

## 小球藻热水提取物功能成分的活性跟踪分离

贾敬<sup>1</sup>, 徐殿胜<sup>1</sup>, 庄秀园<sup>1</sup>, 张道敬<sup>1</sup>, 陶黎明<sup>2</sup>, 李元广<sup>1</sup>

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 华东理工大学 药学院, 上海 200237

贾敬, 徐殿胜, 庄秀园, 等. 小球藻热水提取物功能成分的活性跟踪分离. 生物工程学报, 2017, 33(5): 743-756.

Jia J, Xu DS, Zhuang XY, et al. Bioassay-guided isolation of functional components from hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa*. Chin J Biotech, 2017, 33(5): 743-756.

**摘要:** 本研究旨在以自由基清除作用和促巨噬细胞增殖作用为导向, 对小球藻热水提取物 (CPE) 的分离纯化产物进行活性跟踪, 以确定 CPE 的主要功能成分。采用高压热水提取、Sevag 除蛋白、乙醇沉淀和超滤的方法得到 CPE 粗多糖, 然后通过 DEAE52 离子交换层析柱和 Sephadex G-100 对 CPE 粗多糖组分进一步分离纯化。研究表明, 通过上述方法对 CPE 进行分离纯化, 得到 3 种高活性成分 PS-1-4-2、PS-1-3-2 和 PS-2-3-3, 经凝胶渗透色谱 GPC 分析得知其分子质量分别为  $3.97 \times 10^4$  Da、 $2.28 \times 10^4$  Da 和  $4.1 \times 10^3$  Da。活性跟踪结果表明, CPE 能够清除自由基并促进巨噬细胞 Ana-1 细胞生长, 主要是由于其多种活性组分共同发挥作用, 清除自由基作用的功能成分主要集中于 PS-1-3、PS-1-4、PS-2-3 和 PS-2-4, 促 Ana-1 细胞增殖作用的功能成分主要集中于 PS-1-3、PS-1-4 和 PS-2-3。本研究确立了 CPE 主要功能成分的活性筛选手段, 并获得 3 种新型功能成分, 可用于指导小球藻高附加值产品的开发, 从而进一步推动微藻能源的产业化进程, 实现“高附加值微藻产品、微藻能源与微藻固碳”一体化的示范作用。

**关键词:** 小球藻热水提取物, 活性跟踪分离, 自由基清除作用, 促巨噬细胞增殖作用

**Received:** October 15, 2016; **Accepted:** January 16, 2017

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA022004).

**Corresponding authors:** Yuanguang Li. Tel/Fax: +86-21-64250964; E-mail: ygli@ecust.edu.cn

Daojing Zhang. Tel/Fax: +86-21-64252104; E-mail: djz@ecust.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA022004) 资助。

网络出版时间: 2017-04-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170406.1102.001.html>

## Bioassay-guided isolation of functional components from hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa*

Jing Jia<sup>1</sup>, Diansheng Xu<sup>1</sup>, Xiuyuan Zhuang<sup>1</sup>, Daojing Zhang<sup>1</sup>,  
Liming Tao<sup>2</sup>, and Yuanguang Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

<sup>2</sup> School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** The main functional ingredients of hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa* (CPE) were investigated through a bioassay-guided fractionation based on free radical scavenging and macrophage proliferation effects. The main functional ingredients of CPE were polysaccharides (PS) that were isolated by high pressure extraction, Sevag method, ethanol precipitation and ultrafiltration separation. Crude polysaccharides were further separated and purified by ion exchange chromatography DEAE52 and size exclusion chromatography Sephadex G-100. The purified fractions were analyzed by gel permeation chromatography. Molecular weights of the purified fractions PS-1-4-2, PS-1-3-2 and PS-2-3-3 were  $3.97 \times 10^4$ ,  $2.28 \times 10^4$  and  $4.1 \times 10^3$  Da, respectively. Bioassay-guided fractionation results indicated that CPE could remove free radicals and promote Ana-1 cells proliferation, mainly due to its various components working together. The components of free radicals scavenging mainly concentrated in PS-1-3, PS-1-4, PS-2-3 and PS-2-4. The components of Ana-1 proliferation mainly concentrated in PS-1-3, PS-1-4 and PS-2-3. This study established the activity screening method of main functional component from CPE, and got three new functional ingredients. It can be used to guide the development of high value products, further promote the industrialization process of microalgae energy, and realize microalgae 'high value products, microalgae energy and microalgae carbon' integration of exemplary role.

**Keywords:** hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa*, bioassay-guided isolation, free radical scavenging, macrophage proliferation

蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* 是一种食用历史悠久、营养丰富的健康食品<sup>[1]</sup>,具有多种功效,近年来已成为畅销全球的功能性食品,2012年已被我国卫生部公布为新资源食品<sup>[2]</sup>。小球藻功能成分中最引人注目的是一种被称为“小球藻生长因子”的热水提取物 (Hot water extract of *C. pyrenoidosa*, 简称 CPE)。据报道, CPE 在调节免疫活性<sup>[3-4]</sup>、改善代谢综合征<sup>[5-6]</sup>、清除自由基<sup>[7-8]</sup>、清除体内重金属<sup>[9-10]</sup>等方面具有良好功效。由于 CPE 为非脂溶性物质,从小球藻中提取油脂后并不影响 CPE 的活性,因此,从提取油脂后的藻渣中获得 CPE 等高附加值产品,则可降低微藻开发生物能源的生产成本,

推动微藻能源产业化的进程<sup>[11]</sup>。

活性氧 (ROS) 包括羟自由基、超氧阴离子、双氧水和 NO 等<sup>[12]</sup>,是有机体进行代谢产生的。ROS 能减弱生物体的正常代谢系统,造成各种畸形,如心肌缺氧、致癌、炎症和阿尔兹海默症等<sup>[13]</sup>。羟自由基是化学性质最活泼的活性氧,其反应速度快,是对机体危害最大的自由基<sup>[14]</sup>。ROS 的平衡是保持机体氧化还原平衡的重要条件<sup>[15]</sup>。近年来关于抗氧化活性物质的研究报道很多,Seok 等<sup>[16]</sup>从椭圆小球藻 *Chlorella ellipsoidea* 中分离得到一种抗氧化多肽。Rafiqzaman 等<sup>[17]</sup>从裙带菜中分离得到的一种分子质量为 10 000 Da 的糖蛋白,具有清除自由基、免疫调节和保护 DNA 免

受损伤的作用。然而,遗憾的是这些物质的抗氧化活性均不高,且质量浓度需在 1-10 mg/mL 时才能发挥作用。

Erick 等<sup>[18]</sup>从 *C. pyrenoidosa* 中分离得到一种磷酸化多聚糖,能够调节巨噬细胞 NO 的分泌。Hsu 等<sup>[19]</sup>对巨噬细胞的免疫刺激活性进行研究,发现小球藻多糖通过 toll 样受体 4 (TLR4) 介导的蛋白激酶信号通路活化巨噬细胞。巨噬细胞作为抵抗病原微生物的第一道防线,具有清除机体损伤组织细胞、吞噬外源病菌并激活其他免疫细胞的作用,同时还可作为抗原呈呈细胞与 T 细胞相互作用启动免疫反应<sup>[20]</sup>。因此常被作为研究免疫调节活性的靶标。

庄秀园等<sup>[11]</sup>指出不同原料来源、提取方法及活性跟踪筛选技术得到的 CPE 产物的活性存在差异。根据国内外文献报道,CPE 的研究主要集中于抗肿瘤与免疫调节活性,而作为一种水溶性混合物,CPE 中起关键作用的主要活性成分至今没有确切定论。前期研究中发现,利用高压热水萃取法制备的 CPE 在得率和生物活性方面具有明显优势<sup>[21]</sup>,初步活性跟踪表明,经 Sevag 除蛋白、乙醇沉淀制备的多糖,在清除自由基及免疫调节活性方面更显著。本文以高产油脂的“异养-稀释-光诱导”串联培养新模式生产的 *C. pyrenoidosa* 藻粉为原料,以自由基清除作用和促巨噬细胞 (Ana-1) 增殖作用为活性跟踪指标,对上述粗多糖进一步分离纯化,以期获得 CPE 中的主要功能成分。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

蛋白核小球藻藻粉由嘉兴泽元生物制品有限责任公司提供;透析袋购于北京鼎国科技有

限公司,截留分子量为 3 500 Da;二乙基氨基乙基 52 (DEAE52) 购于 Whatman 公司;葡聚糖凝胶 (Sephadex G-100) 购于 GE 公司;羟自由基试剂盒和超氧阴离子自由基试剂盒购于南京建成生物有限公司;Ana-1 购于中国科学院细胞库;RPMI1640 培养基为 Hyclone 公司产品;胎牛血清 (FBS) 为 Biosun 产品;其他试剂均为化学纯或分析纯。

### 1.2 CPE 粗多糖的制备

510 g 藻粉均匀悬浮于 5 100 mL 蒸馏水中,置于高压灭菌锅中,于 121 °C (压力为 0.1 MPa) 萃取 40 min。待冷却后 10 000 r/min 离心 30 min,取上清。离心后的藻泥于等量蒸馏水中重悬,以相同条件进行提取处理,取上清。两次上清经减压抽滤浓缩后合并,冷冻干燥备用,得 CPE 粗组分。

CPE 粗组分溶解于水后经 Sevag 法除蛋白,80%乙醇沉淀得到粗多糖组分 PS。将 PS 组分溶于适量蒸馏水中,于 10 000 Da 超滤离心管中超滤离心,6 000 r/min 离心 40 min,分别收集两部分液体,80%乙醇溶液沉淀,60 °C 烘干。经超滤离心分离得到的高分子量 (大于 10 000 Da) 的组分记为 PS-1,低分子量 (小于 10 000 Da) 的组分记为 PS-2。

### 1.3 CPE 粗多糖的分离纯化

CPE 粗多糖组分 PS-1/PS-2 高活性组分经 DEAE52 柱层析 (5 cm×25 cm),以浓度为 0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mol/L 的 NaCl 溶液梯度洗脱,透析浓缩,冻干备用。

PS-1/PS-2 经离子交换柱层析后产物中活性较高的组分上样至 Sephadex G-100 柱 (1.9 cm×10 cm),以 3 倍体积的蒸馏水洗脱,洗脱液以 5 mL/管收集,根据苯酚硫酸法测总糖含量、

280 nm 检测蛋白质的吸收峰、合并糖吸收峰和蛋白质吸收峰，经减压浓缩，冷冻干燥，保存备用。

#### 1.4 CPE 多糖纯化组分分析

采用苯酚-硫酸法测定样品的总糖含量，考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

纯化后的样品 PS-1-4-2 和 PS-1-3-2 采用高效液相色谱分析纯度和分子量，色谱条件为：美国 Agilent1200series 高效液相色谱仪 (Agilent Chemstation 控制系统及凝胶渗透色谱 GPC 数据处理软件)，色谱柱 Ultrahydrogel 2 000 和 500 两根多糖专用凝胶色谱柱串联 (柱长 300 mm，内径 7.8 mm，排阻限分别为  $7 \times 10^6$  和  $4 \times 10^5$  Da)，以 0.1 mol/L  $\text{NaNO}_3$  溶液为流动相，流速为 0.5 mL/min，柱温度 25 °C，示差折光检测器，分子量标准物质为 pullulan 多糖。

纯化后的样品 PS-2-3-3 采用高效液相色谱分析纯度和分子量，色谱条件为：美国 Agilent1200series 高效液相色谱仪 (Agilent Chemstation 控制系统及凝胶渗透色谱 GPC 数据处理软件)，色谱柱 Shodex KS 802 和 804 两根多糖专用凝胶色谱柱串联 (柱长 300 mm，内径 8 mm，排阻极限分别为  $4 \times 10^5$  和  $1 \times 10^4$  Da)，以 0.2 mol/L  $\text{NaCl}$  溶液为流动相，流速为 0.8 mL/min，柱温度 25 °C，示差折光检测器，分子量标准物质为 pullulan 多糖。

表 1 CPE 粗产物的得率及组分分析

Table 1 Yield and composition analysis of crude extracts from CPE

Sample	Yield (mg/g <i>Chlorella</i> )	Total sugar (mg/g sample)	Protein (mg/g sample)
CPE	—	185.33±0.01	248.65±3.05
PS	31.55	221.54±0.01	77.78±0.01
PS-1	27.50	410.95±0.02	219.44±0.02
PS-2	20.90	126.43±0.00	267.78±0.01

#### 1.5 CPE 多糖组分抗氧化活性跟踪

CPE 多糖组分的清除自由基活性检测按照南京建成有限公司的羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 试剂盒指示进行操作。样品的自由基清除能力根据下述公式进行计算，以样品对  $\cdot\text{OH}$  的百分清除率表示。

$$\text{自由基清除率(\%)} = \frac{\text{对照组OD值} - \text{样品管OD值}}{\text{对照管OD值}} \times 100$$

#### 1.6 CPE 多糖组分促 Ana-1 增殖活性跟踪

CPE 多糖组分促 Ana-1 增殖活性以 Ana-1 细胞存活率表示。采用 MTT 法检测 CPE 组分对 Ana-1 细胞存活率的影响。根据公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{受试细胞OD值}}{\text{对照细胞OD值}} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 CPE 粗多糖得率及组分分析

CPE 粗产物的得率及组分分析如表 1 所示，PS-1 和 PS-2 的得率分别为 27.50 mg/g 藻粉和 20.90 mg/g 藻粉。

表 1 可知 CPE 中蛋白质组分的含量高于总糖含量，经 Sevag 试剂去除游离蛋白后的 PS 糖含量明显升高。经超滤离心后得到的组分中 PS-1 的糖含量明显升高，并且含有丰富的蛋白质。PS-2 组分以蛋白质为主，并且含有较为丰富的糖。

## 2.2 CPE 多糖分离纯化产物得率及组分分析

表 2 为 PS-1 离子交换产物得率及组分分析, PS-1 经 DEAE52 离子交换层析分离得到的组分中得率最高为 PS-1-1, PS-1-6 的得率最低, 仅为 0.25 mg/g 藻粉。总糖和蛋白质含量分析可知 PS-1 经离子交换层析分离后产物中含有较为丰富的总糖和蛋白质。

PS-2 离子交换产物得率及组分分析如表 3 所示, PS-2 经 DEAE52 离子交换层析分离得到的组分得率都很低, 最高得率为 PS-2-2, 为 3.56 mg/g 藻粉。由总糖和蛋白质含量分析可知, PS-2 经离子交换层析分离后产物中同样含有较为丰富的总糖和蛋白质, 其中 PS-2-1 的蛋白质较为丰富, 总糖相对其他组分为最高; PS-2-3 的蛋白质含量最低, 总糖含量较高; 而 PS-2-4 的蛋白

质含量却远远高于糖含量。

## 2.3 CPE 多糖抗氧化活性跟踪

### 2.3.1 CPE 粗多糖·OH 清除能力测试

CPE 和 PS 均具有自由基清除活性 (图 1)。在质量浓度 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, PS 对·OH 的清除率为 87.5% ( $P < 0.01$ , 与空白对照相比), 是 Vc 的 89.3%。CPE 和 PS 的清除活性均具有浓度依赖关系。与 CPE 相比, PS 对·OH 的清除活性明显升高, 与前期研究中多糖的抗氧化活性优于蛋白质的活性一致<sup>[21]</sup>。

CPE 多糖超滤分离组分·OH 清除能力如图 2 所示, PS-1 和 PS-2 均具有较强的·OH 清除能力, 与空白对照相比, 清除能力具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。浓度为 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时 PS-1 的清除率高达 78.81%, PS-2 的清除率高达 79.94%。通

表 2 PS-1 离子交换产物得率及组分分析

Table 2 Yield and composition analysis of components isolated from PS-1 by ion exchange chromatography

Sample	Yield (mg/g <i>Chlorella</i> )	Total sugar (mg/g sample)	Protein (mg/g sample)
PS-1-1	23.26	136.0 $\pm$ 0.04	106.67 $\pm$ 0.01
PS-1-2	3.63	71.40 $\pm$ 0.01	54.47 $\pm$ 0.03
PS-1-3	4.52	87.19 $\pm$ 0.02	111.67 $\pm$ 0.01
PS-1-4	2.17	51.40 $\pm$ 0.02	76.67 $\pm$ 0.01
PS-1-5	0.45	81.80 $\pm$ 0.02	52.78 $\pm$ 0.01
PS-1-6	0.25	0.00 $\pm$ 0.01	66.12 $\pm$ 0.01

表 3 PS-2 离子交换产物得率及组分分析

Table 3 Yield and composition analysis of components isolated from PS-2 by ion exchange chromatography

Sample	Yield (mg/g <i>Chlorella</i> )	Total sugar (mg/g sample)	Protein (mg/g sample)
PS-2-1	1.79	104.51 $\pm$ 0.01	963.89 $\pm$ 0.04
PS-2-2	3.56	40.90 $\pm$ 0.02	180.56 $\pm$ 0.03
PS-2-3	1.57	40.24 $\pm$ 0.00	15.00 $\pm$ 0.01
PS-2-4	2.21	25.00 $\pm$ 0.00	107.22 $\pm$ 0.01
PS-2-5	0.21	27.99 $\pm$ 0.00	73.89 $\pm$ 0.01
PS-2-6	0.22	24.58 $\pm$ 0.00	25.98 $\pm$ 0.02

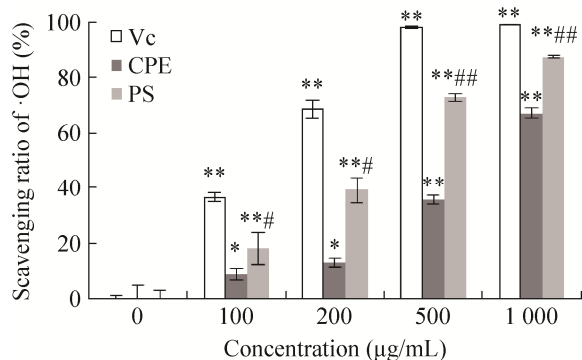


图1 CPE粗多糖·OH清除能力 ( $n=6$ )

Fig. 1 ·OH scavenging capacity of crude polysaccharides from CPE. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with CPE.

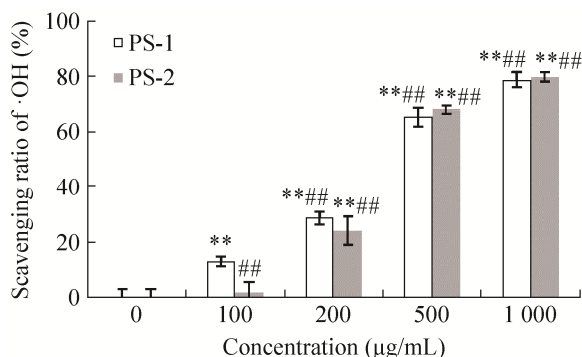


图2 CPE多糖超滤分离组分·OH清除能力 ( $n=6$ )

Fig. 2 ·OH scavenging capacity of ultrafiltration components from PS. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with PS.

过组间比较发现, PS-1和PS-2清除能力未达到显著性差异 ( $P>0.05$ ), 表明PS-1和PS-2的清除能力无明显差异, 因此PS-1和PS-2均存在具有抗氧化能力的功能成分, 需对两种组分分别进行活性跟踪。

### 2.3.2 PS-1离子交换产物·OH清除能力测试

PS-1离子交换产物·OH清除能力如图3所示。图3表明PS-1-2、PS-1-3、PS-1-4均具有一定的·OH清除能力, 且具有浓度依赖关系。其中PS-1-4的清除率在1000 µg/mL时高达

81.73%, 为Vc的82.50%。PS-1-3和PS-1-4的清除能力均明显高于PS-1-1、PS-1-2、PS-1-5和PS-1-6的活性, 且PS-1-3和PS-1-4的组间数据具有统计学意义。PS-1主要为分子质量大于10000 Da的CPE多糖成分, 上述结果表明, CPE中大分子质量多糖的活性成分主要存在于PS-1-3或PS-1-4中, 或者两者均有。

### 2.3.3 PS-2离子交换产物·OH自由基清除能力测试

PS-2离子交换产物·OH清除能力如图4所示。PS-2-1、PS-2-2、PS-2-3和PS-2-4都具有一定的自由基清除能力, 且具有浓度依赖关系。PS-2-3和PS-2-4在1000 µg/mL的清除率明显高于其他组分。PS-2为分子质量小于10000 Da的CPE多糖成分, 研究表明分子质量较小的组分中的活性成分主要存在于PS-2-3或PS-2-4, 或两者都有, 但其他组分中也含有部分活性较弱的成分。

### 2.3.4 PS-1-4纯化组分·OH自由基清除能力测试

PS-1和PS-2经过DEAE52分离得到的组分中, 活性相对较高的为PS-1-3、PS-1-4、PS-2-3和PS-2-4。选取活性最高、分子质量较大的组分PS-1-4和分子量较低的组分PS-2-3, 对其进行Sephadex G-100纯化, 根据洗脱曲线收集组分, 以自由基清除率为跟踪指标, 对其组分进行活性评价。

PS-1-4纯化组分·OH自由基清除能力结果如图5所示, PS-1-4纯化得到的2种组分都有一定程度的·OH清除能力。经活性比较, PS-1-4-2组分的清除能力优于PS-1-4-3, 与空白对照相比, PS-1-4-2的清除率达到极其显著水平; 与PS-1-4相比, PS-1-4-2和PS-1-4-3在1000 µg/mL时具有显著的清除能力。

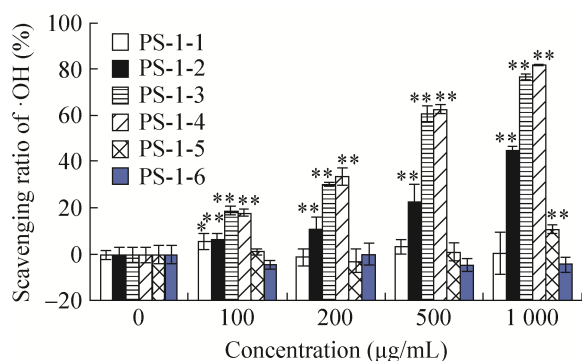


图3 PS-1 离子交换产物·OH 清除能力 ( $n=6$ )

Fig. 3 ·OH scavenging capacity of components isolated from PS-1 by ion exchange chromatography ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control.

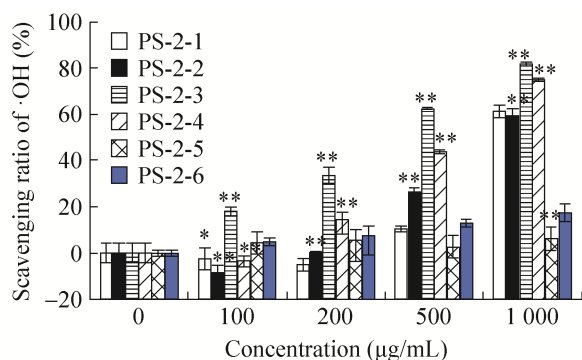


图4 PS-2 离子交换产物·OH 清除能力 ( $n=6$ )

Fig. 4 ·OH scavenging capacity of components isolated from PS-2 by ion exchange chromatography ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control.

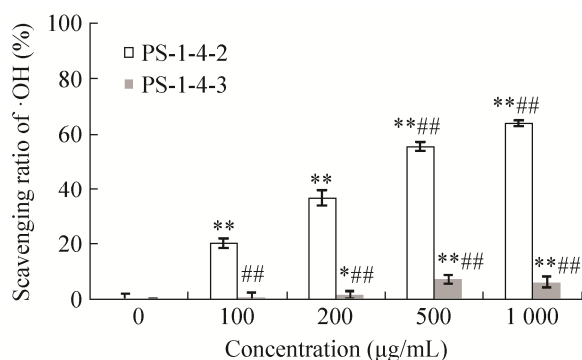


图5 PS-1-4 Sephadex G-100 产物·OH 清除能力 ( $n=6$ )

Fig. 5 ·OH scavenging capacity of components from PS-1-4 by Sephadex G-100. \*\* $P<0.01$  compared with control; ### $P<0.01$  compared with PS-1-4.

### 2.3.5 PS-2-3 纯化组分·OH 清除能力测试

PS-2-3 纯化组分·OH 清除能力结果如图 6 所示。PS-2-3 经 Sephacryl S-100 纯化得到 5 种组分,均能够有效清除反应体系内的·OH。通过活性比较,5 种组分中清除自由基活性最高的组分为 PS-2-3-2, 1 000  $\mu\text{g/mL}$  的清除率高达 84.83%, 且具有浓度依赖关系。PS-2-3-2 的得率很低, 不足以用于进一步纯化或结构鉴定。PS-2-3-3 具有很高的清除·OH 活性, 清除能力仅次于 PS-2-3-2, 1 000  $\mu\text{g/mL}$  的清除率高达 78.86%, 且具有浓度依赖关系。

## 2.4 CPE 多糖促细胞增殖能力测试

### 2.4.1 CPE 粗多糖促细胞增殖能力测试

与 CPE 相比,PS 的促细胞增殖活性显著增强(图 7)。在浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时, PS 作用下细胞的存活率高达 168%, 高于同浓度 CPE 作用下的细胞存活率(129%)。

PS-1 和 PS-2 都能够促进 Ana-1 细胞生长, 其促增殖作用均具有浓度依赖关系(图 8)。其中 PS-1 的促增殖活性明显高于 PS-2, 在质量浓度为 300  $\mu\text{g/mL}$  时促增殖活性达到 299%。由于 Ana-1 细胞是常见的免疫调节细胞, CPE 及其分离组分能显著促进其生长, 可能与 Ana-1 细胞的激活有关, 进而通过调节机体的免疫系统发挥作用。

### 2.4.2 PS-1 离子交换产物促细胞增殖能力测试

由于 PS-1 具有极强的促 Ana-1 细胞增殖能力, 因此通过 DEAE52 分离得到 PS-1 的主要组分, 对其进行活性评价, 结果如图 9 所示。PS-1-2、PS-1-3、PS-1-4 组分都能够有效促进 Ana-1 细胞生长。其中 PS-1-4 具有明显的浓度依赖关系, 在质量浓度为 300  $\mu\text{g/mL}$  时, 促增殖能力达到 60%。

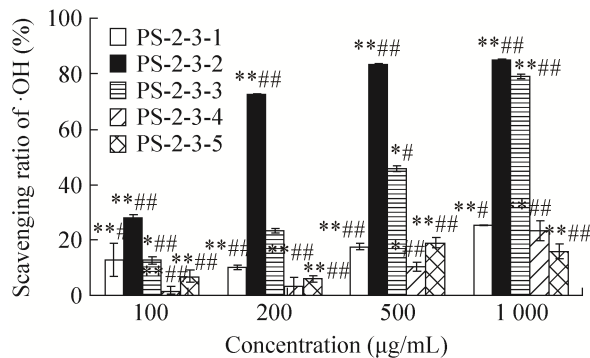


图 6 PS-2-3 Sephacryl S-100 产物·OH 自由基清除能力 ( $n=6$ )

Fig. 6 ·OH scavenging capacity of components from PS-2-3 by Sephacryl S-100. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; ## $P<0.01$  compared with PS-2-3.

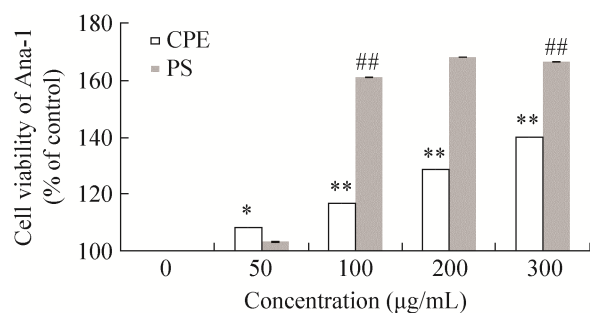


图 7 CPE 粗多糖对 Ana-1 细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig. 7 Ana-1 cell viability of crude polysacchride from CPE ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; ## $P<0.01$  compared with CPE.

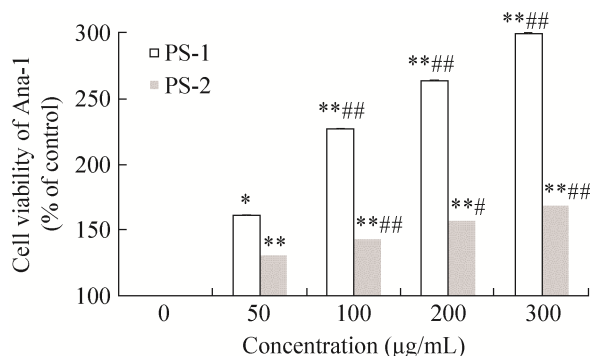


图 8 CPE 多糖超滤组分对 Ana-1 细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig. 8 Ana-1 cell viability of components from PS by ultrafiltration ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with PS.

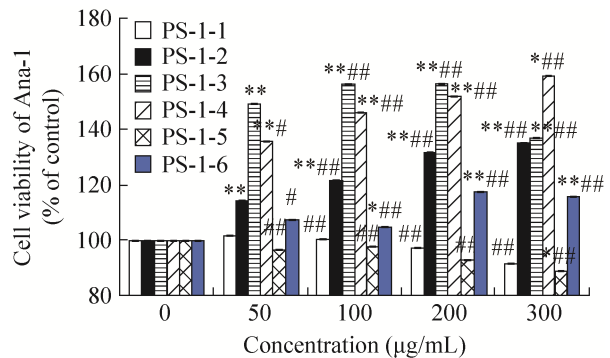


图 9 PS-1 离子交换层析产物对 Ana-1 细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig. 9 Ana-1 cell viability of components from PS-1 by ion exchange chromatography ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  compared with PS-1.

#### 2.4.3 PS-2 离子交换组分促细胞增殖能力测试

PS-2-3 能够有效地促进 Ana-1 细胞生长, 且具有浓度依赖关系, 在质量浓度为 300  $\mu\text{g/mL}$  时, 促增殖能力达到 51% (图 10)。PS-2-1、PS-2-2、PS-2-4、PS-2-5 和 PS-2-6 均能够不同程度地促进 Ana-1 细胞的生长, 但促增殖率低于 20%。

#### 2.4.4 PS-1-4 纯化组分促细胞增殖能力测试

PS-1-4 经 Sephadex G-100 纯化组分对 Ana-1 细胞存活率的影响如图 11 所示。PS-1-4 纯化组分中 2 种组分均能够促进细胞生长, 其中 PS-1-4-2 的促增殖作用相对较高, 200  $\mu\text{g/mL}$  时促增殖率达到了 87%。PS-1-4-2 和 PS-1-4-3 对 Ana-1 细胞存活率的影响与剂量存在一定的效应关系。

#### 2.4.5 PS-1-3 纯化组分促细胞增殖能力测试

PS-1-3 经 Sephadex G-100 纯化组分对 Ana-1 细胞存活率的影响如图 12 所示。PS-1-3-2 在 200  $\mu\text{g/mL}$  时促细胞增殖能力最高, 促增殖率达到了 49%; PS-1-3-3 在质量浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时, 促增殖率为 24%。

#### 2.4.6 PS-2-3 纯化组分促细胞增殖能力测试

PS-2-3 经 Sephacryl S-100 纯化组分对 Ana-1



细胞存活率的影响如图 13 所示。图 13 表明 PS-2-3-3 能够显著地促进 Ana-1 细胞生长,且具有浓度依赖关系,在质量浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,促增殖能力达到 42%。与 PS-2-3-3 相比,PS-2-3-2 具有同样的促进细胞生长的活性,并且在测试浓度范围内,促增殖率与浓度呈正相关。在浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,PS-2-3-2 的促细胞增殖率为 34%,略低于 PS-2-3-3 的活性。

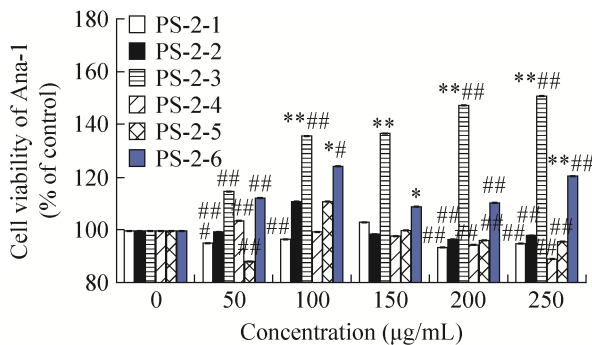


图 10 PS-2 离子交换层析组分对 Ana-1 细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig. 10 Ana-1 cell viability of components from PS-2 by ion exchange chromatography ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; # $P<0.05$ , ### $P<0.01$  compared with PS-2.

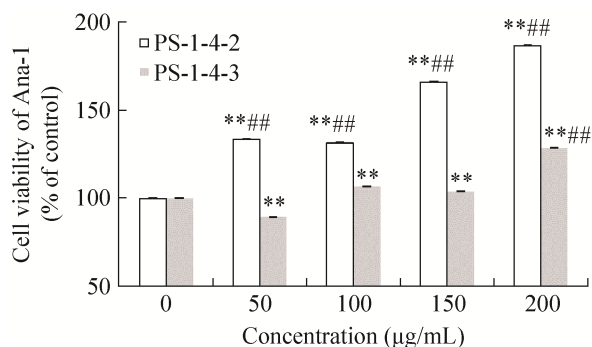


图 11 PS-1-4 Sephadex G-100 组分对 Ana-1 细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig. 11 Ana-1 cell viability of components from PS-1-4 by Sephadex G-100 ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control.

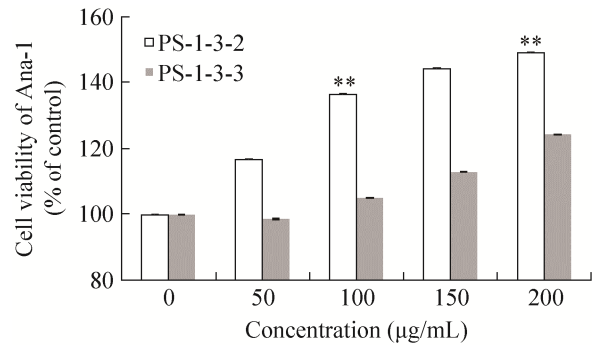


图 12 PS-1-3 Sephadex G-100 组分对 Ana-1 细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig. 12 Ana-1 cell viability of components from PS-1-3 by Sephadex G-100 ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; # $P<0.05$ , ### $P<0.01$  compared with PS-1-3.

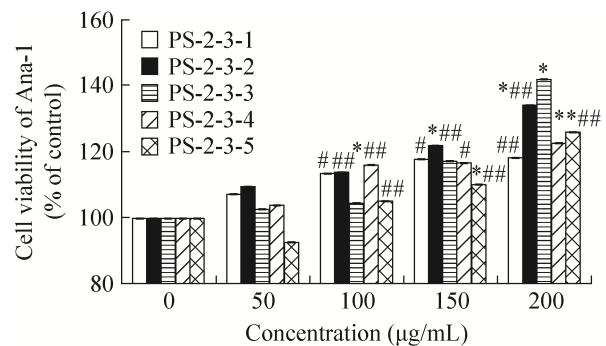


图 13 PS-2-3 Sephacryl S-100 组分对 Ana-1 细胞存活率的影响 ( $n=6$ )

Fig. 3 Ana-1 cell viability of components from PS-2-3 by Sephacryl S-100 ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control; # $P<0.05$ , ### $P<0.01$  compared with PS-2-3.

## 2.5 纯化组分的分子量测定

纯化组分 PS-1-4-2 和 PS-1-3-2 采用 GPC 检测,结果如图 14 所示。图 14A 中显示 PS-1-4-2 组分经 GPC 色谱分析,示差折光检测器和 UV 检测器信号(图 14B)表明,PS-1-4-2 组分是一种复合多糖,可能为糖蛋白、糖肽或蛋白聚糖。由已知分子量的普鲁兰多糖制定校正曲线,根据多糖纯化产物的保留时间,由 GPC 软件分析

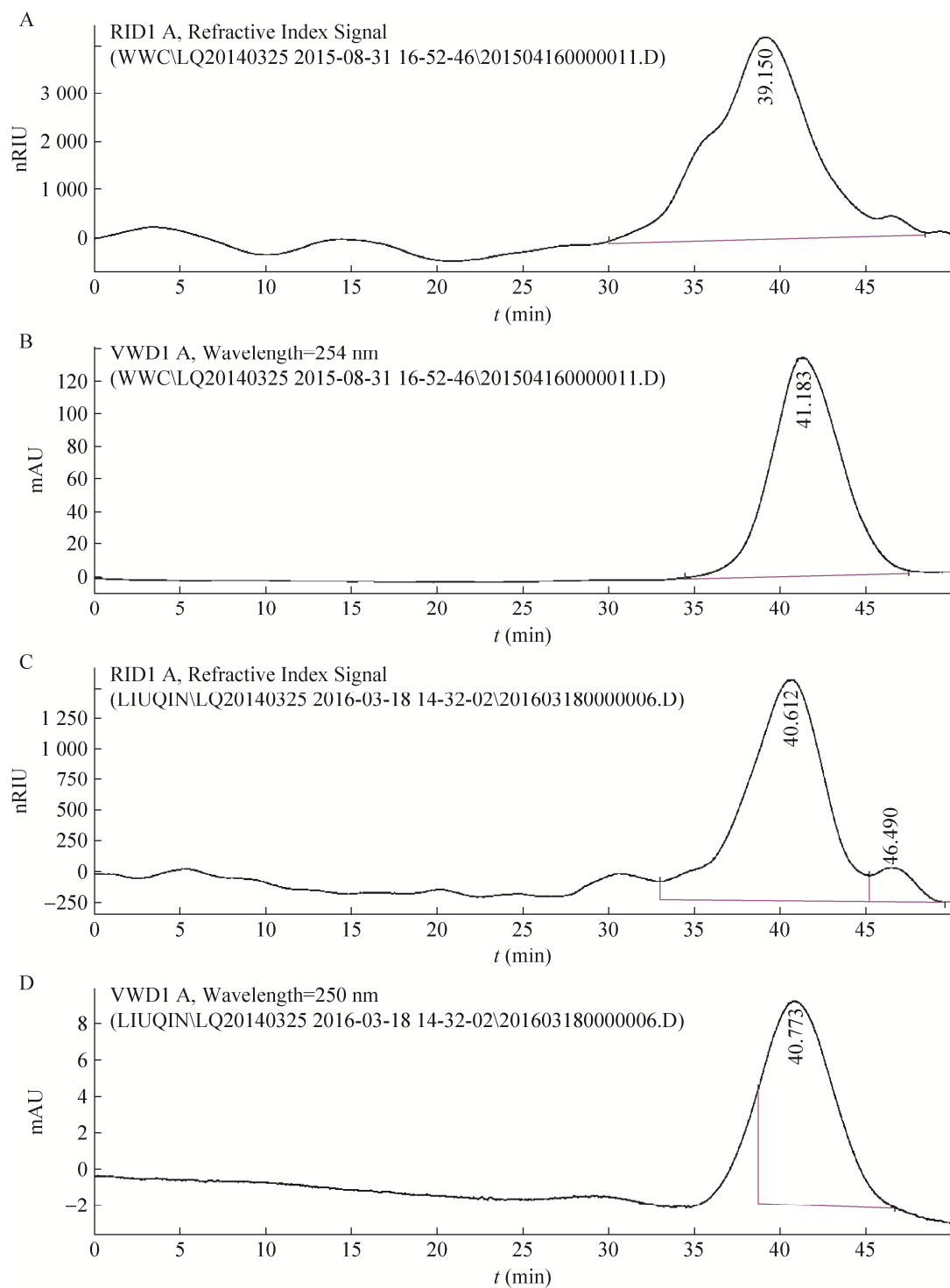


图 14 PS-1-4-2 和 PS-1-3-2 的凝胶渗透色谱图

Fig. 14 Gel permeation chromatogram of PS-1-4-2 and PS-1-3-2. (A, C) Results from refractive index test. (B, D) Results in 254 nm.

得到 PS-1-4-2 的重均分子量  $M_w=3.97 \times 10^4$  Da, 数均分子量  $M_n=1.12 \times 10^3$  Da。示差折光检测器信号显示, 样品出峰时间为 39.150 min。

与 PS-1-4-2 相似, PS-1-3-2 经 GPC 软件分析 (图 14C 和图 14D), 其重均分子量  $M_w=2.28 \times 10^4$  Da, 数均分子量  $M_n=5.92 \times 10^3$  Da, 出峰时间为 40.612 min。且 PS-1-3-2 在 250 nm 处有较强的洗脱峰信号, 说明其为糖蛋白或糖肽。

与 PS-1 分级分离纯化的产物不同的是, PS-2 分级纯化产物分子量较小, 均低于 10 000 Da,

因此 PS-2 通过一系列分离纯化得到的产物 PS-2-3-3 通过 Shodex KS 802 和 804 分析结果如图 15 所示。图 15A 为 PS-2-3-3 产物经淋洗后的示差折光检测的信号, 结果表明, 该产物在 20.354 min 出峰, 纯度为 97.16%。根据标准多糖校正曲线, 得知 PS-2-3-3 组分的  $M_w=4.10 \times 10^3$  Da,  $M_n=3.93 \times 10^3$  Da。图 15B 表明 PS-2-3-3 组分在紫外检测区域 254 nm 处有窄且单一的洗脱峰, 说明其含有蛋白或多肽侧链, 可能为糖蛋白或糖肽等物质。

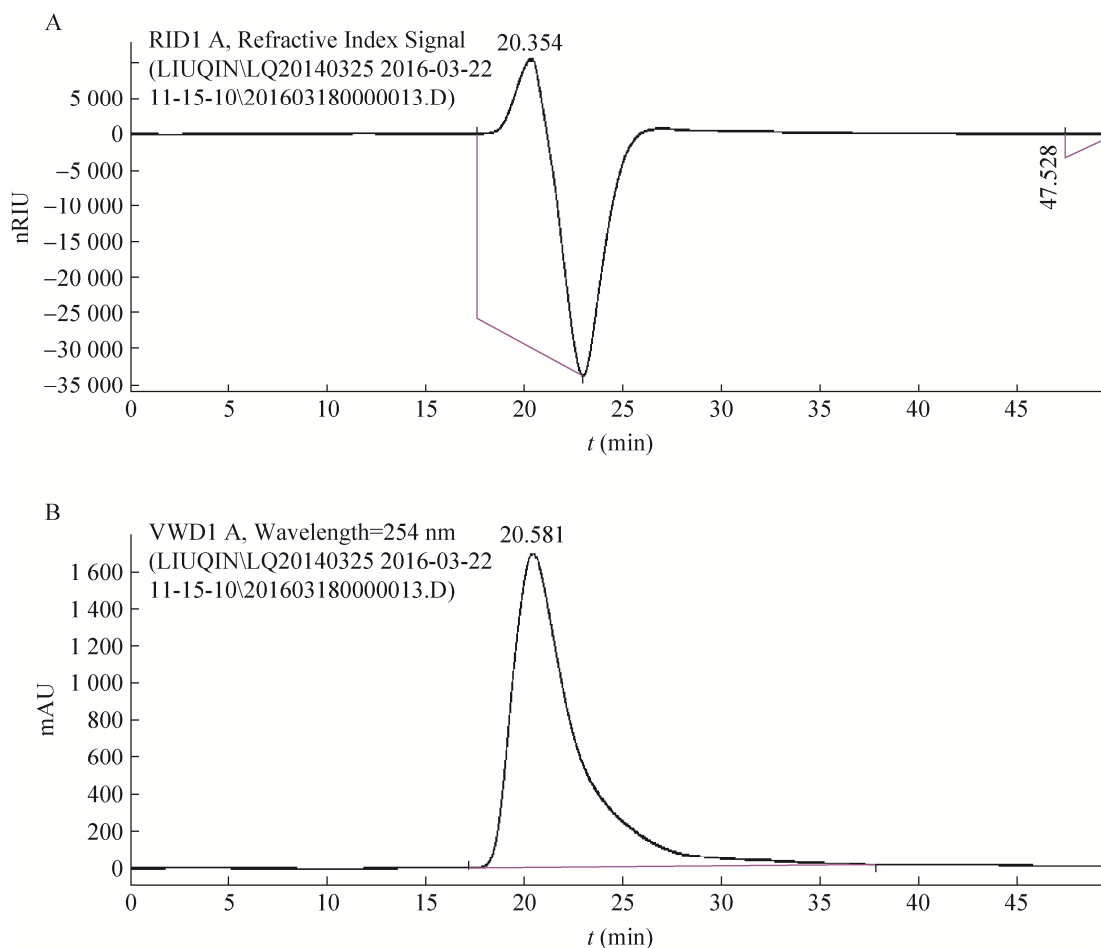


图 15 PS-2-3-3 的凝胶渗透色谱图

Fig. 15 Gel permeation chromatogram of PS-2-3-3. (A) Result from refractive index test. (B) Result in 254 nm.

### 3 结论

笔者所在实验室近年来一直致力于微藻活性成分的研究,前期研究中建立了以“异养-稀释-光诱导”串联培养的新型微藻培养模式<sup>[22]</sup>,实现了小球藻的大规模培养,藻粉来源稳定、营养成分丰富。

本研究分别以自由基清除作用和促巨噬细胞增殖作用作为活性指标,对CPE粗多糖进行分离纯化。以自由基清除作用作为活性跟踪指标的研究表明,CPE多糖粗组分具有较高的抗氧化能力,CPE多糖中的多种组分均能够清除自由基,活性成分主要集中于PS-1-3、PS-1-4、PS-2-3和PS-2-4组分中。在质量浓度为1000 μg/mL时,PS-1-3、PS-1-4、PS-2-3和PS-2-4组分的清除率分别为76.61%、81.73%、80.03%和75.20%,其抗氧化活性高于文献所报道的相同质量浓度的其他物质的多糖组分<sup>[14-23]</sup>。

以促巨噬细胞增殖作用活性跟踪指标的研究表明,CPE多糖能够显著地促进巨噬细胞的生长,其中分子量较高的组分的促增殖作用高于低分子量组分,主要功能成分集中在PS-1-3、PS-1-4和PS-2-3中。质量浓度为300 μg/mL时,PS-1-3、PS-1-4的促增殖率分别为37%、60%;质量浓度为250 μg/mL时,PS-2-3的促增殖率为51%。CPE功能成分的促巨噬细胞增殖活性高于文献报道的相同浓度下的小球藻多糖<sup>[24]</sup>和海带多糖<sup>[25]</sup>,并且其最高促增殖活性与经化学修饰后的银合欢多糖提取物相当<sup>[26]</sup>。

对纯化组分PS-1-4-2、PS-1-3-2和PS-2-3-3进行了结构分析,经GPC分析,其重均分子量分别为 $3.97 \times 10^4$  Da、 $2.28 \times 10^4$  Da和 $4.10 \times 10^3$  Da,由于其在254 nm处有较强的吸收峰,推测其可

能为新结构的糖蛋白。

本文以国内外首创的“异养-稀释-光诱导”培养模式生产的蛋白核小球藻藻粉为原料,对其热水提取物进行一系列的活性跟踪,确立了以抗氧化活性和促巨噬细胞增殖活性为主的跟踪手段,对其进行高压热水提取、Sevag除蛋白、乙醇沉淀、超滤等初步分离,采用离子交换层析以及体积排阻层析等纯化手段,最终得到3种CPE的主要功能成分。这一研究为小球藻作为高附加值产品的众多功效提供了科学依据,同时提高小球藻生物物质的利用率,平衡高附加值产品与高油脂含量的不协调关系,从而进一步推动微藻能源的产业化进程,实现“高附加值微藻产品、微藻能源与微藻固碳”一体化的示范作用。

### REFERENCES

- [1] Powell RC, Nevels EM, McDowell ME. Algae feeding in humans. *J Nutr*, 1961, 75(1): 7-12.
- [2] 关于批准蛋白核小球藻等4种新资源食品的公告(2012年第19号)[EB/OL]. <http://www.nhfp.gov.cn/sps/s7891/201212/5d4c82e89a9e4713aba8f782eca51e09.shtml>.
- [3] An HJ, Rim HK, Jeong HJ, et al. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein-deficient weanling mice and immune cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2010, 32(4): 585-592.
- [4] Kojima M, Ino S, Takase N, et al. Extraction of an active polysaccharide from *Chlorella* cells and its stimulative effect on phagocytotic activity of rat reticuloendothelial system. *Agric Chem Soc Jap J*, 1972, 46(8): 373-380.
- [5] Hidaka S, Okamoto Y, Arita M. A hot water

- extract of *Chlorella pyrenoidosa* reduces body weight and serum lipids in ovariectomized rats. *Phytother Res*, 2004, 18(2): 164–168.
- [6] Tan CY, Zhao Y, Wu D, et al. Study on the culture conditions of *Chlorella* spp. and its inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase. *Fine Spec Chem*, 2011, 19(8): 30–33 (in Chinese).  
谭成玉, 赵莹, 吴迪, 等. 小球藻培养条件及其抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的研究. *精细与专用化学品*, 2011, 19(8): 30–33.
- [7] Kitada K, Machmudan S, Sasaki M, et al. Antioxidant and antibacterial activity of nutraceutical compounds from *Chlorella vulgaris* extracted in hydrothermal condition. *Sep Sci Technol*, 2009, 44(5): 1228–1239.
- [8] Wei WZ. The isolation, purification and screening of the tumor prevention *in vitro* of glycoprotein from *Chlorella pyrenoidosa*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008 (in Chinese).  
魏文志. 小球藻糖蛋白的分离纯化与体外预防肿瘤作用筛选的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [9] Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, et al. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(6): 889–900.
- [10] Hagino N, Ichimura S. Effect of *Chlorella* on fecal and urinary cadmium excretion in ‘Itai-itai’ disease. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 1975, 30(1): 77.
- [11] Zhuang XY, Huang YM, Zhang DJ, et al. Research status and prospect on hot water extract of *Chlorella*: the high value-added bioactive substance from *Chlorella*. *Chin J Biotech*, 2015, 31(1): 24–42 (in Chinese).  
庄秀园, 黄英明, 张道敬, 等. 小球藻高附加值生物活性物质“小球藻热水提取物”的研究现状与展望. *生物工程学报*, 2015, 31(1): 24–42.
- [12] Busbee D, Barhoumi R, Burghardt RC, et al. Protection from glutathione depletion by a glyconutritional mixture of saccharides. *Age*, 1999, 22(4): 159–165.
- [13] Celino FT, Yamaguchi-Shimizu S, Miura C, et al. Proliferating spermatogonia are susceptible to reactive oxygen species attack in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Biol Reprod*, 2012, 87(3): 70.
- [14] Wang JH, Zhang YK, Yao YF, et al. Structure identification and antioxidant activity of a novel triple helical polysaccharide isolated from *Dictyophora indusiata*. *J Chem Pharm Res*, 2015, 7(1): 678–684.
- [15] Armeni T, Principato G, Quiles JL, et al. Mitochondrial dysfunctions during aging: vitamin E deficiency or caloric restriction—two different ways of modulating stress. *J Bioenerg Biomembr*, 2003, 35(2): 181–191.
- [16] Ko SC, Kim D, Jeon YJ. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(7): 2294–2302.
- [17] Rafiquzzaman SM, Kim EY, Kim YR, et al. Antioxidant activity of glycoprotein purified from *Undaria pinnatifida* measured by an *in vitro* digestion model. *Int J Biol Macromol*, 2013, 62: 265–272.
- [18] Suárez ER, Kralovec JA, Grindley TB. Isolation of phosphorylated polysaccharides from algae: the immunostimulatory principle of *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydr Res*, 2010, 345(9): 1190–1204.
- [19] Hsu HY, Jeyashoke N, Yeh CH, et al. Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via Toll-like receptor 4. *J*

- Agric Food Chem, 2010, 58(2): 927–936.
- [20] Zhang Q, Li XM, Li ZJ, et al. Immunomodulatory effects of sea cucumber fucoidan on macrophage and the signaling pathways. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(1): 87–92 (in Chinese).  
张祺, 李学敏, 李兆杰, 等. 海参岩藻聚糖硫酸酯对巨噬细胞的调节作用及信号通路研究. *中国药理学通报*, 2015, 31(1): 87–92.
- [21] Zhuang XY, Zhang DJ, Qin W, et al. A comparison on the preparation of hot water extracts from *Chlorella pyrenoidosa* (CPEs) and radical scavenging and macrophage activation effects of CPEs. *Food Funct*, 2014, 5(12): 3252–3260.
- [22] Fan JH, Huang JK, Li YG, et al. Sequential heterotrophy-dilution-photoinduction cultivation for efficient microalgal biomass and lipid production. *Bioresour Technol*, 2012, 112: 206–211.
- [23] You QH, Yin XL, Zhang SN, et al. Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum Imai*. *Carbohydr Polym*, 2014, 99: 1–10.
- [24] Wang L, Sun LQ, Zhou Y. Immunomodulation activities *in vitro* of polysaccharides from *chlorella* sp.. *Food Res Dev*, 2013, 34(7): 30–33 (in Chinese).  
王凌, 孙利芹, 周妍. 小球藻多糖体外免疫调节活性研究. *食品研究与开发*, 2013, 34(7): 30–33.
- [25] Zha XQ, Lu CQ, Cui SH, et al. Structural identification and immunostimulating activity of a *Laminaria japonica* polysaccharide. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78: 429–438.
- [26] Gamal-Eldeen AM, Amer H, Helmy WA, et al. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6): 871–878.

(本文责编 郝丽芳)