

# 洋葱源黄酮类化合物对中肋骨条藻的抑制能力作用研究

刘雨田 林艳芳 (通讯作者)

(香港理工大学生物医学工程系 香港 999077)

**【摘要】**目的: 本文会采用紫皮洋葱中提取所得的黄酮类化合物对南海地区和澳门近海较常出现的中肋骨条藻的进行抑制实验, 及分析最佳的抑制浓度。方法: (1) 利用 F/2+Si 培养基对中肋骨条藻进行培养, 并利用形态学进行鉴定。(2) 通过乙醇法提取及聚酰胺树脂法提纯洋葱中黄酮类化合物。3. 标准曲线分别测定 5 ug/mL、10 ug/mL 和 15 ug/mL 黄酮类化合物对中肋骨条藻的最佳抑制浓度。结果: 用洋葱外表皮提取黄酮类化合物可以达到 1.05 ug/g 的提取率, 使用 15 ug/mL 的提取液浓度对中肋骨条藻的生长进行干预可达到 71% 的抑制率。结论: 15 ug/mL 洋葱源黄酮类化合物可以有效抑制中肋骨条藻的生长。

**【关键词】** 赤潮; 中肋骨条藻; 洋葱; 黄酮类化合物

## 引言

根据文献记载, 进入 21 世纪后, 南海、东海、渤海赤潮爆发的情况一直维持在高位, 严重影响沿海生态环境, 造成大量鱼类及生物死亡, 以及对水产养殖业的破坏, 引致巨额的经济损失, 现时, 主要用于抑制赤潮的方法有物理法、化学法、生物法等, 但现有方法都各自存有不同缺点<sup>[1-2]</sup>。而洋葱中黄酮类化合物具有一定的抑制细菌和个别淡水藻的能力<sup>[3-4]</sup>, 但鲜有对海藻进行抑制能力的研究, 且黄酮类化合物作为一类由植物生成的天然活性物质, 具有易降解, 生态安全性好等特点。因此本次研究采用洋葱中的黄酮类化合物作为抑制剂, 作用于赤潮中主要的优势藻中肋骨条藻进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验所用的中肋骨条藻均从南海地区赤潮中获得。澳门紫皮洋葱从市场中购买。

### 1.2 试剂

F/2 培养基购买自美国 Gibco 公司; 聚酰胺树脂 (货号: 68410-23-1) 购自上海奥克化学有限公司。PBS 缓冲液购自以色列 BI 公司; 青链霉素混合液 (货号: P1400) 购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.3 主要实验仪器

细胞培养箱、超净台工作台、-80 °C 冰箱 (美国赛默飞世尔科技有限公司)、光学倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)、4 °C 冰箱 (中国海尔集团公司)。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 中肋骨条藻的培养条件

将中肋骨条藻接种至 F/2 培养基后, 将培养基放置在不透光的暗箱中, 将温度调整至 20-25 °C, 盐度

调整 25-30, pH 调整为 8.0, 设定 12 h 光照 12 h 黑暗进行培养。

#### 1.4.2 中肋骨条藻的鉴定方法

在显微镜下使用 40 倍物镜 10 倍物镜对标准藻株进行鉴定, 观察细胞状态为透镜形或圆柱形, 直径为 6~22 μm, 刺的多寡约 8~30 条, 色素数目约 1~10 个, 增大孢子为形状圆, 孢子大小约为母细胞的直径 2~3 倍, 则判定为中肋骨条藻。

#### 1.4.3 洋葱黄酮类化合物的分离提取和提纯

##### (1) 提取

选取澳门紫皮洋葱, 用干净小刀切割并称取 30 g 洋葱肉或皮。用研磨棒在研磨皿中充分捣碎, 然后放入 1 L 锥形瓶中, 加入 540 mL 的 50% 酒精。放置在 77 °C 水浴箱中浸泡 2.5 h 供试液备用。

##### (2) 提纯

使用聚酰胺树脂纯化法提纯, 聚酰胺树脂纯化法是利用树脂中的酰胺基与黄酮类化合物中的羟基通过氢键结合, 通过洗脱剂洗脱达到分离纯化的目的。具体步骤如下:

用 95% 的乙醇浸泡 20 mL 聚酰胺树脂 24 h, 用蒸馏水洗至无酒精味, 再用 4% NaOH 浸泡 24 h, 过滤上层碱液后, 用蒸馏水洗至中性, 用 4% 柠檬酸浸泡 24 h, 最后用蒸馏水洗至中性备用。将备用的洋葱提取液用滤纸过滤两遍去掉大体积杂质。将过滤后的洋葱提取液加入聚酰胺树脂柱中, 静置 1 h 后, 让提取液缓慢流出。用蒸馏水过柱清洗杂质。用 75% 酒精将黄酮类化合物从聚酰胺树脂中洗脱出来。得到洋葱的黄酮提取液。

##### (3) 提取液的处理

首先将洋葱的黄酮提取液于水浴箱中 75 °C 加热

挥发酒精至烧杯中逐渐出现浑浊的析出物。将其装入冷冻干燥机的专用试剂瓶中于  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰冻 24 h。将冰冻好的样本放入冷冻干燥机中脱水至粉状。将干燥后的样本用 0.1 % DMSO 将其从瓶中冲出后用 0.1% DMSO 配平至 10 mL 备用。

#### 1.4.4 洋葱黄酮类化合物定量分析

##### (1) 标准曲线的制定

精密称取干燥至恒重的槲皮素对照品适量，用无水乙醇配制成  $54\text{ }\mu\text{g/mL}$  的溶液。精密吸取该溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 置 25 mL 量瓶中，精密加 5 % 三氯化铝液 8.0 mL，加无水乙醇稀释至刻度。同法另以空白作对照，放置 10 min，在 431 nm 处测定吸亮度值。以质量浓度为横坐标，吸亮度为纵坐标，绘制标准曲线，经线性回归得回归方程，得到其线性关系良好的区间。

##### (2) 提取物中总黄酮的测定

取 0.5 mL 提取液，加入 9.5 mL 0.1% DMSO 进行 20 倍稀释，然后精密吸取稀释 8 mL 于 25 mL 容量瓶，精密加入 5% 三氯化铝乙醇溶液 8 mL，再加无水乙醇至刻度。在 431 nm 处测定吸亮度值，根据标准曲线计算总黄酮。

#### 1.4.5 抑藻率试验

##### (1) 生长曲线的制定

在接收到中肋骨条藻的标准株并镜检鉴定无误后，用血球计数板计数原始浓度，然后取摇匀后的 1 mL 原始藻液加入 49 mL F/2 培养基中并连续观察 7 天得到生长曲线图。

##### (2) 抑藻率的测定

根据提取出的黄酮浓度，设置  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ， $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ， $15\text{ }\mu\text{g/mL}$  共三个实验组和空白对照。在 5000 lx 光照强度，12 小时光照，12 小时黑暗的室温条件下培养 7-9 天，根据生长曲线定时在镜下利用血球计数板的四个大方格观察计数藻类细胞，取平均值记录，绘制不同条件下的生长曲线并计算抑制率 (IR%)。

$$\text{IR}\% = (\text{对照组藻密度} - \text{实验组藻密度}) / \text{对照组藻密度} \times 100\%$$

#### 1.4.6 质量控制

##### (1) 回收试验

本次研究采用的回收方法如下：称取适量槲皮素并稀释至得到的结果浓度，然后将稀释液重复。然后根据两次实验的抑藻率，计算洋葱抑藻率 / 槲皮素抑藻率，得到实验的回收率。

##### (2) 抑藻率的质量控制

在抑藻试验试验时，是用血球计数板进行藻类计

数，每个组别计数两次取平均值，同时设置空白对照组以排除人为操作形成的误差。

#### (3) 分光亮度计的质量控制

在制定标准曲线和测定洋葱提取液黄酮类化合物含量过程中，加一个组空白对照组，以检视测量的准确度以及分光亮度计是否处于正常状态等。

#### 1.5 数据分析

采用 EXCEL 软件进行分析，每组数据重复 3 次，组间比较采用两独立样本 t 检验，不服从正态分布的组间比较采用非参数检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生长曲线与标准曲线

取摇匀后的 1 mL 原始藻液加入 49 mL F/2+Si 培养基中得到初始浓度为  $1.63 \times 10^7$  的藻液并连续观察 7 天得到的生长曲线如下图，根据拐点在后续实验中分别选取天数 1.3.5.7 天进行观察。结果如图 1 所示。根据实验步骤得出槲皮素标准品在 431nm 的标准曲线为  $y = 0.0596x + 0.1142$ ， $R^2 = 0.9909$ ，所得到的标准曲线可信度较高，结果如图 2 所示。

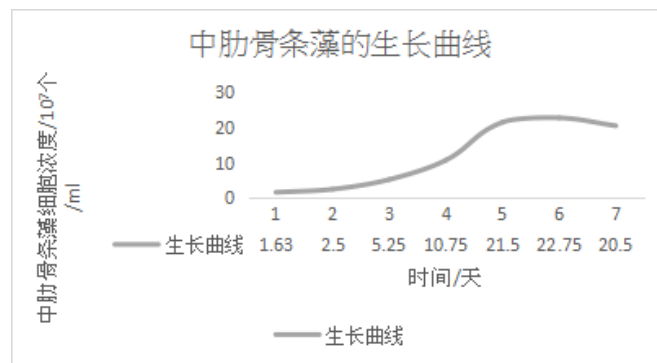


图 1: 中肋骨条藻的生长曲线

### 2.2 洋葱提取率

从洋葱肉质部分所提取的吸亮度为 0.4157，黄酮类化合物浓度为  $3161.7\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，从洋葱表皮所提取的吸亮度为 0.1561，黄酮类化合物浓度为  $439\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。根据资料可以说明，洋葱源黄酮类化合物在洋葱外表皮的含量远高于肉质，因此洋葱表皮作为常见的厨余垃圾，有较高的回收前景，可以利用废弃的洋葱表皮作为黄酮类化合物的提取原料，所以后续试验也采用洋葱皮提取的黄酮类化合物作为实验对象。

### 2.3 洋葱提取物抑藻试验

从图 3 中可以看出，所有资料曲线均表现出先上升后下降的趋势，符合生物群落生长的基本特点，下降是因为培养基中营养物质消耗殆尽以及生物竞争的关系所导致。

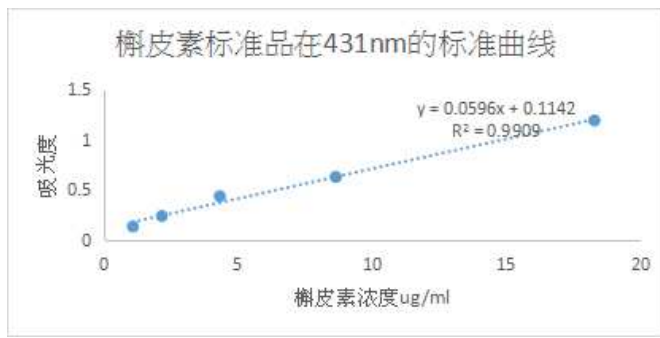


图 2: 槲皮素标准品在 431 nm 的标准曲线

表 1: 洋葱不同部位的黄酮化合物浓度

| 取材部位 | 吸亮度    | 黄酮类化合物浓度     |
|------|--------|--------------|
| 肉质   | 0.1561 | 439 ug/mL    |
| 表皮   | 0.4157 | 3161.7 ug/mL |

根据资料可以发现 5 ug/mL 提取液浓度的实验组和对对照组的资料几乎没有差别, 说明 1 % 提取液浓度几乎没有抑制作用。

10 ug/mL 提取液浓度有一定的抑制作用, 而且在峰值可达到 40 % 的抑制率, 其在后续的资料中藻浓度高于对照组可能是因为抑制作用导致营养物质并未消耗完全和且生物竞争关系不如高浓度藻类剧烈, 所以最后 10 ug/mL 提取液浓度的实验组会达到最高藻浓度。

15 ug/mL 的提取液浓度有明显的抑制作用。首先, 其他实验组均在第五天达到最高藻类浓度, 而本组在第七天才达到峰值, 说明其抑制作用会导致藻细胞的对数生长期延迟, 且在最高峰时能达到 71 % 的抑制率。

为了验证猜想, 选取更高浓度的黄酮化合物提取物进行试验。根据资料得知, 高浓度洋葱提取液的抑藻率仍会缓慢提升, 且普遍呈现出对数生长期后移的现象。在 20 ug/mL 和 25 ug/mL 条件下, 提取液浓度每增加 5 ug/mL, 抑藻率提高只 10 % 和 14%, 抑制率随提取液浓度增长提升较慢, 而 15 ug/mL 条件下相比于 10 ug/mL 抑藻率提高了 31 %, 因此 15 % 为最佳抑藻浓度, 其抑制率为 71 %。

#### 2.4 资料分析与回收率试验

为了验证提取液浓度与中肋骨条藻的生长情况的关系, 选取各个浓度下的藻浓度峰值进行 SPSS 分析, 得到如下资料:

对模型进行检验时证明了洋葱提取液浓度一定会对藻浓度峰值产生影响关系 ( $P < 0.05$ )。

洋葱提取液浓度的回归系数值为 -1112.500 ( $t = -17.128, P < 0.05$ ), 意味着洋葱提取液浓度会对藻浓度峰值产生显著的负向影响关系, 总结分析可知: 洋

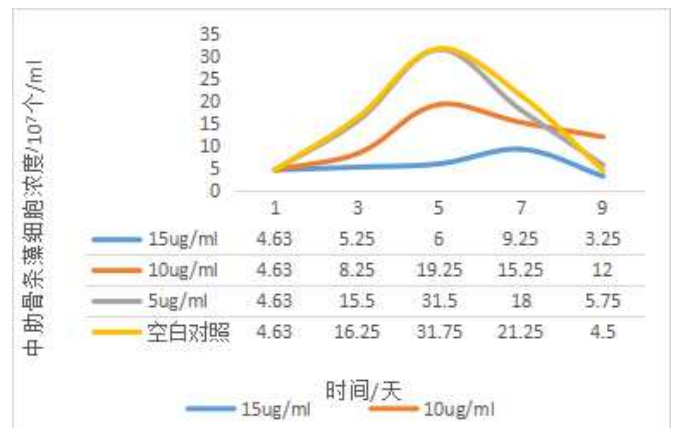


图 3: 洋葱提取物对中肋骨条藻生长的作用

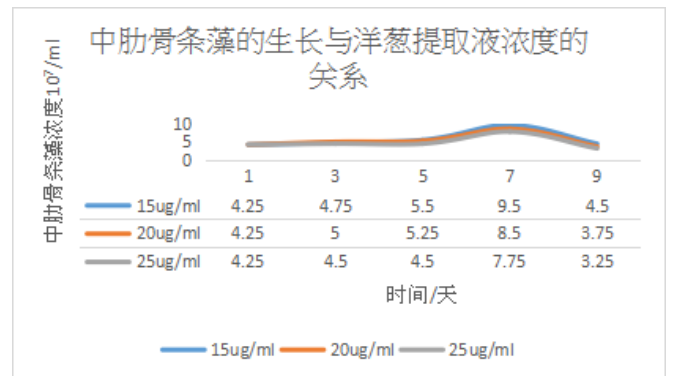


图 4: 高浓度洋葱提取液对中肋骨条藻生长的作用

葱提取液浓度全部均会对藻浓度峰值产生显著的负向影响关系。

为了验证提取液中影响藻类生长的为黄酮类化合物, 用 15ug/mL 的槲皮素标准品进行回收率试验, 资料结果如下:

回收率 =  $9.25 / 10.25 = 90.2\%$  处于可接受范围内 ( $100\% \pm 10\%$ ), 产生这种差异的原因可能是由于洋葱提取液中的黄酮提取物为多种黄酮类化合物的混合物, 这些混合物在一起时产生协同作用, 增强了对中肋骨条藻的抑制作用, 同时也说明利用洋葱提取液作为抑藻剂有较大的研究和应用价值。

### 3 讨论

中肋骨条藻隶属于温带、热带海洋硅藻类。其分布北至北至, 南至赤道, 同时也在不同盐度的地区广泛分布。中肋骨条藻已经成为了我国较为常见的赤潮物种, 同时属于优势物种, 从 1933 年至 2009 年, 我国对中肋骨条藻的观察记录已经超过 100 条之多。从 21 世纪开始, 中肋骨条藻的出现率逐年上升。特别是在 2005 年时, 其出现范围已经达到了惊人的 7600 km<sup>2</sup>。2006 和 2007 年是中肋骨条藻出现的频率最多的两年, 已经达到了 22 次<sup>[5]</sup>。而在 2016-2019 澳门市政署泳滩水质报告中, 均为检出率最高的藻类<sup>[6]</sup>。

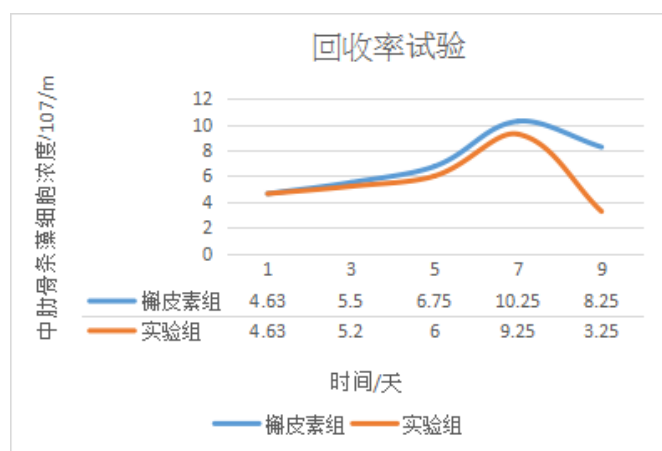


图 5: 回收率试验

中肋骨条藻不产生毒素,但增殖速度快,每天细胞可以分裂6次,中肋骨条藻的繁殖过程中需要大量氧气的参与,进而会导致海洋生态环境的改变,并威胁到其他海洋生物正常氧需求,而且可以与养殖海带和紫菜争夺营养,损伤鱼类鳃部,给水产养殖业带来巨大的经济损失,此外,中肋骨条藻可在细胞体内合成二甲氨基磺基丙酸(Dimethylsulfoniopropionate, DMSPP)并将其释放至大气中,引起大气环境的改变,甚至可以改变雨水中的pH值。中肋骨条藻的大量繁殖是产生酸雨的重要因素之一<sup>[7]</sup>。

洋葱属百合科葱属草本植物。洋葱营养价值丰富,据分析,洋葱含有含硫化合物、甾体皂苷、黄酮类化合物和多糖等活性物质<sup>[8]</sup>。洋葱的致泪成分是环蒜氨酸,洋葱内所含的S-丙烯基L-半胱氨酸硫化物是环蒜氨酸的前体,在碱性条件下,可环合成环蒜氨酸<sup>[9]</sup>。

根据现有文献可以发现,黄酮类化合物普遍具有抗海藻的能力<sup>[10]</sup>,当黄酮类化合物作用于淡水藻类时,其作用机制是通过抑制叶绿素 $\alpha$ 的合成来影响其光合作用,并最终只要使用11.86 mg/L的黄酮类化合物作用于淡水藻培养7天的条件下可以达到73.20%的抑制率<sup>[11]</sup>。也有文献指出,黄酮类化合物对于海藻的抑制作用与其抑菌机制相同,都与其自氧化的特点相关<sup>[12]</sup>。但对于一些特殊的无细胞壁的海藻,也可以直接穿过细胞膜,抑制ATP合成酶的活性,从而达到更高的抑制作用<sup>[13]</sup>。因此本文主要研究了不同浓度的洋葱的黄酮类化合物含量及在不同浓度的黄酮类化合物对中肋骨条藻的抑制率。洋葱外表皮提取黄酮类化合物的提取效率远高于洋葱肉质,提取率为肉质的7.2倍,因此回收餐厨废物的洋葱外表皮作为提取来源有较高的回收利用价值。根据资料分析,洋葱源黄酮类化合物对中肋骨条藻有明显的抑制作用,利用乙醇提取和聚酰胺树脂提纯的黄酮类化合物在15  $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下

能达到71%的抑制率,为最佳抑藻浓度,对于研究防治赤潮的发生有重要意义。

#### 参考文献:

[1] 杨安强.多重环境因子变化对赤潮异弯藻生长的影响[D].华东师范大学,2021.

[2] 高前程,黄力行,徐炜,陈逍遥,顾海峰,骆祝华.细菌对引发赤潮相关藻类的杀藻作用研究综述[J].渔业研究,2021,43(04):426-435.

[3] 白静,王会.洋葱中黄酮类化合物的提取方法研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(04):945-948.

[4] 方草.洋葱中黄酮类化合物对结核分支杆菌的抑菌作用研究[J].河北医药,2018,40(20):3045-3048+3053.

[5] 陈楠生,张梦佳.2021.中国海洋浮游植物和赤潮物种的生物多样性研究进展(三):南海.海洋与湖沼,52(2):385-401.

[6] 市政署.2018年度澳门泳滩水质检测报告:19-21.

[7] 陈楠生,张梦佳.2021.中国海洋浮游植物和赤潮物种的生物多样性研究进展(三):南海.海洋与湖沼,52(2):385-401.

[8] 王文亮,王世清,李晓玲,弓志青,陈相艳."洋葱的活性成分药理功效及产品开发综述."中国食物与营养19.11(2013):37-39.

[9] 刘良科;赵丽娟.洋葱生物活性物质的研究进展.怀化学院学报,2009,28.5:55-58.

[10] LIU H M, GUO J H, CHENG Y J, et al. Inhibitory activity of tea polyphenol and Hanseniaspora uvarum against Botrytis cinerea infections [J]. Let Appl Microbiol, 2010, 51(3): 258-263.

[11] 邢春玉,孙浩晨.2020.黄酮类化合物对铜绿微囊藻的抑制作用.广东蚕业.56(10).26-28.

[12] 李贇辉,吴婷,杨维东,李宏业,刘洁生.2012.十种黄酮类化合物对两种赤潮藻的抑制作用33(1)72-75.

[13] CHINNAM N, DADI P K, SABRI S A, et al. Dietary bioflavonoids inhibit Escherichia coli ATP synthase in a differential manner [J]. Int J Biol Macromol, 2010, 46(5):478-486.

#### 作者简介:

刘雨田(2000-),男,香港理工大学生物医学专业,硕士研究生,主要从事纳米技术研究。

林艳芳(1976-),女,澳门理工大学,讲师,主要从事病原微生物学研究。