

孙建瑞, 赵君峰, 符丹丹, 张彬, 古绍彬, 王大红. *Chlorella vulgaris*胞内多糖抗氧化活性及其与糖代谢相关酶的关系[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26 (3): 512-519

Sun JR, Zhao JF, Fu DD, Zhang B, Gu SB, Wang DH. Assessing the antioxidant activity of intracellular polysaccharide from *Chlorella vulgaris* and its relationship with glycometabolism-related enzymes [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2020, 26 (3): 512-519

*Chlorella vulgaris*胞内多糖抗氧化活性及其与糖代谢相关酶的关系

孙建瑞 赵君峰 符丹丹 张彬 古绍彬 王大红✉

河南科技大学食品与生物工程学院, 河南省食品微生物工程技术研究中心 洛阳 471023

摘要 对淡水微藻*Chlorella vulgaris* 224胞内多糖的抗氧化活性进行研究, 并对其在不同培养条件下生长发育过程中胞内多糖的积累与糖代谢相关酶的关系进行分析. *C. vulgaris* 224胞内多糖浓度为60 mg/mL时其对DPPH自由基的清除率为61.62%, 浓度为30 mg/mL时其对羟基自由基的清除率超过50%, 结果表明其胞内多糖具有较强的抗氧化活性. 低盐条件下己糖激酶、苹果酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和磷酸葡萄糖异构酶的活性均高于正常试验组; 低氮条件下己糖激酶、苹果酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性均低于正常试验组, 而磷酸葡萄糖异构酶的活性高于正常组; 添加NaHCO₃时己糖激酶、苹果酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶的活性均低于正常组, 而磷酸葡萄糖异构酶的活性高于正常组; 相关性分析发现己糖激酶、苹果酸脱氢酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶与其胞内多糖的积累呈显著相关 ($P < 0.05$), 而磷酸葡萄糖异构酶与胞内多糖积累的相关性未达到显著水平 ($P > 0.05$). 本研究表明己糖激酶、苹果酸脱氢酶和6-磷酸葡萄糖脱氢酶是调控*C. vulgaris* 224胞内多糖积累的关键酶, 结果可为筛选天然抗氧化物质提供一定理论基础. (图6表1 参35)

关键词 小球藻; 胞内多糖; 抗氧化活性; 糖代谢相关酶

Assessing the antioxidant activity of intracellular polysaccharide from *Chlorella vulgaris* and its relationship with glycometabolism-related enzymes

SUN Jianrui, ZHAO Junfeng, FU Dandan, ZHANG Bin, GU Shaobin & WANG Dahong✉

College of Food and Bioengineering, Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China

Abstract In this study, the antioxidant activity of intracellular polysaccharide derived from *Chlorella vulgaris* 224 was assessed. Thereafter, the relationship between accumulation of intracellular polysaccharide and glycometabolism-related enzymes during the growth and development of *C. vulgaris* 224 under different culture conditions was analyzed. The clearance rate of DPPH free radical was estimated as 61.62% when the concentration of intracellular polysaccharide was 60 mg/mL, and the clearance rate of hydroxyl radical exceeded 50% when the concentration of intracellular polysaccharide was 30 mg/mL. The activities of HK, MDH, G6PDH, and PGI under low salt condition were higher than those in normal condition. The activities of HK, MDH, and G6PDH under low nitrogen condition were lower than that in normal condition, while the activity of PGI was higher than that in normal condition. The activities of HK, MDH, and G6PDH were lower than that in normal condition when NaHCO₃ was added, while the activity of PGI was higher than that in normal condition. Results of correlation analysis revealed that HK, G6PDH, and MDH were significantly correlation ($P < 0.05$) with intracellular polysaccharide accumulation, but the correlation between PGI and intracellular polysaccharide accumulation was not significant ($P > 0.05$). These results indicate that the intracellular polysaccharide of *C. vulgaris* 224 exhibits strong antioxidant activity. In addition, we believe that HK, G6PDH, and MDH are the key enzymes regulating the accumulation of intracellular polysaccharide in *C. vulgaris* 224.

Keywords *Chlorella vulgaris*; intracellular polysaccharide; antioxidant activity; glycometabolism related enzyme

收稿日期 Received: 2019-07-30 接受日期 Accepted: 2019-09-25

国家自然科学基金项目 (31401672, 31701536) 和河南省高等学校重点科研项目 (17B180003) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401672, 31701536) and the Key Scientific Research Projects of Henan Province (17B180003)

✉通讯作者 Corresponding author (E-mail: wangdahong2003@163.com)

微藻能合成多种高附加值生物活性物质,如多糖^[1]、叶黄素^[2]、不饱和脂肪酸^[3]、虾青素^[4]、胡萝卜素^[5]、凝集素^[6]等,这些活性物质在食品添加剂、营养保健品及医药品等领域有广泛应用,具有较高的经济价值^[7-8]。微藻的活性多糖显示出重要的生理学功能,不仅能够增强机体免疫力,对类风湿性关节炎也有一定疗效,还具有抗肿瘤、抗炎症、抗病毒、抗菌、抗氧化等活性^[9-10]。国外也有关于微藻多糖在医药保健和食品领域应用的研究^[11]。

微藻多糖具有抗肿瘤活性和调节免疫的作用,Akao等研究发现钝顶螺旋藻多糖可以刺激小鼠体内自然杀伤细胞的活性从而起到抗肿瘤作用^[12];Park等发现在一定培养条件下,红球藻(*Haematococcus lacustris*)培养液中的多糖有明显的刺激免疫活性,能刺激腹腔巨噬细胞RAW264.7产生TNF- α ^[13];Guzman等对小球藻和三角褐指藻的多糖进行了研究,发现这两种多糖都具有不同程度的抗炎和免疫活性^[14]。微藻多糖还具有抗病毒和抗菌活性,Mansour等通过对埃及干燥土壤中的5种蓝绿微藻的研究,发现这些微藻中含有的多糖对狂犬病病毒和疱疹病毒有不同程度的抑制作用^[15];陈晓清等研究发现海水小球藻和紫球藻的多糖提取物显示出不同程度的抑制细菌和真菌的活性,其中海水小球藻的多糖提取物对中华根霉与稻瘟病菌有极强的抗菌活性^[16]。微藻的抗氧化活性和降血糖作用也是近年研究的一个重要方向,Dvir等通过给大鼠投喂红微藻(*Porphyridium*)的多糖发现,这种物质能显著影响大鼠体重、肝重、血浆甘油三酯含量和粪便中性固醇与胆汁酸的含量等指标,具有明显的降血脂和降胆固醇作用^[17];Chen等研究发现蔷薇藻的胞外粗多糖具有清除超氧阴离子以及抑制亚油酸自动氧化的能力^[18]。Tannin-Spitz等提取的紫球藻多糖及其降解后的不同多糖组分具有清除自由基的能力^[19]。

生物体中多糖的积累涉及很多种酶,己糖激酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶是糖代谢过程中糖酵解途径、戊糖磷酸途径和三羧酸循环中的重要酶^[20]。己糖激酶可以使己糖磷酸化,磷酸化后的己糖才能进入糖酵解途径,为植物提供碳源和能量;磷酸化的己糖还可以在葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)的作用下生成腺苷二磷酸葡萄糖(ADPG),为淀粉的合成提供原料^[21]。己糖激酶在光合组织中具有调节光合作用的功能,还能调节生物体的生长发育和衰老。植物中的糖感受蛋白可以感受不同种类的糖,激活糖信号,产生的糖信号在细胞内进行传导,最终调控许多相关基因的表达及相关酶的活性。微生物中,也发现很多与糖代谢相关的酶,它们对微生物多糖的积累有重要的影响。典型的细菌多糖合成基因簇一般包括糖核苷酸合成相关基因、糖基转移酶基因和多糖合成调节基因。基因研究表明,自然界中细菌多糖的生物合成根据第二步骤的不同存在3种主要途径,分别为Wzy-依赖途径、ABC转运体-依赖途径以及合酶-依赖途径^[22]。

微藻多糖的积累也是受多种基因调控的,因此有必要逐步弄清微藻中与多糖积累相关的代谢调控机制,从而通过基因工程的手段提高微藻多糖的生产水平。所以,研究不同培养条件下微藻细胞内糖代谢相关酶活性的变化,是探索微藻多糖代谢调控的复杂生物化学网络,了解微藻多糖代谢途径的一个有效方法。然而,目前有关微藻多糖积累与糖代谢相关酶之间关系的研究鲜见报道。本课题组筛选到一株胞内多糖产量较高的淡水微藻(224号),初步鉴定为小球藻(*Chlorella vulgaris*)。我们以该藻株作为试验藻株,以其胞内多糖对

DPPH自由基和羟基自由基的清除率及总还原力来研究其抗氧化活性,同时对不同培养条件下*C. vulgaris* 224生长发育过程中胞内多糖积累的变化与糖代谢相关酶活性的变化进行研究,旨在初步探讨*C. vulgaris* 224胞内多糖的积累与糖代谢相关酶之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本课题组前期筛选的*C. vulgaris* 224藻株。

6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)试剂盒、苹果酸脱氢酶(MDH)试剂盒、己糖激酶(HK)试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司);NADP⁺、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、果糖-6-磷酸(Sigma公司);试验用三氯乙酸、氢氧化钠、苯酚、乙醇等无机试剂、有机溶剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

万分之一天平(梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司);电热恒温水浴锅(常州固德仪器有限公司);TU-1800紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司);Eppendorf台式高速冷冻离心机(德国艾本德股份公司)。

1.3 方法

1.3.1 微藻的培养 参考刘义的方法^[23],以对数生长期的藻液作为种子液,接种于2 L三角瓶中(内装1 L SE培养基),接种量为10%(V/V),然后置于恒温光照培养室中培养,培养温度25℃,培养基初始pH 7.0,光暗比16 h:8 h,光强度约为100 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$,培养14 d。

1.3.2 微藻胞内多糖的提取 采用超声破碎协同热水浸提法提取微藻的胞内多糖^[24]:将pH 14的NaOH提取液按料液比1:25(m/V)加入干燥体中,混合均匀;功率200 W,超声波破碎20 min;置于70℃水浴锅中加热180 min,然后8 000 r/min离心10 min,取上清液;加3倍体积的无水乙醇于上清液中,静置过夜,8 000 r/min离心15 min取沉淀;用适量蒸馏水溶解沉淀后加入三氯乙酸,充分搅拌至沉淀不再溶解;8 000 r/min离心10 min,收集上清液;上清液中加入3倍体积的无水乙醇,沉淀3 h;8 000 r/min离心10 min取沉淀,所得沉淀即为胞内多糖,冷冻干燥后放4℃备用。

1.3.3 DPPH自由基清除能力测定 参照席波等的方法^[25]:取1.0 mL质量浓度不同的多糖溶液,加入4 mL 0.004% DPPH溶液,混合均匀,黑暗中静置30 min,517 nm测定吸光值;空白对照用无水乙醇,阳性对照用对应浓度的BHT。每个样品测3次,取平均值。清除率公式可表示为:

$$\text{DPPH自由基清除率} = (1 - \frac{A_1}{A_2}) \times 100\%$$

式中: A_1 为样品或者阳性对照吸光值; A_2 为空白对照吸光值。

1.3.4 羟基自由基清除能力测定 参照席波等的方法^[25],在试管中依次加入0.4 mL PBS(pH 7.4)、0.25 mL双蒸水、0.15 mL 5 mmol/L的邻二氮菲溶液和0.5 mL 7.5 mmol/L FeSO₄,混合均匀。然后加入1.0 mL质量浓度不同的多糖溶液,最后加入0.1 mL 1%的过氧化氢溶液,于37℃水浴中保温60 min,536 nm波长下测定吸光值。阳性对照用对应浓度的BHT,损伤管中加H₂O₂而不加样品,对照管中两者都不加,空白管中加样品而不加H₂O₂。每个样品测3次,取平均值。清除率公式可表示为:

$$\text{羟基自由基清除率} = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\%$$

式中 $A_{\text{样品}}$ 、 $A_{\text{损伤}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 分别为样品管、损伤管、对照管、空白管在536 nm的吸光值。

1.3.5 总还原力测定 参照陈艳丽的方法^[26],在试管中加入1.0 mL质量浓度不同的多糖溶液,然后加2.5 mL 0.2 mol/L、pH 6.6的PBS,2.5 mL 1% $K_3[Fe(CN)_6]$,于50 °C水浴中保温20 min,然后加入2.5 mL 10% TCA,混合均匀,3 000 r/min离心10 min,取2.5 mL上清液,加入2.5 mL重蒸水和0.5 mL 0.1%的 $FeCl_3$,阳性对照用对应浓度的BHT,700 nm测定吸光值。每个样品测3次,取平均值。

1.3.6 粗酶液的提取 将培养好的微藻培养液分装到离心管中,12 000 r/min,4 °C离心10 min,弃上清;藻体用磷酸盐缓冲液洗涤两次,12 000 r/min,4 °C离心10 min,取沉淀;沉淀用3 mL的磷酸盐缓冲液重悬,混匀后置于冰上;在冰浴中超声波破碎细胞(功率200 W,超声3 s,间隔10 s,重复30次);12 000 r/min,4 °C离心10 min,取上清,置于冰上作为待测粗酶液。粗酶液的提取必须在0-4 °C的条件下操作完成,以防止酶变性失活。

1.3.7 酶活的测定 磷酸葡萄糖脱氢酶(G6PDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)和己糖激酶(HK)活性的测定参照试剂盒使用说明书。

磷酸葡萄糖异构酶(PGI)活性的测定 将磷酸盐缓冲液(pH 6.8)820 μ L、 $MgCl_2$ 溶液100 μ L、 $NADP^+$ 溶液31 μ L、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶4 μ L、果糖-6-磷酸溶液15 μ L、细胞提取液30 μ L(对照管加蒸馏水30 μ L)依次加入到1 mL的石英比色皿中,在加细胞提取液的同时开始计时;用分光光度计在340 nm波长下记录20 s时的初始吸光度 A_1 ,然后将比色皿连同反应液迅速放入25 °C水浴中,准确反应5 min;将比色皿迅速取出并擦干,340 nm下比色,记录5 min20 s时的吸光度 A_2 ,计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

1.3.8 胞内多糖含量的测定 采用苯酚-硫酸比色法^[27]测定胞内多糖浓度,胞内多糖浓度的计算采用线性方程: $Y = 11.945X - 0.044163$, $R^2 = 0.9972$ (以葡萄糖作标准曲线,得到糖浓度与吸光值的关系)。

$$\text{胞内多糖含量} = \frac{\text{多糖浓度} \times \text{多糖溶液体积}}{\text{微藻藻体干重}} \times 100\%$$

1.3.9 数据分析 采用SPSS统计学软件对试验数据进行分析,用Pearson相关对微藻胞内多糖积累与糖代谢相关酶的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 胞内多糖抗氧化活性实验结果

2.1.1 DPPH自由基清除能力 DPPH自由基以氮为中心,化学性质较稳定,不易被清除,若能够被受试物清除,说明其具有较强的自由基清除能力。由图1可知,随着样品溶液质量浓度的增加,*C. vulgaris* 224胞内多糖对DPPH自由基的清除能力逐渐增强,清除率最高达到61.62%。结果说明,*C. vulgaris* 224的胞内多糖具有较强的清除DPPH自由基的能力。

2.1.2 羟基自由基清除能力 由图2可知,*C. vulgaris* 224胞内多糖对羟基自由基的清除能力随着样品溶液质量浓度的增加而增强;在30 mg/mL时,胞内多糖对羟基自由基的清除率已超过50%。结果说明,*C. vulgaris* 224的胞内多糖具有明显的清除羟基自由基的能力。

2.1.3 总还原能力 抗氧化剂的还原能力与其抗氧化活性具有十分密切的关系,因此还原能力可以作为衡量抗氧化能

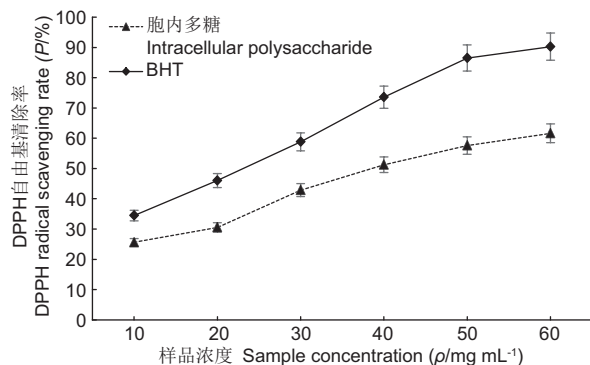


图1 *Chlorella vulgaris* 224胞内多糖对DPPH自由基的清除能力。
Fig. 1 DPPH radical scavenging activities of intracellular polysaccharide from *Chlorella vulgaris* 224.

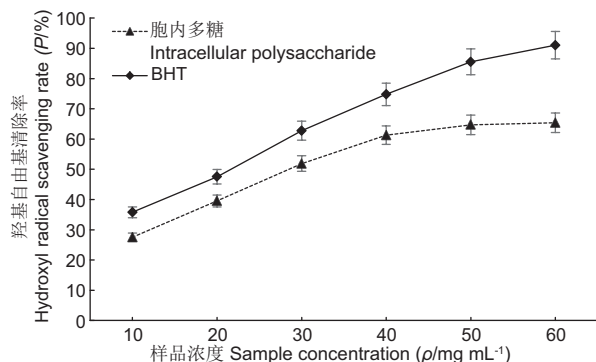


图2 *Chlorella vulgaris* 224胞内多糖对羟基自由基的清除能力。
Fig. 2 Hydroxyl radical scavenging activities of intracellular polysaccharide from *Chlorella vulgaris* 224.

力的一个指标。通过吸光度的大小来判定其还原能力,吸光度越大表示还原力越强^[28]。由图3可知,随着样品质量浓度的升高,*C. vulgaris* 224胞内多糖的总还原能力逐渐增强;在检测的质量浓度范围内,胞内多糖的总还原力始终略低于阳性对照BHT的总还原力。结果说明,*C. vulgaris* 224的胞内多糖具有较强的总还原能力。

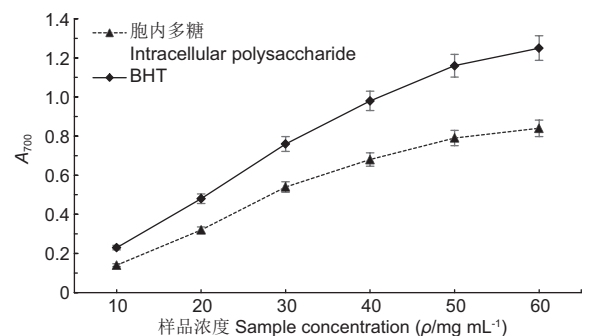


图3 *Chlorella vulgaris* 224胞内多糖的总还原能力。
Fig. 3 Reducing power of intracellular polysaccharide from *Chlorella vulgaris* 224.

2.2 NaCl浓度对*C. vulgaris* 224胞内多糖积累和酶活性的影响

随着培养时间的增加,*C. vulgaris* 224胞内多糖的含量持续升高;当培养时间为12 d时,胞内多糖含量达到最高,之后胞内多糖含量会出现下降;低盐试验组(25 mg/L)和正常组(100 mg/L)胞内多糖含量的变化规律一致,但正常组胞内多

糖的含量始终高于低盐试验组(图4)。

在培养过程中,低盐试验组和正常组胞内酶活性的变化规律基本一致。HK活性随着培养时间的增加呈先升高后下降的趋势;正常组HK活性在6 d内逐渐升高,在第6天活性达到最高的8.88 U/g,之后HK活性逐渐降低;低盐试验组HK活性在10 d内逐渐升高,在第10天活性达到最高的9.32 U/g,之后HK活性逐渐降低(图4A)。低盐试验组和正常组MDH活性随着培养时间的增加均呈下降趋势;在整个培养过程中,低盐试验组MDH活性始终高于正常组(图4B)。低盐试验组和正常组G6PDH活性随着培养时间的增加均呈下降趋势;在整个培养过程中,低盐试验组G6PDH活性始终高于正常组(图4C)。PGI活性随着培养时间的增加呈先升高后下降的趋势;正常组PGI活性在4 d内逐渐升高,在第4天活性达到最高的16.10 U/g,之后PGI活性逐渐降低;低盐试验组PGI活性在6 d内逐渐升高,在第6天活性达到最高的20.47 U/g,之后PGI活性逐渐降低(图4D)。

2.3 NaNO₃浓度对*C. vulgaris* 224胞内多糖积累和酶活性的影响

随着培养时间的增加,低氮试验组(125 mg/L) *C. vulgaris* 224胞内多糖的含量持续升高;当培养时间为12 d时,胞内多糖含量达到最高的14.72%,之后胞内多糖含量会出现下降;正常组(375 mg/L)胞内多糖含量的变化规律与低氮试验组一致,但正常组胞内多糖的含量始终高于低氮试验组(图5)。

在培养过程中,低氮试验组和正常组胞内酶活性的变化规律一致。低氮试验组和正常组HK活性随着培养时间的增加

呈先升高后下降的趋势;HK活性在6 d内逐渐升高,在第6天活性达到最高(低氮试验组8.68 U/g、正常组9.05 U/g),之后HK活性逐渐降低,在整个培养过程中,低氮试验组HK活性始终低于正常组(图5A)。低氮试验组和正常组MDH活性随着培养时间的增加均呈下降趋势;在整个培养过程中,低氮试验组MDH活性始终低于正常组(图5B)。低氮试验组和正常组G6PDH活性随着培养时间的增加均呈下降趋势;在整个培养过程中,低氮试验组G6PDH活性始终低于正常组(图5C)。低氮试验组和正常组PGI活性随着培养时间的增加呈先升高后下降的趋势;PGI活性在4 d内逐渐升高,在第4天活性达到最高(低氮试验组17.06 U/g、正常组15.34 U/g),之后PGI活性逐渐降低(图5D)。

2.4 NaHCO₃浓度对*C. vulgaris* 224胞内多糖积累和酶活性的影响

随着培养时间的增加,加碳试验组(2 g/L) *Chlorella vulgaris* 224胞内多糖的含量持续升高;当培养时间为14 d时,胞内多糖含量达到最高的17.24%;正常组(0 g/L)胞内多糖含量在12 d时达到最高,之后有所降低。在培养过程中,加碳试验组胞内多糖的含量始终高于正常组(图6)。

在培养过程中,加碳试验组和正常组胞内酶活性的变化规律一致。加碳试验组和正常组HK活性随着培养时间的增加呈先升高后下降的趋势;HK活性在6 d内逐渐升高,在第6天活性达到最高(加碳试验组8.78 U/g、正常组9.27 U/g),之后HK活性逐渐降低,在整个培养过程中,加碳试验组HK活性始终低于正常组(图6A)。加碳试验组和正常组MDH活性随着培养时间的增加均呈下降趋势;在整个培养过程中,加碳试验

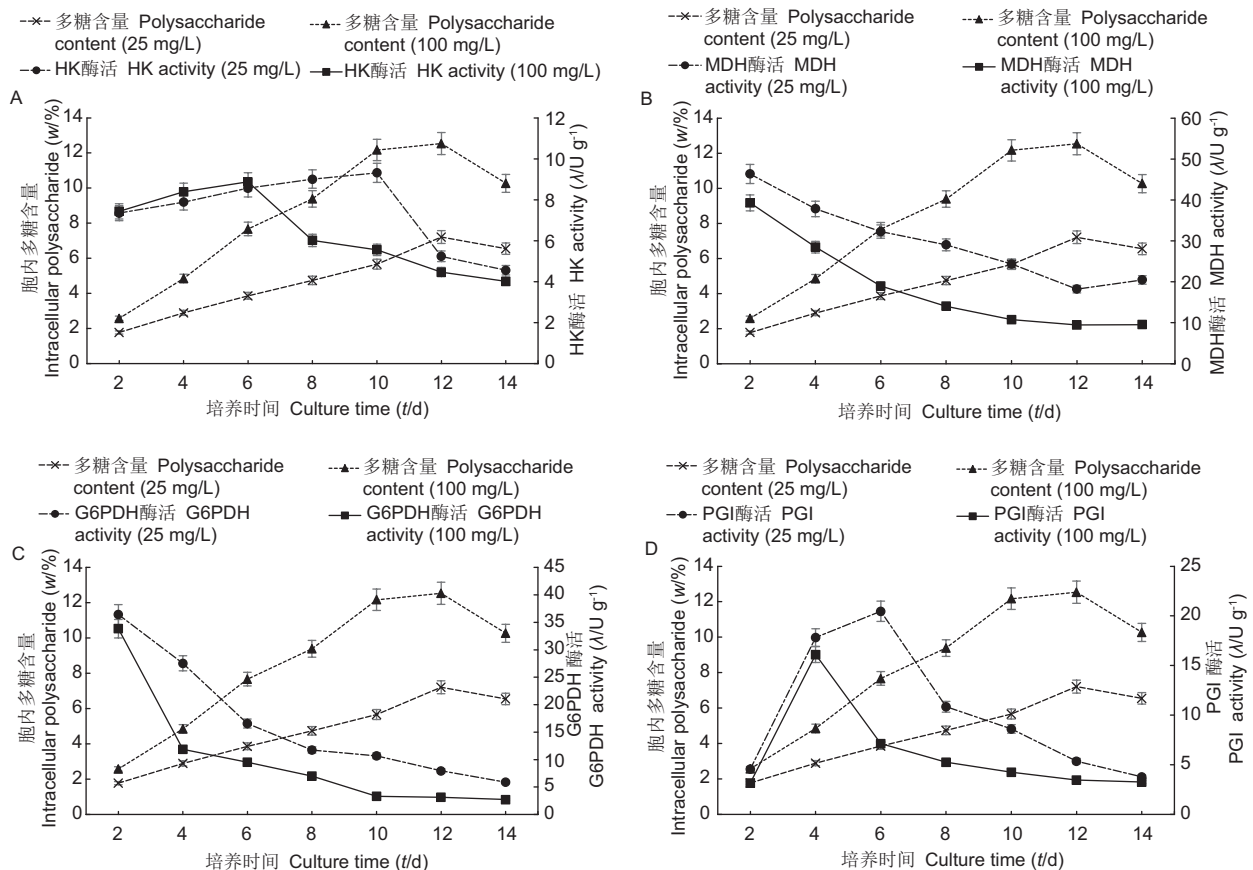


图4 NaCl浓度对*Chlorella vulgaris* 224胞内多糖积累和酶活性的影响。

Fig. 4 Effects of NaCl concentration on intracellular polysaccharide accumulation and enzyme activities.

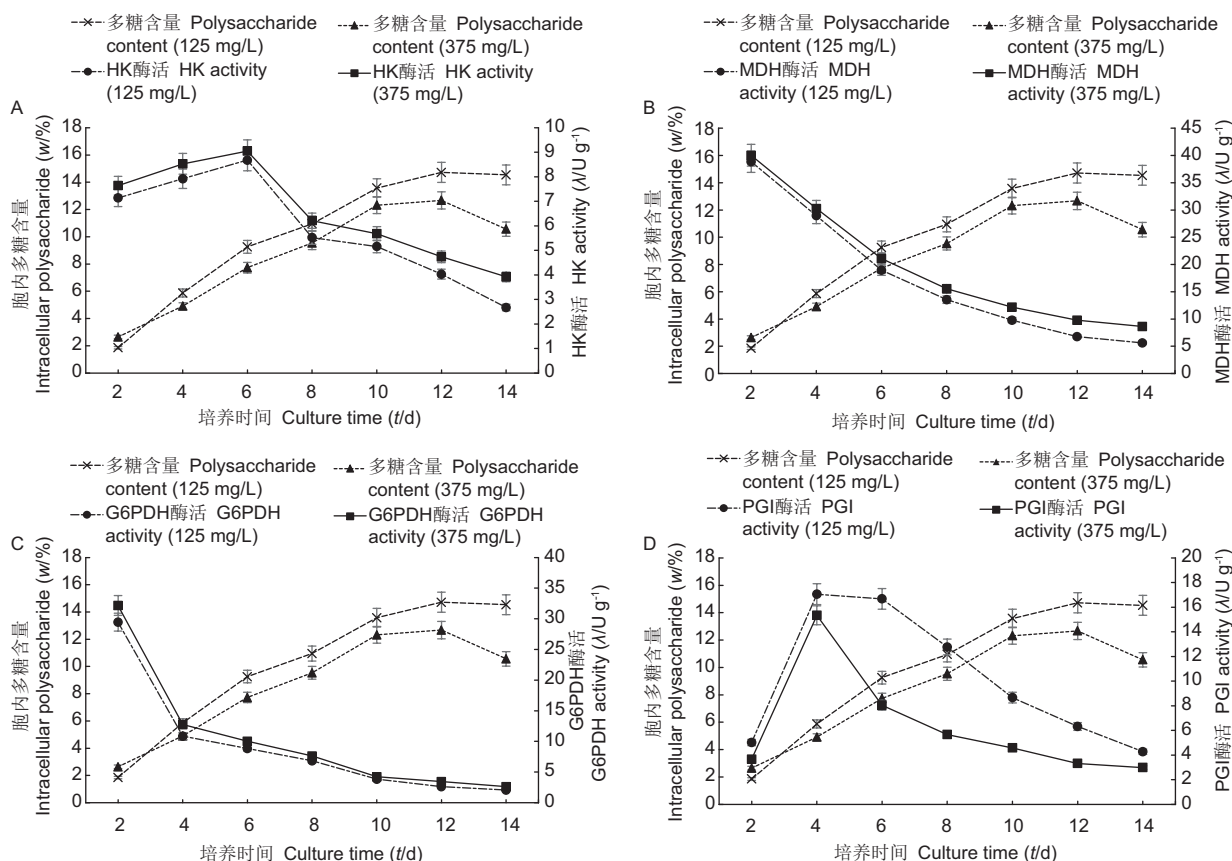


图5 NaNO_3 浓度对*Chlorella vulgaris* 224胞内多糖积累和酶活性的影响。

Fig. 5 Effects of NaNO_3 concentration on intracellular polysaccharide accumulation and enzyme activities.

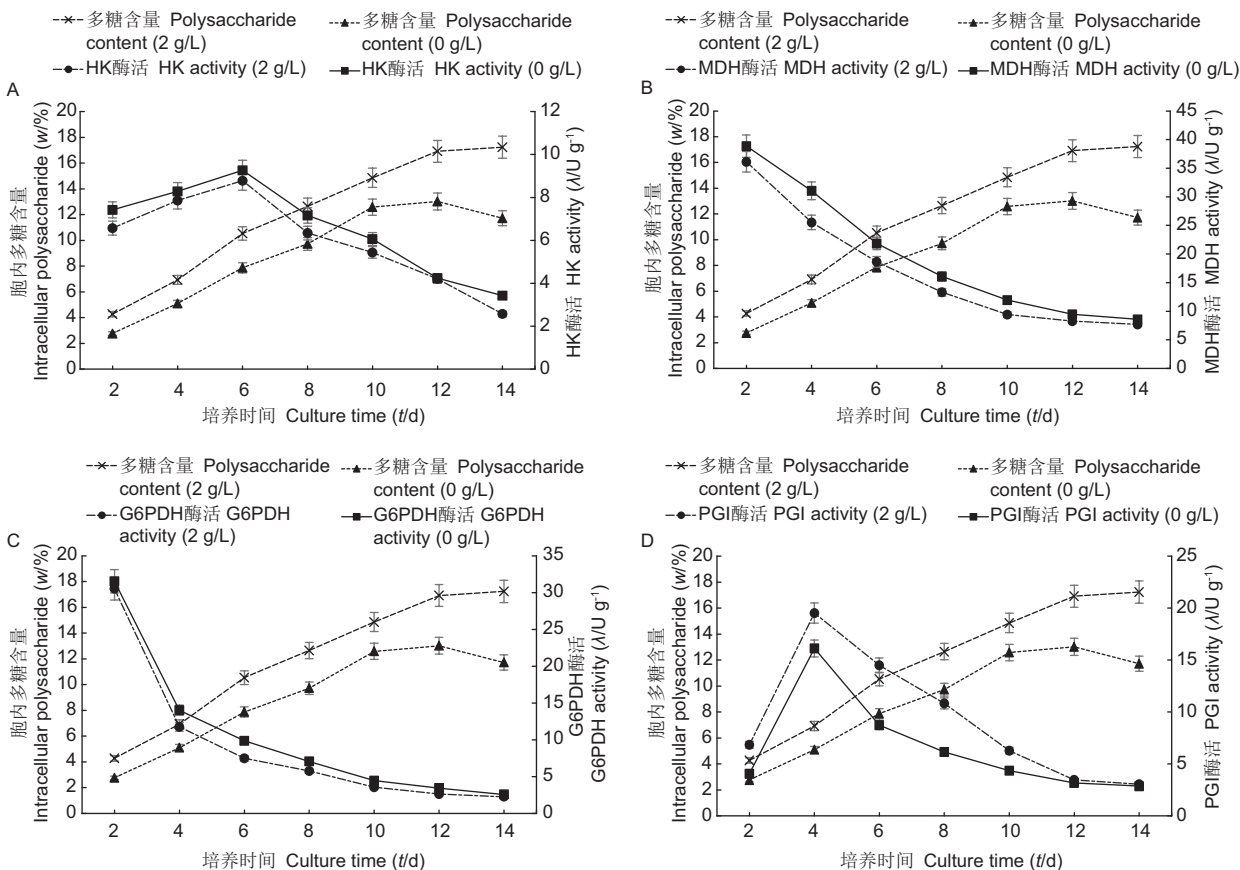


图6 NaHCO_3 浓度对*Chlorella vulgaris* 224胞内多糖积累和酶活性的影响。

Fig. 6 Effects of NaHCO_3 concentration on intracellular polysaccharide accumulation and enzyme activities.

组MDH活性始终低于正常组(图6B)。加碳试验组和正常组G6PDH活性随着培养时间的增加均呈下降趋势;在整个培养过程中,加碳试验组G6PDH活性略低于正常组(图6C)。加碳试验组和正常组PGI活性随着培养时间的增加呈先升高后下降的趋势;PGI活性在4 d内逐渐升高,在第4天活性达到最高(加碳试验组19.52 U/g、正常组16.12 U/g),之后PGI活性逐渐降低(图6D)。

2.5 胞内多糖积累与糖代谢相关酶的相关性分析

我们对*C. vulgaris* 224胞内多糖含量和糖代谢酶的活性进行Pearson相关性分析,结果表明,MDH、HK和G6PDH与胞内多糖积累呈显著相关($P < 0.05$),而PGI与胞内多糖积累的相关性未达到显著水平($P > 0.05$)(表1)。

表1 *Chlorella vulgaris* 224胞内多糖积累与糖代谢相关酶之间的Pearson相关性分析

Table 1 Pearson correlation analysis between intracellular polysaccharide accumulation of *Chlorella vulgaris* 224 and glycometabolism related enzymes

糖代谢酶 Glycometabolism related enzyme	Pearson (双侧) 相关 Pearson (bilateral) correlation	
	相关性 Correlation	显著性 Significance
HK	-0.774 [*]	0.041
G6PDH	-0.873 ^{**}	0.011
MDH	-0.958 ^{**}	0.000
PGI	-0.415	0.352

^{*}表示在0.05水平上显著相关; ^{**}表示在0.01水平上显著相关。

^{*}Significant correlation at the 0.05 level; ^{**}Significant correlation at the 0.01 level.

3 讨论

各种自由基和氧气损害破坏有机体,以及机体的抗氧化能力不足,是造成生物有机体衰老的主要原因,而植物和藻类是天然抗氧化物质的主要来源。孙颖颖等研究发现球等鞭金藻的多糖对超氧阴离子的清除率最高可达48.5%,对羟基自由基的清除率最高达到63.6% [29]。席波等研究发现海水小球藻(*C. vulgaris*)的粗多糖提取物对DPPH自由基清除率最高为61.2%,对超氧阴离子清除率最高达到74.47%,对羟基自由基清除率最大为75.37% [25]。*C. vulgaris* 224胞内多糖对DPPH自由基的清除率最高为61.62%,对羟基自由基的清除率最高为65.39%,总还原力的吸光值最高为0.84,说明其胞内多糖具有较强的抗氧化活性。

微藻细胞中的活性多糖有很多潜在的生物活性功能,阐述微藻中多糖的积累机制有很重要的意义。低盐条件不利于*C. vulgaris* 224胞内多糖的积累,低盐条件下HK、MDH、G6PDH和PGI的活性均高于正常试验组,这可能是*C. vulgaris* 224胞内多糖积累量减少的主要原因。低氮条件有利于胞内多糖的积累,低氮条件下HK、MDH、G6PDH的活性均低于正常试验组,而PGI的活性高于正常组,表明低氮条件下HK、MDH、G6PDH可能在胞内多糖的积累中起关键作用。NaHCO₃的添加能够促进藻细胞的生长发育和胞内多糖的积累,此时HK、MDH、G6PDH的活性均低于正常组,而PGI的活性高于正常组,表明加碳条件下HK、MDH、G6PDH可能在胞内多糖的积累中起关键作用。

己糖激酶、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和苹果酸脱氢酶是糖代谢过程中糖酵解途径、戊糖磷酸途径和三羧酸循环中的重要酶。结果表明,它们与*C. vulgaris* 224胞内多糖的积累呈显著相关($P < 0.05$)。在藻细胞培养初期阶段,HK、MDH和G6PDH的酶活性较高,这使糖酵解途径、三羧酸循环和戊糖磷酸途径效率高,能够为微藻提供足够的能量和氨基酸、核苷酸合成的前体物 [30]。微生物中,磷酸葡萄糖异构酶参与果糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸之间的相互转换,但是它与*C. vulgaris* 224胞内多糖的积累没有显著的相关性($P > 0.05$)。我们推测*C. vulgaris* 224生长过程中胞内多糖的积累由多种糖代谢相关酶共同调控,其中HK、MDH和G6PDH是调控胞内多糖积累的关键酶。

Varum等在浮游硅藻肋骨条藻中检测到了外切-1,3- β -葡聚糖酶(exo-Glu)的活性,并且发现exo-Glu活性提高时金藻昆布糖的含量会随之降低 [31]。韩娟研究发现不同硝态氮浓度下类波氏真眼点藻(*E. cf. polyphem*)中金藻昆布糖的含量在整个培养周期中呈现先上升后下降的趋势,而藻细胞中尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UGPase)活性随培养时间的延长呈下降趋势, β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase)的活性在培养周期内呈先下降后上升的趋势 [32]。Bart研究发现 α -磷酸葡萄糖变位酶和UDP-葡萄糖焦磷酸化酶的活性与*Streptococcus thermophilus* LY03多糖的生物合成高度相关 [33]。Tang等的研究表明,灵芝菌丝体多糖的生物合成与dTDP-葡萄糖焦磷酸化酶、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、 α -磷酸葡萄糖变位酶和磷酸葡萄糖异构酶的活性有很大关系 [34]。赵洲等发现UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、磷酸葡萄糖异构酶和 α -磷酸葡萄糖变位酶是灵芝子实体多糖生物合成中的关键酶 [30]。Wang等通过转录组学研究发现 β -呋喃果糖苷酶、己糖激酶、甘露糖-1-磷酸尿苷转移酶是*Polygonatum sibiricum*多糖代谢调控中的关键酶 [35]。由此可见,生物体中调控多糖积累的关键酶可能会随着环境条件、生物种类等的变化而变化。

4 结论

本研究发现*C. vulgaris* 224胞内多糖对DPPH自由基的清除率最高可达61.62%,对羟基自由基的清除率最高可达65.39%,同时总还原力较强,表明胞内多糖具有较强的抗氧化活性。*C. vulgaris* 224胞内多糖积累与酶活性变化之间的相关性分析发现HK、MDH、G6PDH与胞内多糖积累的相关性达到显著水平($P < 0.05$),而PGI与胞内多糖积累的相关性未达到显著水平($P > 0.05$),由此推测HK、MDH、G6PDH是调控*C. vulgaris* 224胞内多糖积累的关键酶。

在*C. vulgaris* 224的生长过程中肯定还有其他重要的酶参与调控胞内多糖的积累,如UDP-葡萄糖焦磷酸化酶、ADP-葡萄糖焦磷酸化酶、果糖二磷酸酶、 α -磷酸葡萄糖变位酶和dTDP-葡萄糖焦磷酸化酶等,它们已经被证明在其他物种多糖的积累中起重要作用。因此,*C. vulgaris* 224胞内多糖积累的代谢调控机制需进一步的研究,而胞内多糖积累过程中碳流的分配也需梳理清楚。

本研究为筛选天然抗氧化物质提供了新的思路,同时也为研究该微藻胞内多糖积累的代谢调控机制奠定了一定基础。

参考文献 [References]

- Shen GZ, Qu D, Li KP, Li M. Composition of extracellular and intracellular polymeric substances produced by *Scenedesmus* and *Microcystis* [J]. *Environ Eng Sci*, 2017, **34** (12): 887-894
- Sun Z, Li T, Zhou ZG, Jiang Y. Microalgae as a source of lutein: chemistry, biosynthesis, and carotenogenesis [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2016, **153**: 37-58
- Su G, Jiao K, Li Z, Guo X, Chang J, Ndikubwimana T, Sun Y, Zeng X, Lu Y, Lin L. Phosphate limitation promotes unsaturated fatty acids and arachidonic acid biosynthesis by microalgae *Porphyridium purpureum* [J]. *Bioproc Biosyst Eng*, 2016, **39** (7): 1129-1136
- He BX, Hou LL, Dong MM, Shi JW, Huang XY, Ding YT, Cong XM, Zhang F, Zhang XC, Zang XN. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin induction by high light with acetate and Fe^{2+} [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, **19** (1): 175-192
- Diprat AB, Menegol T, Boelter JF, Zmozinski A, Rodrigues Vale MG, Rodrigues E, Rech R. Chemical composition of microalgae *Heterochlorella luteoviridis* and *Dunaliella tertiolecta* with emphasis on carotenoids [J]. *J Sci Food Agric*, 2016, **97** (10): 3463-3468
- Carneiro DC, Oliveira MM, Lima STC. Estimating protein quantities from microalgae: protein per biomass percentage, spectroscopic concentration, and lectin content [J]. *Chem Papers*, 2019, **73** (10): 2535-2540
- Mariana B, Patricia V, Andrade PB. Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: implications for neurodegenerative diseases [J]. *Mar Drugs*, 2014, **12** (9): 4934-4972
- Morais MG, Vaz BS, Morais EG, Costa JAV. Biologically active metabolites synthesized by microalgae [J]. *Biomed Res Int*, 2015, **4**: 1-15
- 陈宇婷. 两种海洋微藻多糖抑制肿瘤血管生成活性的研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017 [Chen YT. Studies on the anti-angiogenesis activity of the polysaccharides from marine microalgae [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017]
- 李洁琼, 刘红全, 袁莎. 微藻多糖的研究进展[J]. 现代化工, 2016, **36** (6): 60-62 [Li JQ, Liu HQ, Yuan S. Research progress of microalgae polysaccharide [J]. *Mod Chem Ind*, 2016, **36** (6): 60-62]
- Roeselers G, Loosdrecht MCM, Muyzer G. Phototrophic biofilms and their potential applications [J]. *J Appl Phycol*, 2008, **20**: 227-235
- Akao Y, Ebihara T, Masuda H, Saeki Y, Akazawa T, Hazeki K, Hazeki O, Matsumoto M, Seya T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered *Spirulina* extract in mice [J]. *Cancer Sci*, 2009, **100** (8): 1494-1501
- Park JK, Kim ZH, Lee CG, Synytsya A, Jo HS, Kim SO, Park JW, Park Y. Characterization and immunostimulating activity of a water-soluble polysaccharide isolated from *Haematococcus lacustris* [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2011, **16** (6): 1090-1098
- Guzmán S, Gato A, Lamela M, Freire-Garabal M, Calleja JM. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum* [J]. *Phytother Res*, 2003, **17** (6): 665-670
- Mansour HA, Shoman SA, Kdodier MH. Antiviral effect of edaphic cyanophytes on rabies and herpes-1 viruses [J]. *Acta Biol Hung*, 2011, **62** (2): 194-203.
- 陈晓清, 郑怡, 林雄平. 二种微藻多糖与蛋白质提取物的抗菌活性[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2005, **21** (2): 76-79 [Chen XQ, Zheng Y, Lin XP. Antimicrobial activities of the polysaccharide and protein extracts from two species of microalgae [J]. *J Fujian Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 2005, **21** (2): 76-79]
- Dvir I, Stark AH, Chayoth R, Madar Z, Arad SM. Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp. in rats [J]. *Nutrients*, 2009, **1** (2): 156-167
- Chen B, You W, Huang J, Yu Y, Chen W. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharide from *Rhodella reticulata* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, **26** (5): 833-840
- Tannin-Spitz T, Bergman M, Van-Moppes D, Grossman S, Arad S. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp [J]. *J Appl Phycol*, 2005, **17** (3): 215-222
- 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002 [Wang JY, Zhu SG, Xu CF. Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002]
- 罗玉. 植物中的糖代谢及其相关酶[J]. 文山师范高等专科学校学报, 2004, **17** (2): 155-159 [Luo Y. The sugar metabolism and the relational enzymes in plants[J]. *J Wenshan Teach Coll*, 2004, **17** (2): 155-159]
- Greenfield LK, Whitfield C. Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways [J]. *Carbohydr Res*, 2012, **356** (13): 12-24
- 刘义. 产油脂微藻筛选分离及其多样性研究[D]. 成都: 四川大学, 2012 [Liu Y. Screen separation and biodiversity of oleaginous microalgae in China [D]. Chengdu: Sichuan University, 2012]
- 孙建瑞, 宋涛, 孙显, 宋济君, 王川, 乔代蓉. 富油小球藻 *Chlorella protothecoides* 胞内多糖和油脂提取工艺优化[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (4): 615-620 [Sun JR, Song T, Sun X, Song JJ, Wang C, Qiao DR. Extraction optimization of intracellular polysaccharide and lipid from oleaginous *Chlorella protothecoides* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (4): 615-620]
- 席波, 宋东辉, 孙晶, 刘凤路, 邸富荣. 十种微藻粗多糖的抑菌作用及海水小球藻粗多糖的抗氧化活性[J]. 天津科技大学学报, 2015, **30** (5): 20-25 [Xi B, Song DH, Sun J, Liu FL, Di FR. Anti-microbial activities of crude polysaccharide extracts from ten species of microalgae and the antioxidant activities of crude polysaccharide extracts from marine *Chlorella vulgaris* [J]. *J Tianjing Univ Sci Technol*, 2015, **30** (5): 20-25]
- 陈艳丽. 不同海洋生境来源微生物胞外多糖的结构及抗氧化活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013 [Chen YL. Structure and antioxidant activity of different marine habitats sources extracellular polysaccharides [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013]
- 李战. 三种紫球藻培养、胞外多糖提取及RAPD分析[D]. 上海: 上海师范大学, 2004 [Li Z. Culture, polysaccharide extraction and

- RAPD analysis of three species of *Porphyridium* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2004]
- 28 原江锋, 赵君峰, 刘建利, 邱智军, 王大红. 连翘叶中连翘酯苷A的提取及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2016, **37** (1): 94-98 [Yuan JF, Zhao JF, Liu JL, Qiu ZJ, Wang DH. Extraction and antioxidant effect of forsythiaside A from *Forsythia suspense* leaves [J]. *Food Sci*, 2016, **37** (1): 94-98]
- 29 孙颖颖, 王辉. 球等鞭金藻胞外多糖的体外抗氧化活性和理化性质的初步分析[J]. 海洋科学, 2013, **37** (5):45-49 [Sun YY, Wang H. Study of *in vitro* antioxidation and physical and chemical characteristics analysis of extracellular polysaccharides iso-lated from *Isochrysis galbana* [J]. *Mar Sci*, 2013, **37** (5): 45-49]
- 30 赵洲, 陈向东, 王立华, 王秋颖, 兰进. 灵芝子实体多糖积累和糖代谢相关酶的关系研究[J]. 中国农学通报, 2012, **28** (22): 253-257 [Zhao Z, Chen XD, Wang LH, Wang QY, Lan J. Studies on the correlation between polysaccharides accumulation and sugar metabolizing enzymes in *Ganoderma lucidum* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, **28** (22): 253-257]
- 31 Varum KM, Ostgaard K, Grimsrud K. Diurnal rhythms in carbohydrate metabolism of the marine diatom *Skeletonema costatum*, (Grev.) Cleve [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1986, **102** (2): 249-256
- 32 韩娟. 类波氏真眼点藻的主要生化组成分析及其金藻昆布糖代谢相关酶的活性测定[D]. 广州: 暨南大学, 2013 [Han J. The analysis of main biochemical composition and determination of the enzymes involved in the chrysolaminarin metabolizing of *Eustigmatos cf. polyphem* [D]. Guangzhou: Jinan University, 2013]
- 33 Bart D, Luc DV. Correlation of activities of the enzymes α -phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophiles* LY03 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66** (8): 3519-3527
- 34 Tang YJ, Zhong JJ. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor [J]. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 1023-1026
- 35 Wang SQ, Wang B, Hua WP, Niu JF, Dang KK, Qiang Y, Wang ZZ. De novo assembly and analysis of *Polygonatum sibiricum* transcriptome and identification of genes involved in polysaccharide biosynthesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**: 1950-1966