CKX41 型倒置显微镜,奥林巴斯株氏社。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 PPP 提取工艺流程

称取一定质量的石榴皮干粉→按一定比例加入蒸馏水→微波处理→过滤→得上清液,并对滤渣进行二次提取→合并上清液→在 45 °C 真空旋转浓缩→浓缩液→加入 4 倍体积的 85% 乙醇→4 °C 避光保存过夜→抽滤→沉淀→45 °C 干燥至恒重→PPP。

#### 1.3.2 PPP 得率计算

$$R = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: R-PPP 的得率;  $m_1$ -PPP 的质量(g);  $m_2$ -原料的质量(g)。

#### 1.3.3 单因素试验

影响多糖得率的因素主要有液料比、微波提取时间以及微波功率。本试验首先通过改变液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 mL/g)、微波提取时间(4、6、8、10、12 min)和微波功率(140、280、420、560、700 W),分别在保持其他因素不变的条件下进行单因素提取试验,以蒸馏水提取,按照 1.3.1 的方法考察各单因素对 PPP 得率的影响,并计算出得率,优选出最佳的提取工艺参数。

#### 1.3.4 Box-Behnken 试验设计

在单因素试验分析的基础上,采用 Box-Behnken 试验设计,以 PPP 的得率为响应值,选取三因素三水平的响应曲面分析法,优化 PPP 的提取工艺条件。

#### 1.3.5 PPP 对 RAW264.7 巨噬细胞增殖试验的影响

采用 MTT 法测细胞增殖率<sup>[12]</sup>。

#### 1.3.6 PPP 对 RAW264.7 巨噬细胞吞噬试验的影响

采用中性红法测定细胞吞噬活性<sup>[13]</sup>。

#### 1.3.7 PPP 对 RAW264.7 巨噬细胞 NO 释放的影响

采用 Griess 方法测定巨噬细胞 NO 释放量<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.8 RAW264.7 巨噬细胞黏附试验

用不完全培养基、8 μg/mL PPP 溶液分别与悬浮巨噬细胞混合均匀,置于细胞培养皿中培养 1 h 后用倒置显微镜观察不同方式处理的巨噬细胞贴壁情况<sup>[15]</sup>。

#### 1.3.9 数据处理

采用响应面分析处理软件 Design-Expert(version 8.

0.5. Stat-EaseInc, Minneapolis N. USA) 进行分析。

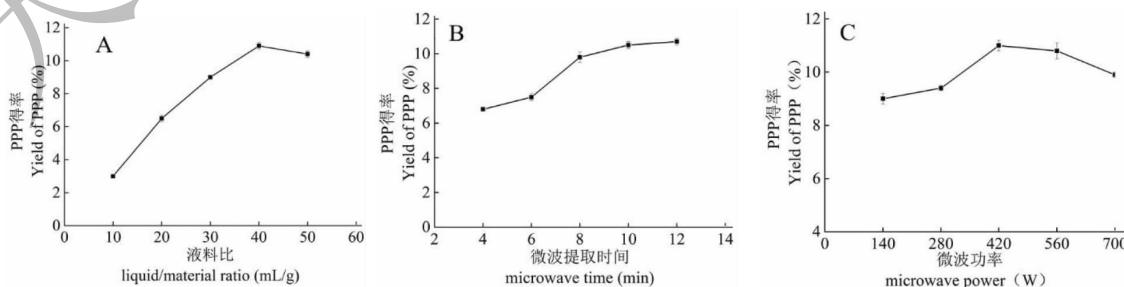


图 1 液料比(A)、微波提取时间(B)、微波功率(C)对 PPP 得率的影响

Fig. 1 Effects of liquid/material ratio(A), microwave time(B) and microwave power(C) on the yield of PPP

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素试验结果

由图 1A 可知,液料比在 10:1~40:1 mL/g 区间变化时,PPP 得率随着液料比的增加而增加。当液料比大于 40:1 mL/g 时,PPP 得率略有下降。这可能是由于液料比较低时,蒸馏水量较少,不足以与石榴皮完全接触,多糖无法彻底溶解在蒸馏水中,所以得率相对较低;而当液料比逐渐增大后,石榴皮可与蒸馏水充分接触,使得多糖可溶解更完全;但是当液料比过大时,导致在浓缩过程中损失较多,从而出现图 1A 中多糖得率有所下降的趋势,故 PPP 提取的液料比最佳为 40:1 mL/g。

图 1B 显示,随着微波提取时间的增加,PPP 得率也随之增大,但当提取时间大于 10 min 时,PPP 得率增幅逐步减缓。这是由于微波处理过程中升温极其迅速,处理时间过短,PPP 还未完全溶出;随着

时间的延长,温度一直较高,分子间的运动加剧,增加提取物的溶解度和扩散系数,从而得率提高。而当处理时间过长时,PPP 的部分糖苷键会断裂而造成多糖损失,同时考虑到节省时间、能耗等因素,故微波处理时间最佳为 10 min。

图 1C 显示,随着微波功率的增大,PPP 得率逐渐增大,在 420 W 时,PPP 得率最高,当微波功率大于 420 W 时,PPP 得率又逐渐降低。这是因为微波功率过大,使得溶液中水分子振动加剧,温度急剧升高,石榴皮内部维管束和腺细胞内部压力超过细胞壁膨胀的能力,细胞内的物质自由流出传递至周围的溶剂中被溶解,导致多糖溶出的多,但同时由于温度一直较高,也会造成多糖部分分解,从而导致得率下降,故微波功率最佳为 420 W。

### 2.2 响应曲面优化实验

#### 2.2.1 试验设计

本试验采用 Box-Behnken 设计的因素水平见表 1。

表 1 响应面分析因素与水平表

Table 1 Factors and levels in three-factor and three-level response surface analysis

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
液料比 Liquid/material ratio (mL/g)	30	40	50
微波提取时间 Microwave time (min)	8	10	12
微波功率 Microwave power (W)	280	420	560

#### 2.2.2 试验结果

根据上述因素水平表,考察料液比 (mL/g)、微波提取时间 (min) 和微波功率 (W) 三因素的交互因素对 PPP 的得率的影响,结果如表 2 所示。

#### 2.2.3 模型的建立及其显著性检验

利用数据处理软件 Design-Expert 对表 2 的试验数据进行多元回归拟合,得到多糖得率 ( $R$ ) 与液料比 ( $X_1$ )、微波提取时间 ( $X_2$ ) 及微波功率 ( $X_3$ ) 三因素之间关系的回归方程为:

$$\begin{aligned} \text{得率 } R = & 10.38 + 0.41 X_1 + 0.52 X_3 \\ & - 0.23 X_1 X_2 - 0.15 X_1 X_3 - 0.10 X_2 X_3 - 0.73 X_1^2 \\ & - 0.23 X_2^2 - 1.15 X_3^2 \end{aligned}$$

模型 Prob > F 值是反应响应面值与各个因素之间的线性关系,由表 3 可知,所选用的二次多项式模型具有高度的显著性 ( $P < 0.01$ ),因此,试验方法是可行的。失拟项是用来说明所用模型与实际实验的拟合程度,  $P = 0.1364 > 0.05$ , 表明失拟项不显著。 $R^2$  为 91.22%, 大于 90%, 说明实际值与模拟

表 2 响应面法实验结果

Table 2 Results of response surface methodology

试验号 No.	水平 Level			PPP 得率 (%)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	-1	1	0	9.0
2	0	0	0	10.8
3	0	1	-1	9.3
4	1	-1	0	10.3
5	0	-1	1	8.9
6	0	-1	-1	8.1
7	0	0	0	10.6
8	-1	0	-1	7.2
9	0	0	0	10.0
10	0	0	0	10.4
11	-1	-1	0	7.9
12	1	0	1	9.5
13	-1	0	1	9.0
14	1	1	0	10.5
15	1	0	-1	8.3
16	0	1	1	9.7
17	0	0	0	10.1

表 3 二次回归模型的方差分析结果

Table 3 Analysis of quadratic regression model from data in Table 2

方差来源 Source	平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F	Prob > F	Significant
模型 Model	16.36	9	1.82	8.08	0.0058	* *
$X_1$	3.78	1	3.78	16.80	0.0046	* *
$X_2$	1.36	1	1.36	6.05	0.0435	*
$X_3$	2.20	1	2.20	9.8	0.0166	*
$X_1 X_2$	0.20	1	0.20	0.90	0.3744	
$X_1 X_3$	0.09	1	0.09	0.40	0.5472	
$X_2 X_3$	0.04	1	0.04	0.18	0.6860	
$X_1^2$	2.23	1	2.23	9.90	0.0162	*
$X_2^2$	0.22	1	0.22	0.97	0.0162	*
$X_3^2$	5.59	1	5.59	24.85	0.0016	* *
残差 Residual	1.58	7	0.23			
失拟项 Lack of fit	1.13	3	0.38	3.36	0.1364	
纯误差 Pure error	0.45	4	0.11			
总和 Cor total	17.94	16				
$R^2$	0.9122					
$R_{\text{Adj}}^2$	0.7992					
变异系数 C. V. %	5.05					

注:  $P < 0.05$  为显著性差异;  $P < 0.01$  为极显著性差异。

Note: Compare with control,  $P < 0.05$  significant difference;  $P < 0.01$  extremely significant difference.

值相差小, 模型拟合性高。由表 3 的 Prob > F 值可以知道, 对 PPP 得率影响大小的顺序为: 液料比 > 微波功率 > 微波提取时间。方程中  $X_1$ 、 $X_3^2$  对 PPP 得率 R 值的影响极显著,  $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$  对 R 值的影

响显著, 这说明各单因素对 PPP 得率的影响不是简单的线性关系, 二次项对得率也有很大的影响, 各交互项作用的影响则较小。

#### 2.2.4 PPP 提取工艺的响应面分析与优化

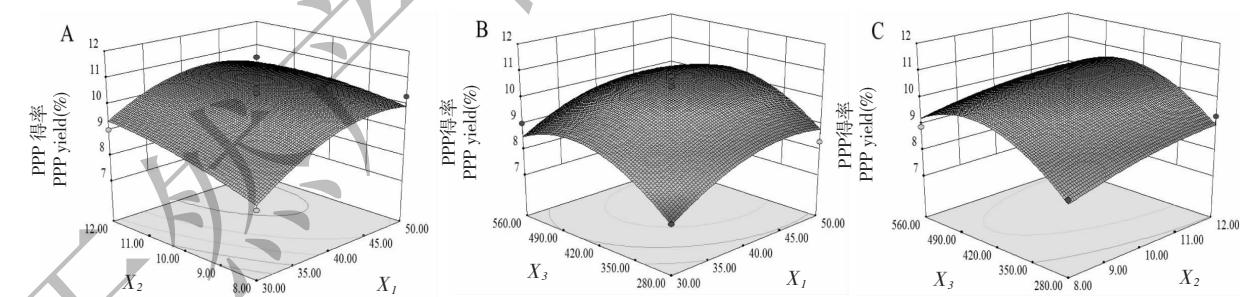


图 2 不同提取因素对 PPP 得率影响的三维图

Fig. 2 Response surface plot for effects of different extraction parameters on the response yield

注:  $X_1$ : 液料比;  $X_2$ : 微波提取时间;  $X_3$ : 微波功率

Note:  $X_1$ : liquid/material ratio;  $X_2$ : microwave time;  $X_3$ : microwave power

当微波功率 420 W 时, 由图 2A 可知, 液料比和微波提取时间的交互作用对 PPP 得率影响不显著 ( $P = 0.3744$ ), 当液料比一定时, 微波处理时间在 8~12 min 的范围内, PPP 的得率随时间的延长而增大; 当微波处理时间一定时, 液料比在 (30: 1 ~ 50: 1)

mL/g 的范围内, 随着液料比的增大, 多糖得率先逐渐增大然后又缓慢降低。从液料比曲面斜率大于微波提取时间斜面斜率可看出, 液料比对 PPP 得率的影响大于微波提取时间对多糖得率的影响, 与上述表 3 中分析结果相符合。

当微波提取时间为 10 min 时,由图 2B 可知,液料比和微波功率的交互作用对 PPP 得率的影响不显著( $P = 0.5472$ ),当微波功率一定时,液料比在(30:1~50:1) mL/g 的范围内,PPP 得率先逐渐升高,然后缓慢降低;当液料比一定时,微波功率在 280~560 W 的范围内,PPP 的得率先不断增加,然后又逐渐下降。从液料比曲面斜率大于微波功率曲面的斜率可看出,液料比对 PPP 得率的影响大于微波功率对多糖得率的影响,与上述表 3 中分析结果相一致。

当液料比为 40:1 mL/g 时,由图 2C 可知,微波功率和微波提取时间的交互作用对 PPP 得率的影响不显著( $P = 0.6860$ ),当微波功率一定时,微波提取时间在 8~10 min 的范围内,PPP 得率逐渐升高;当微波提取时间一定时,微波功率在 280~560 W 的范围内,PPP 得率先逐步升高然后又逐渐下降。从微波功率曲面的斜率大于微波提取时间曲面的斜

率可看出,微波功率对 PPP 得率的影响大于微波提取时间对多糖得率的影响,与上述表 3 中分析结果相吻合。

根据响应面分析的结果,可以进一步模拟出 PPP 的最佳微波辅助提取工艺参数:液料比 44.13:1 mL/g,提取 10.02 min,微波功率 446 W,在此条件下 PPP 得率的理论值为 10.59%。为了检验响应面方法的可行性,同时便于实际操作,将提取工艺参数修正为:44:1 mL/g,提取 10 min,微波功率 450 W。用修正后的提取工艺参数进行 3 次平行验证试验,得到 PPP 的平均得率为  $10.48 \pm 0.06\%$ ,与模拟最优提取工艺条件的理论得率的相对误差不到 1%,属于误差范围,由此可知,利用响应面分析法对 PPP 提取工艺参数进行优化是可行的,理论最佳提取工艺条件可信,最终得到的工艺参数具有实际应用价值。

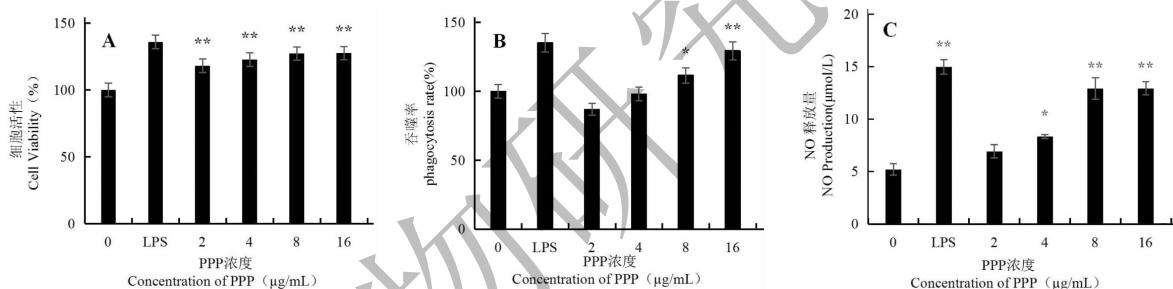


图 3 PPP 对 RAW264.7 巨噬细胞影响(A 是增殖活性、B 是吞噬率、C 是 NO 释放)

Fig. 3 Effect of PPP on RAW264.7 cells (A is proliferation, B is phagocytosis and C is NO production)

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note: Compare with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

## 2.3 细胞实验结果

### 2.3.1 PPP 对巨噬细胞的影响

MTT 法是一种快速检测细胞增殖率及细胞毒性的方法。由图 3A 可知,多糖浓度在 0~16 μg/mL 的范围内,PPP 对巨噬细胞的增殖作用呈现逐渐增大的趋势,并有一定的剂量依赖性。与空白组相比,不同浓度下的 PPP 对细胞的增殖率均有显著提高,但其增殖率均低于阳性对照组。因此可以得出,PPP 对巨噬细胞有一定的免疫调节作用,且无细胞毒作用。

巨噬细胞参与了机体非特异性免疫的第一道屏障,其吞噬功能在免疫调节中起到了至关重要的作用<sup>[16]</sup>。由图 3B 可知,在中性红试验中,PPP 在浓度

为 0~16 μg/mL 范围内对巨噬细胞的吞噬中性红能力是逐渐增强的,与未做处理的空白组相比,其吞噬能力均有所提高,并呈现一定的浓度依赖性。由此可得出,PPP 可增强巨噬细胞的免疫调节活性。

NO 作为重要的信号分子,参与并调节组织中的生理过程,随着 NO 释放量的提高,其吞噬作用也逐步增强,从而提高巨噬细胞的免疫调节作用<sup>[17]</sup>。由图 3C 可以看出,与空白组相比,PPP 溶液在低浓度时 NO 的释放量不显著,但是随着浓度的增大 NO 的释放量显著增加,表明不同浓度的 PPP 对巨噬细胞刺激之后,其 NO 的释放量均有所提高,并具有一定的剂量依赖性,因此可初步得出 PPP 对巨噬细胞具有一定的免疫调节作用。

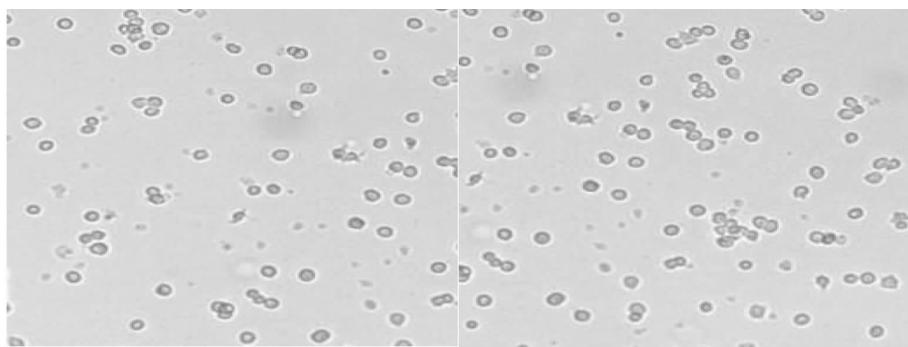


图4 PPP对RAW264.7巨噬细胞贴壁能力的影响(400X,1h)

Fig. 4 Effect of PPP on adhesion of RAW264.7 cells(400X,1h)

注:左图为空白组;右图为8 μg/mL的PPP溶液。

Note: Result of the blank was showed in the left picture, and that of the 8 μg/mL PPP was showed in the right one.

### 2.3.2 RAW264.7巨噬细胞黏附试验

巨噬细胞是一种可以快速迁移的运动细胞,其黏附能力也很强,其可以通过表面的黏附分子与病原体结合而杀死病原菌,达到增强免疫的作用<sup>[13]</sup>。由图4可以得出,PPP可以有效的促进巨噬细胞的贴壁能力,而空白组的在培养1小时后细胞的贴壁量比较稀少,大多数处于悬浮状态。因此可以得出PPP作用于巨噬细胞以后,通过黏附能力也可初步判断其具有一定的免疫调节能力。

## 3 结论

本文采用响应曲面法建立了数学模型,获得PPP的最佳提取工艺参数为液料比44:1 mL/g、微波提取时间10 min、微波功率450 W,在此工艺条件下,PPP的得率为10.48%。采用MTT法、中性红法、测定NO的释放量以及细胞黏附试验可知,PPP对巨噬细胞具有一定的免疫调节能力。本研究提供了一种高效提取PPP的方法,并初步采用体外细胞培养试验探究了PPP的免疫调节活性,但由该方法得到的PPP的分离纯化、结构鉴定以及其体内生物活性还有待进一步的研究。

## 参考文献

- Zeng HL, Zhang Y, Jian YY, et al. Rheological properties, molecular distribution, and microstructure of *fortunella margarita* (Lour.) swingle polysaccharides [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 74:232-242.
- HaoR(郝冉). Signal transduction mechanisms of *Dendrobium huoshanense* polysaccharides activating macrophages [D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2014.
- Wang N(王宁). Study on *Pleurotus* polysaccharide separation purification and antioxidative and antitumor function [D]. Xian: Shaanxi Normal University(陕西师范大学), 2015.
- Talyshinsky MM, Souprun YY, Huleihel MM. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses [J]. *Cancer Cell Int*, 2002, 2(1):8.
- Galaz P, Valdenegro M, Ramírez C, et al. Effect of drumdrying temperature on drying kinetic and polyphenol contents in pomegranate peel [J]. *J Food Eng* 2017, 208:19-27.
- Xi J, He L, Yan LG. Continuous extraction of phenolic compounds from pomegranate peel using high voltage electrical discharge [J]. *Food Chem*, 2017, 174:72-81.
- Deng YL, Li YL, Yang FF, et al. The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells [J]. *Biomed pharmacother*, 2017, 93:976-984.
- Karimi M, Sadeghi R, Kokini J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2017, 69:59-73.
- Stojanovic I, Šavikin K, Dedovic N, et al. Pomegranate peel extract ameliorates autoimmunity in animal models of multiple sclerosis and type 1 diabetes [J]. *J Funct Foods*, 2017, 35:522-530.
- Sun YQ, Tao X, Men XM, et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin [J]. *J Integr Agr*, 2017, 16:1808-1818.
- Zhou XY(周鑫玉). Study on extraction, separation and purification of Polysaccharides from pomegranate peel [D]. Xian: Shaanxi Normal University(陕西师范大学), 2014.
- Zhang JB(章静波), Huang DY(黄东阳), Fang J(方瑾). Experimental technique of cell biology(细胞生物学实验技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006:60-145.

(下转第1077页)