

文章编号:1673-1689(2008)04-0079-06

酿酒酵母 β -葡聚糖超声修饰及其 对小鼠免疫功能的影响

王强¹, 刘晓永¹, 胡永金², 刘红芝¹

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094; 2. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 65020)

摘 要: 利用超声波的空化效应对大粒径酵母 β -葡聚糖(SCG)进行超声修饰, 修饰后的 SCG(C-SCG)呈现分布均匀的单颗粒状, 粒径分布带宽明显变窄, 平均粒径由原来的 56.49 μm 降低到 2.33 μm 。由于粒径的变化会给 SCG 免疫功效带来一定的影响, 故对其免疫功效进行了考察: 与修饰前的 SCG(N-SCG)相比, 修饰后的 SCG 使 Con A 诱导小鼠淋巴细胞转化率提高了 42.35%; 血清 CH_{50} 提高了 28.89%; NK 细胞活性提高了 78.10%, 免疫功效得到显著增强。

关键词: β -葡聚糖; 超声修饰; 免疫活性

中图分类号: Q 31

文献标识码: A

Ultrasonic Modification of the β -Glucans from *Saccharomyces cerevisiae* and It's Effect on the Immunoactivity in Mice

WANG Qiang¹, LIU Xiao-yong¹, HU Yong-jin², LIU Hong-zhi¹

(1. Institute of Agro-Food Science and Technology, The Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China; 2. School of Food Science and Engineering, Yunnan Agricultural University, Kunming 650020, China)

Abstract: The macroparticle β -glucans from *Saccharomyces cerevisiae* (SCG) were modified by ultrasonication in order to get microparticle SCG. After ultrasonical treatment, the equably singal particulates of SCG were homogeneous and it's average diameter reduced from 56.49 μm to 2.33 μm . Because the diameter change of SCG bring some influences to it's immune activity, the immunoactivity of N-SCG and C-SCG were tested. The results showed that, the lymphocyte proliferation, the hemolytic level and the activity of NK cells of C-SCG groups increased 42.35%, 28.89% and 78.10%, respectively, compared to that of N-SCG groups.

Key words: β -glucans; ultrasonic modification; immunoactivity

β -葡聚糖存在于许多细菌、真菌和高等植物中, 它的一个重要来源是酿酒酵母(*Saccharomyces cer-*

visiae)细胞壁^[1]。酵母 β -葡聚糖(β -glucans from *Saccharomyces cerevisiae*, 简称 SCG)位于酵母细

收稿日期: 2007-07-15.

基金项目: 国家科技部国际合作重大项目(2001DFBA0007).

作者简介: 王强(1965-), 男, 山东高密人, 研究员, 博士生导师, 主要从事农产品深加工与功能食品研究, Email: wangqiang365@263.net

胞壁的内层,起到支撑细胞形态的骨架作用,占细胞壁干重的30%~60%。SCG依据连结方式的不同可以分为 β -1,3-葡聚糖和 β -1,6-葡聚糖:长链的 β -1,3-葡聚糖的聚合度约为1500,占总 β -葡聚糖的85%;余下的15%是聚合度约为150的短链 β -1,6-葡聚糖^[2-3]。SCG具有增强免疫、抗肿瘤、抗菌、降血脂、愈合伤口和预防炭疽热等显著医学功效^[4-6],日益引起人们的关注。此外, β -葡聚糖在食品工业中也得到了广泛应用,目前主要用作增稠剂、膳食纤维和脂肪替代品^[7]。

SCG不溶于水,呈聚集状,其直径一般在20~80 μm ^[8],据Tabata等人报道,小粒径的SCG微粒更易与巨噬细胞受体的结合以显著增强巨噬细胞吞噬能力^[9]。基于此,作者首先对聚集状SCG大颗粒进行超声修饰,使其平均粒径降低到小于5 μm 范围内,进而又对其修饰前后SCG的免疫功效进行考察,以判定免疫功效的变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及设备

刀豆素A(Con A),四甲基偶氮唑盐(MTT):英国Sigma公司产品;RPMI-1640培养基:美国GIBCO公司产品;淋巴细胞分离液:上海华美生物工程公司产品;小牛血清(超级):杭州四季青生物工程研究所提供;绵羊红细胞:南京医科大学产品;其余药品均为国产分析纯。

分析天平:TB-214型,美国DENVER公司产品;恒温生化培养箱:HPS-160型,哈尔滨东联电子技术有限公司产品;振荡培养箱:HZQ-F160型,哈尔滨东联电子技术有限公司产品;超净工作台:CJ-1F型,哈尔滨东联电子技术有限公司产品;离心机:LXJ-II B型,上海安亭科学仪器厂产品;高压均质机:GYB-40-10S型,上海东华高压均质机厂产品;超声波破碎仪:JY98-III DN型,宁波新芝生物科技股份有限公司产品;超级数显恒温器:CS501-SP型,重庆四达实验仪器有限公司产品;二氧化碳培养箱:MC0175型,日本SANYO公司产品;酶联免疫检测仪:DNM-9602,北京普朗新技术有限公司产品;倒置相差显微镜:CX41型,日本OLYMPUS公司产品;粒度分析仪:BT-9300H型,丹东市百特仪器有限公司产品;紫外分光光度计:UV-1201型,北京BRAIC公司产品。

1.2 动物与细胞株

昆明种雌性小鼠,4~5周龄,体重18~22 g,由

郑州大学医学院实验动物室提供。健康小鼠被随机分成试验组和对照组,试验组每日灌胃 β -葡聚糖受试物一次,灌胃量分别为50、150、250 mg/(kg·d),正常对照组灌胃150 mg/(kg·d)的生理盐水,持续15 d后进行各项免疫指标测定。

Yac-1小鼠淋巴瘤细胞购自中国医学科学院肿瘤研究所,生长在含体积分数10%小牛血清的RPMI-1640培养液中,在37℃,体积分数5% CO₂,饱和湿度下进行传代培养,细胞周期是2~3 d。

1.3 实验方法

1.3.1 SCG制备 取酵母细胞400 g加2000 mL去离子水过200目不锈钢筛网,再用去离子水离心洗涤3~4遍。洗净的酵母加入去离子水制成质量分数15%,pH 5.0菌悬液,然后在55℃,120 r/min下自溶24 h。自溶后的酵母细胞离心洗涤后用pH 7.5,0.2 mol/L磷酸缓冲液将配制10 g/dL的溶液,在121℃下高温抽提4 h,然后离心洗涤,用去离子水配成质量分数为15%的悬浮液,70 MPa下进行高压均质,经4个循环处理后离心洗涤得到去除甘露糖蛋白的酵母细胞壁,接着按1 g:4 mL的比例以异丙醇为有机溶剂进行回流抽提,脱脂得到SCG粗提物,再用Protamex蛋白酶对其进行酶解,进一步除去残存的甘露糖蛋白,最后得到的不溶物用去离子水洗涤至中性,然后再用无水乙醇和无水乙醚各洗涤2遍,冷冻干燥得SCG^[10]。

1.3.2 SCG超声修饰 SCG加入去离子水配成1.0, 1.5, 2.0, 2.5 g/dL的悬浮液于4℃下静置过夜。取此悬浮液100 mL置于冰浴中,在工作频率18~21 kHz下分别以200, 400, 800 W的功率进行超声修饰,每循环处理时间24 s,间歇时间6 s。

1.3.3 脾脏和胸腺指数测定 眼动脉放血处死小鼠,取胸腺和脾脏,并将周围组织剥离干净后称重,按下式计算免疫脏器指数:

$$\text{胸腺指数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{胸腺质量}(\text{mg})}{\text{体质量}(\text{g})}$$

$$\text{脾脏指数}(\text{mg/g}) = \frac{\text{脾脏质量}(\text{mg})}{\text{体质量}(\text{g})}$$

1.3.4 其他免疫指标测定 Con A诱导的小鼠脾淋巴细胞转化试验(MTT法)见文献^[11];CH₅₀法测定血清总补体活性见参考文献^[12];NK细胞活性的测定见文献^[13]。

2 结果和讨论

2.1 超声功率对SCG修饰效果的影响

在超声修饰多糖的过程中,超声处理功率是主要的影响因素,其对SCG修饰效果影响见图1:处

理前 SCG (N-SCG) 的平均粒径为 $56.29\ \mu\text{m}$, 经过 12 个循环超声处理后, 其粒径变化趋向稳定, 随着超声功率的不同而有所差异。当超声波功率为 200 W 时, 处理后 SCG (C-SCG) 平均粒径降为 $5.51\ \mu\text{m}$, 而超声功率在 400 W 和 800 W 时, C-SCG 的最小粒径分别为 $2.33\ \mu\text{m}$ 和 $2.24\ \mu\text{m}$, 并且随着时间的延长, 平均粒径保持稳定不再呈现进一步下降趋势。

超声波是纵波, 通过对溶液分子的作用, 加速溶液分子在其平衡位置的振动, 形成所谓的低压区 and 高压区。当超声波能量密度足够高时, “空化气泡”就形成了, 声波的稀疏相和压缩相导致气泡生长、收缩、再生长、再收缩, 经多次周期性振荡, 最终以高速度崩裂, 在极短时间和“空化气泡”的极小空间内, 产生 $5.05 \times 10^7\ \text{MPa}$ 的高压^[14]。超声对多糖的修饰正是利用这种空化效应爆破力, 将聚集在一起的 SCG 打散成较小的微粒。空化产生爆破力的大小与超声功率在一定的范围内成正比关系, 随着功率的增大, 爆破力增大使聚集较为紧密的 SCG 进一步解聚。但是随着超声时间的延长, SCG 的粒径趋向一稳定值, 这是由于当聚集的 SCG 被打散成单个 SCG 微粒后, 破碎后小微粒的运动速度较快, 微粒之间相互碰撞的几率增大, 同时由于微粒表面对分散液的极化作用, 增强了颗粒之间的作用力, 从而使得小微粒易于发生团聚形成 SCG 大微粒, 然后大微粒又被破碎成小微粒而形成破碎-聚集-破碎的循环, 使 SCG 微粒的最终平均粒径保持稳定^[15]。根据实验结果, 由于超声功率在 400 W 和 800 W 处理时, SCG 的平均粒径近似, 后期试验中均采用 400 W 处理 12 个循环。

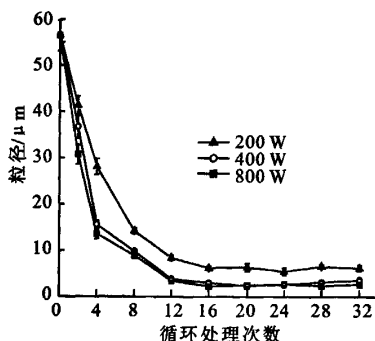


图1 超声功率对 SCG 修饰效果的影响

Fig. 1 Effect of ultrasonic power on SCG

2.2 样品质量浓度对 SCG 修饰效果的影响

样品质量浓度也会对超声修饰的效果带来一

定的影响, 如图 2 所示: SCG 以 1.0、1.5、2.0、2.5 g/dL 质量浓度在 400 W 的功率下进行超声处理, 质量浓度在 1.0、1.5 g/dL 时, 经过 12 次循环处理后, 粒径由处理前的 $56.29\ \mu\text{m}$ 降到 $2.87\ \mu\text{m}$ 和 $3.26\ \mu\text{m}$; 质量浓度在 2.0 g/dL 时, 需要 20 次循环处理粒径才降到 $3.23\ \mu\text{m}$; 随着浓度升高到 2.5 g/dL 时, 处理 32 次循环, 粒径也仅降到 $3.88\ \mu\text{m}$ 。这可能是随浓度升高, 黏度也随之增大, 在超声处理中空化产生的爆破力需要克服一定的黏度阻力, 故随浓度升高, 超声修饰的效果反而下降^[15]。在以后超声处理中, 样品浓度确定为 1.5 g/dL。

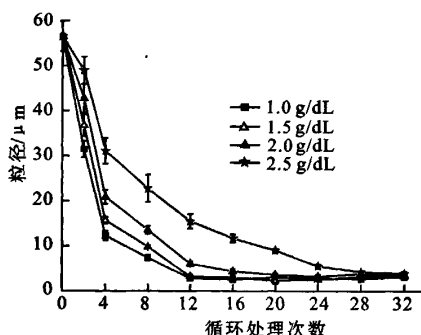
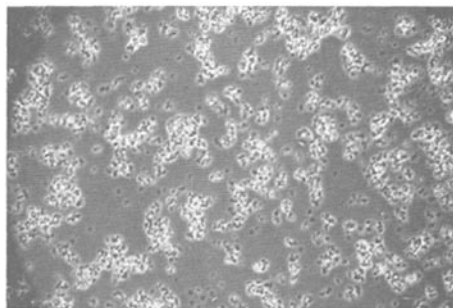


图2 样品质量浓度对 SCG 修饰效果的影响

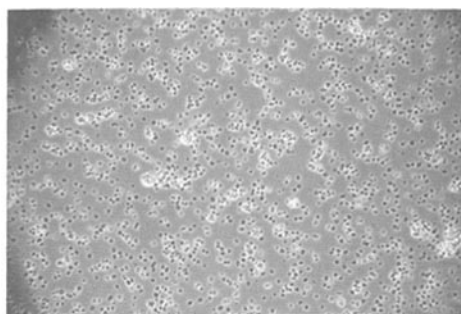
Fig. 2 Effect of sample concentration on SCG

2.3 修饰前后 SCG 粒度分析

对超声处理前后的 SCG 平均粒度进行对比分析发现: N-SCG 的中位径: $56.49\ \mu\text{m}$, 体积平均径: $67.30\ \mu\text{m}$, 面积平均径: $31.13\ \mu\text{m}$; 处理后 C-SCG 的中位径: $2.33\ \mu\text{m}$, 体积平均径: $2.56\ \mu\text{m}$, 面积平均径: $2.07\ \mu\text{m}$ 。中位径、体积平均径和面积平均径均有明显的大幅度下降, 超声修饰的效果显著。为了对修饰效果进一步考察并有一直观了解, 又对超声处理前后的 SCG 进行了显微镜观察(见图 3): 未处理的葡聚糖多是聚集粘连在一起形成较大颗粒状, 处理后 SCG 分散成单颗粒状且分布较为均匀。



(a)



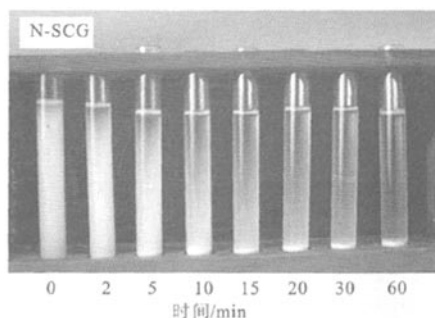
(b)

图 3 超声处理前后 SCG 显微相片(×400)

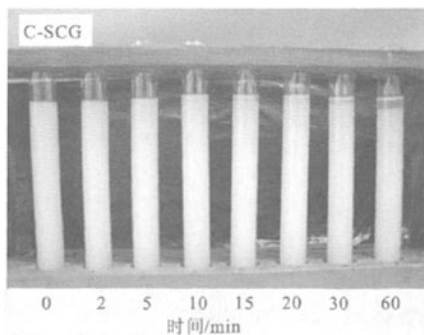
Fig. 3 Micrograph of unmodified and modified SCG (×400)

2.4 修饰前后酵母 β -D-葡聚糖沉降速率变化

一般来讲,微粒粒径的变化会影响到其沉降速率,在此对未经超声处理的和超声处理的 SCG 悬浮液(1 g/dL)的沉降速率进行了对比,如图 4 所示。静置 60 min 后,C-SCG 悬浮液只是出现轻微的分层,而 N-SCG 悬浮液中的 SCG 微粒全部沉降到试管的底部。这样看来,C-SCG 更易于凝胶态的形成,对其在肉类产品中的添加应用以及用于人工皮肤的制造上,提供了一种良好改良途径。



(a)



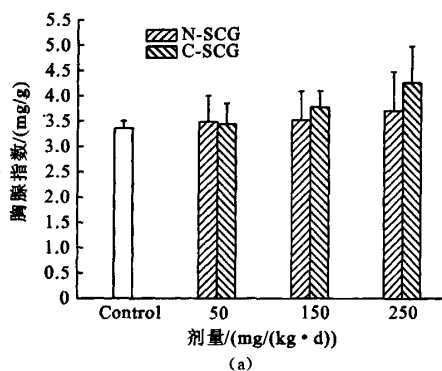
(b)

图 4 超声处理前后 SCG 沉降状况变化

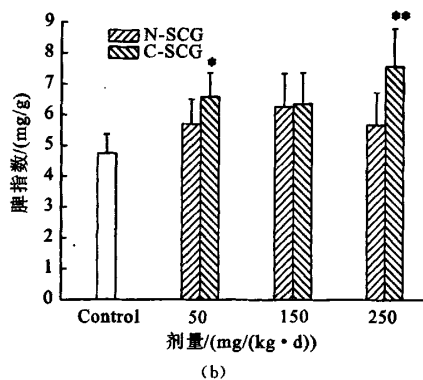
Fig. 4 The sedimentation of ultrasonic treated and untreated SCG

2.5 修饰前后 SCG 对小鼠免疫功效的影响

2.5.1 对脏器指数的影响 脾脏与胸腺是体内的重要免疫器官,是免疫活性细胞受抗原刺激后增殖分化的场所,脾脏与胸腺的重量及其功能对巨噬细胞的吞噬功能、细胞免疫和体液免疫等免疫功能具有广泛而深远的影响,一般来讲,免疫力低下的动物个体,其免疫器官的重量往往会低于健康个体。修饰前后 SCG 对小鼠脏器影响见图 5;N-SCG 对小鼠脾指数和胸腺指数与对照组相比没有显著差异($P < 0.05$);C-SCG 对小鼠脾指数的增加有明显的促进作用,与对照组相比,中剂量组(150 mg/(kg·d))差异显著($P < 0.05$)而高剂量组(250 mg/kg·d)的差异为极显著($P < 0.01$),但是对小鼠胸腺指数的影响同样无显著差异。



(a)



(b)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 和对照组相比。

图 5 超声修饰前后 SCG 对小鼠脏器指数的影响

Fig. 5 Effect of unmodified and modified SCG by ultrasonic on the index of immune organs in normal mice($n=6, \bar{x} \pm s$)

2.5.2 对 Con A 诱导淋巴细增值的影响 测定淋巴细胞体外增殖反应是检测淋巴细胞功能的常用方法,试验结果见表 1,其中 N-SCG 的 150 mg/(kg·d)中等剂量组和 C-SCG 的 150 mg/(kg·d)、250 mg/(kg·d)剂量组与对照组相比,差异均具有极显

著性,这说明它们与 ConA 具有协同诱导作用,对小鼠淋巴细胞转化起到上调功效。给药剂量的不同对由 ConA 诱导的 T 细胞的增殖程度有所差异,这说明可能存在着双向的 T 细胞介导的免疫反应。但是,处理后小粒径 SCG 对 Con A 诱导小鼠淋巴细胞增殖率是未经处理大粒径 SCG 的 1.42 倍,由此看来超声处理可以明显增强 SCG 对 Con A 诱导小鼠淋巴细胞增殖率的提高。

表 1 超声修饰前后 SCG 对小鼠脾淋巴细胞增殖作用的影响
Tab.1 Effect of unmodified and modified SCG by ultrasonic on the lymphocyte proliferation of mouse spleen ($n=6, \bar{x} \pm s$)

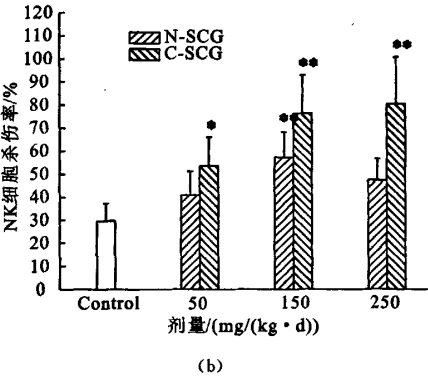
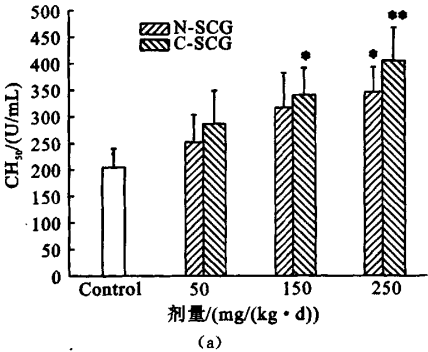
组别	剂量/ (mg/ (kg · d))	OD 值		
		加 ConA	未加 ConA	差值
N-SCG	50	0.460 ± 0.106	0.310 ± 0.080	0.150 ± 0.055
	150	0.648 ± 0.082	0.393 ± 0.097	0.255 ± 0.039**
	250	0.575 ± 0.101	0.418 ± 0.102	0.158 ± 0.055
C-SCG	50	0.495 ± 0.051	0.330 ± 0.064	0.165 ± 0.027
	150	0.623 ± 0.054	0.353 ± 0.056	0.270 ± 0.058**
	250	0.790 ± 0.073	0.428 ± 0.064	0.363 ± 0.033**
对照	150	0.310 ± 0.055	0.208 ± 0.048	0.103 ± 0.019

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 和对照组相比。

2.5.3 对血清 CH_{50} 和 NK 细胞活性的影响 溶血素是小鼠 B 淋巴细胞产生的特异性抗体,当 B 淋巴细胞受抗原绵羊红细胞(SBRC)刺激后,分化成浆细胞并产生抗体(溶血素),当再次接受同一抗原时,溶血素与抗原作用,在补体的参与下使 SRBC 溶血,以清除抗原对机体的有害作用,因此血清总补体活性(CH_{50} 值)能够反映体液免疫功能状况。实验结果见图 6(a),与对照组相比,处理前后的 SCG 均可增强小鼠血清中总补体溶血活性,并呈剂量依赖性,在 0~250 mg/(kg · d) 剂量范围内与 SCG 喂养量呈现正相关性。处理后 250 mg/(kg · d)剂量的 C-SCG 对小鼠血清总补体活性有极显著性促进作用($P<0.01$),比同等剂量的 N-SCG 对小鼠血清总补体活性的增长率提高了 28.89%。

NK 细胞存在于人或动物外周血、脾脏、淋巴结和骨髓中,能杀伤某些肿瘤细胞、病毒感染靶细胞,无需抗原或有丝分裂原刺激,亦不依赖抗体和补体,在机体杀伤肿瘤、防御感染及免疫调节中发挥

重要作用,NK 细胞的活性与机体抗肿瘤能力关系密切,是机体非特异性防御机能的重要组成部分之一。在考察 NK 细胞活性试验中,N-SCG 在 150 mg/(kg · d)中等剂量时对小鼠 NK 细胞活性相对于对照组提高了 93.34%,具有极显著性差异($P<0.01$);C-SCG 在 150 mg/(kg · d)和 250 mg/(kg · d)两个剂量与对照组比较差异也均具有极显著性($P<0.01$),其中 C-SCG 较 N-SCG 来看,小鼠 NK 细胞活性提高了 78.10%,结果见图 6(b)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 和对照组相比。

图 6 超声修饰前后 SCG 对血清 CH_{50} 和 NK 细胞活性的影响

Fig.6 Effect of unmodified and modified SCG by ultrasonic on hemolytic level and the activity of NK cells of mouse spleen ($n=6, \bar{x} \pm s$)

3 结 语

- 1) 在工作频率 18~21 kHz 下以 400 W 的功率对 SCG 进行超声处理,每循环处理时间 24 s,间歇时间 6 s,共 20 个循环,SCG 的平均粒径由起始的 56.49 μm 变为 2.33 μm ,超声修饰效果显著;
- 2) 通过对超声修饰前后的 SCG 对小鼠免疫功能调节促进作用的考察发现:SCG 粒径的变化对小鼠脏器并无太大影响,但 C-SCG 相比 N-SCG,Con

A 诱导小鼠淋巴细胞增殖率提高了 42.35%；小鼠血清总补体活性提高了 28.89%；小鼠 NK 细胞活性提高了 78.10%；这表明 C-SCG 较 N-SCG 更能够显著增强小鼠的免疫功能。

参考文献(References):

- [1] Baets S D, Vandamme E J, Steinbüchel A. Polysaccharides[M]. Betreiber: Wiley-VCH Verlag Press, 2002.
- [2] Manners D J, Masson A J, Patterson J C. Structure of a β -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls[J]. *Biochemical Journal*, 1973, 135(1):19-30.
- [3] Klis F, Mol P, Hellingwerf K, et al. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26:239-256.
- [4] Gordon D B, Siamon G. Fungal β -glucans and mammalian immunity[J]. *Immunity*, 2003, 19:311-315.
- [5] Jamas S, Easson J, Davidson D, et al. Use of aqueous soluble glucan preparation to stimulate platelet production; US, 5,532, 223[P]. 1996.
- [6] Peter J R, Bren E L, Luke A B, et al. Pharmacokinetics of fungal (1 - 3)- β -D-glucans following intravenous administration in rats[J]. *International Immunopharmacology*, 2004(4):1209-1215.
- [7] Konuklar G, Inglett G, Carriere C J, et al. Use of a β -glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheese: manufacture, composition, yield and microstructure[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2004, 39:109-119.
- [8] Hunter K W, Gault R A, Berner M D. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 35:267-271.
- [9] Tabata Y, Ikada Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophages[J]. *Biomaterials*, 1988(9):356-362.
- [10] Xiao-Yong Liu, Qiang Wang, Steve W Cui, et al. A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces Cerevisiae*[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22:239-247.
- [11] 田刚, 陈代文, 余冰, 等. 酶解鸡蛋清寡肽混合物对小鼠体外免疫功能的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, 24(6): 53-59.
TIAN Gang, CHEN Dai-wen, YU Bing, et al. Effects of mixtures of oligopeptides from enzymic hydrolysates of egg white on immune functions of mice in vitro[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005, 24(6):53-59. (in Chinese).
- [12] 雷林生, 孙莉莎, 杨淑琴. 有限稀释微量溶血法测定小鼠血清溶血素的活性[J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(3):274-276.
LEI Lin-sheng, SUN Li-sha, YANG Shu-qin. Determination of mouse serum hemolysin by limited dilution combined with micro hemolysis[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 1999, 15(3):274-276. (in Chinese)
- [13] 何金生, 李瑞珠, 宗庭益. MTT 还原法检测 NK 细胞活性的方法学研究[J]. *中国免疫学杂志*, 1996, 12:356-358.
He Jin-sheng, Li Rui-zhu, Zong Ting-yi. Investigation of NK cell activity measurement MTT[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 1996, 12:356-358. (in Chinese)
- [14] Suslick K S. Ultrasound, Its Chemical, Physical, and Biological Effects [M]. New York: VCH Publishers, 1988. 132-133.
- [15] 郑波, 何得昌. 窄分布纳米级 HMX 的制备及粒度分析[J]. *固体火箭技术*, 2003, 26(4):58-59.
ZHENG Bo, HE De-chang. Preparation and particle size analysis of narrow distributed nano-scale HMX [J]. *Journal of Solid Rocket Technology*, 2003, 26(4):58-59. (in Chinese)

(责任编辑:朱明)