

沙漠小球藻 GTD4C-2 胞内酸性糖的提取优化、纯化及抗氧化活性分析

张凯月,周永顺,韩凯,王璐,陈福龙,高剑峰*

石河子大学生命科学学院,石河子 832003

摘要:本研究通过中心复合设计,采用响应曲面法优化沙漠小球藻 GTD4C-2 (*Chlorella* sp. GTD4C-2) 胞内多糖 (intracellular polysaccharide, IPSs) 提取工艺。得到最佳提取条件:提取时间:1 h;提取温度:80 °C;固液比 (g/mL):1:25。通过最佳提取条件,提取的 IPSs 进行离子色谱分离纯化,而后采用高效凝胶色谱、气相色谱与质谱联用和傅里叶红外技术对 IPSs 进行结构分析。此外,还对其进行 DPPH 和羟基自由基清除能力检测。得到分子量稳定的 IPS-2 和 IPS-3 两种酸性糖,分子量分别为 53.1 kDa 和 25.6 kDa;硫酸基含量分别为 (5.69 ± 0.11)% 和 (8.46 ± 0.03)%;且单糖组成均为葡萄糖、半乳糖。体外抗氧化能力 (以 V_C 为阳性对照):V_C > IPSs > IPS-3 > IPS-2。从沙漠小球藻中分离得到的多糖具有抗氧化能力,且粗提 IPSs 抗氧化活性强于 IPS-2 和 IPS-3。沙漠小球藻多糖在食品、药品和保健品等方面具有广阔的应用前景。

关键词:沙漠小球藻;工艺优化;响应曲面;多糖;抗氧化活性

中图分类号:Q71

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)7-1112-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.7.002

Extraction optimization and purification of intracellular acidic polysaccharides from *Chlorella* sp. GTD4C-2 and their antioxidant activity

ZHANG Kai-yue, ZHOU Yong-shun, HAN Kai, WANG Lu, CHEN Fu-long, GAO Jian-feng*

College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China

Abstract: The optimization of intracellular polysaccharides (IPSs) extraction from *Chlorella* sp. GTD4C-2 was performed using response surface methodology based on a central composite design. The optimal conditions for extraction were determined as follows: an extraction time of 1 h, an extraction temperature of 80 °C, and a solid-to-liquid ratio of 1:25 (g/mL). Subsequently, the extracted IPSs were further purified through ion exchange chromatography. Structural analysis was carried out using high-performance gel permeation chromatography, gas chromatography-mass spectrometry, and Fourier-transform infrared spectroscopy. Additionally, the DPPH radical scavenging activity and hydroxyl radical scavenging capacity of the IPSs were evaluated. The results revealed two stable molecular weight acidic polysaccharides: IPS-2 (53.1 kDa) and IPS-3 (25.6 kDa), both containing glucose and galactose as monosaccharide components. The sulfate content was found to be (5.69 ± 0.11)% for IPS-2 and (8.46 ± 0.03)% for IPS-3. *In vitro* antioxidant activity showed that vitamin C exhibited the highest antioxidant capacity followed by the crude extract of IPSs, then IPS-3, and finally IPS-2. In conclusion, polysaccharides extracted from *Chlorella* sp. GTD4C-2 demonstrated significant antioxidant activity with stronger antioxidative properties observed in the crude extract compared to isolated compounds (IPS-2 and IPS-3). These findings suggest promising applications for *Chlorella* sp. GTD4C-2 polysaccharides in various fields such as food products, pharmaceuticals, and health supplements.

Key words: *Chlorella* sp.; process optimization; response surface; intracellular polysaccharides; antioxidant activity

沙漠微藻,生长在沙漠环境的特殊藻类^[1],含有丰富的蛋白质、油脂和多糖。同时,由于其高油脂

积累能力,沙漠小球藻被认为是一种有潜力的新型生物燃料资源^[2];而多糖则因其抗血凝、抗氧化和抗菌等多种功能,在食品、饲料和医药行业引起广泛关注^[3]。为更好地应用沙漠微藻中的多糖,对其进行分离纯化成为必要前提。多糖的组成与结构对多

收稿日期:2023-12-20

接受日期:2024-04-12

基金项目:国家自然科学基金(31960077,31460276)

*通信作者 Tel:86-017690580905;E-mail:jianfeng@shzu.edu.cn

糖功能探究至关重要^[4], 分子量的大小、单糖组成以及碳链官能团均与其生物活性相关^[5]。

多糖根据是否含有特定的基团将其分为酸性、中性和碱性多糖。酸性多糖具有良好的抗肿瘤作用并对免疫系统产生积极影响^[6], 从而受到广泛研究, 其糖链主干上具有, 硫酸基含量与其生长环境有一定的关系。有研究表明, 硫酸多糖主要存在于海洋藻类, 以及一些哺乳动物(无脊椎动物)、鱼皮和少数盐碱环境的植物中, 大多数陆生植物并不具有, 是因硫酸基可用来抵抗极端的环境如高盐, 高碱^[7], 同时硫酸基含量也与生物活性有着密切关系^[8]。

本实验采用中心复合设计(central composite design, CCD)对沙漠小球藻胞内多糖(intracellular polysaccharides, IPSs)提取工艺进行优化, 可更好、更准确地评估实验数据^[9], 为进一步检测 IPSs 结构与功能奠定良好基础。多糖研究一直是热门话题, 尤其是海洋藻类, 在功能以及安全性上更受大众偏爱, 然而沙漠微藻多糖研究相对较少。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

藻种来自新疆古尔班通古特沙漠, 现存于新疆石河子大学生命科学学院细胞与分子生物学实验室, 通过形态学特征, 以及 18S rRNA 基因特征序列聚类分析鉴定为 *Chlorella* sp. GTD4C-2^[10]。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(纯度 $\geq 98.0\%$, 批号: B25613-20 mg, 北京酷来博科技有限公司); 明胶(纯度 $\geq 99.0\%$, 批号: 10342418, 上海麦克林科技股份有限公司); 透析膜(批号: 20230316, 上海麦克林科技股份有限公司); 葡萄糖标准品(批号: 20230425, 纯度 $\geq 99.0\%$, 上海麦克林科技股份有限公司); 半乳糖标准品(批号: 20230206, 纯度 $\geq 99.0\%$, 上海麦克林科技股份有限公司); 抗坏血酸(V_c)(批号: 20230504, 纯度 $\geq 99.0\%$, 天津市鑫铂特化工有限公司); 水杨酸(批号: 202305018, 天津市光复精细化工研究所); 过氧化氢(批号: 20221209, 上海麦克林科技股份有限公司); 盐酸羟胺(批号: 20230102, 纯度 $\geq 99.0\%$, 上海麦克林科技股份有限公司); 吡啶(批号: 20230306, 纯度 $\geq 99.0\%$, 上海麦克林科技股份有限公司); 乙酸酐(批号: 20230412, 纯度 $\geq 99.0\%$, 上海麦克林科技股份有限公司); 其他实验所用试剂均为分析纯。

1.2 实验仪器

蛋白纯化仪(AKTA pure 25 M, 瑞典 Cytiva 公司); 气质联用仪器(GC-Isolin K II, 美国 Thermo 公司); 氮吹仪(LD-D24SY, 山东莱恩德实验仪器有限公司); 傅里叶红外光谱(FTIR-650, 上海申锐测试设备制造有限公司); 高效液相色谱(U3000, 美国 Thermo 公司); UV 紫外-可见全波长扫描仪(NS9300, 上海舜宇恒平仪器公司); 紫外可见分光光度计(UV-5100, 上海元析仪器有限公司); 抽真空冷冻干燥仪(LGJ-12, 北京松源华兴科技发展有限公司); 示差检测器(Optilab T-rEX, 美国 Wyatt 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 IPSs 提取

将 *Chlorella* sp. GTD4C-2 用培养基(Bold's basal medium, BBM), 12 h/12 h(光照/黑暗)培养。冷冻干燥(0.2 MPa, $-50\text{ }^\circ\text{C}$, 4~5 h)后可得干藻粉。称取干燥小球藻粉 1 g, 置于 4% NaOH(25 mL)溶液中, 超声破碎 10 min(400 W, 超声脉冲持续时间 3.3 s, 等待时间 3.3 s), 然后在 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热 1 h, 离心(8 000 r/min, 15 min); 收集上清液, 加入无水乙醇(1:3)(V/V), 静置过夜; 离心(8 000 r/min, 15 min)取沉淀, 添加适量 3% 三氯乙酸, 搅拌均匀至沉淀不溶解; 离心(8 000 r/min, 15 min)收集上清液, 用三倍体积无水乙醇沉淀上清两次后, 离心(8 000 r/min, 15 min)得沉淀, 经冷冻真空(0.2 MPa, $-50\text{ }^\circ\text{C}$, 4~5 h)即得干燥 IPSs; 储存在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下以供进一步研究。

1.3.2 温度、时间、固液比对 IPSs 提取影响的单因素实验

单因素检测实验以 IPSs 提取方法为基础。提取温度对多糖影响: 固定反应条件固液比(g/mL) 1:25, 提取时间 1 h, 测定不同温度($^\circ\text{C}$) 70、75、80、85、90、95 对 IPSs 提取量的影响。固液比对多糖影响: 固定反应条件提取温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热 1 h, 测定不同固液比(g/mL) 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 对 IPSs 提取量的影响。提取时间对 IPSs 影响: 固定反应条件固液比 1:25, 提取温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$, 测定不同水浴加热时间(h) 0.3、0.6、1.0、1.3、1.6、2.0 对 IPSs 提取量的影响。

1.3.3 响应曲面设计

在单因素实验基础上, 使用 Design-Expert 13.0 软件设计全因子 3 因素 2 水平实验, 具体编码水平如表 1。为了使实验设计具有序贯性, 选择 6 组中心点, 并使用 CCD 响应曲面法优化 IPSs 提取工艺。

表1 响应曲面设计因子水平表

Table 1 Factors and levels in the response surface analysis

水平 Level	因素 Factor		
	A: 提取时间 Extraction time(h)	B: 提取温度 Extraction temperature(°C)	C: 固液比 Solid-liquid ratio(g/mL)
-1	0.5	75	1:30
0	1.0	80	1:25
1	1.5	85	1:20

1.3.4 IPSs 纯化及组成分析

1.3.4.1 IPSs 离子纯化

采用蛋白纯化仪,进行 IPSs 梯度洗脱,将 DEAE Sephacryl FF(1.6 cm × 300 cm)层析柱进行缓冲液平衡,5 mL IPSs(20 mg/mL)水溶液上样。梯度洗脱采用溶于 Tris-HCl(pH = 7.2)洗脱液的 NaCl 溶液浓度依次为:0.00、0.50、1.00 mol/L。采用蒽酮硫酸检测方法对洗脱液中糖含量进行检测。收集纯化后 IPSs 用 10 000 Da 透析袋在去离子水的条件下透析 48 h,而后真空冷冻干燥,-20 °C 冰箱保存。

1.3.4.2 IPSs 纯度鉴定

层析后 IPSs 采用紫外扫描法^[11]在 2 000 ~ 500 nm 波长下进行紫外光谱扫描,检测其在 260 nm 及 280 nm 处的吸收情况,从而判定沙漠小球藻胞内 IPSs 的纯度。

1.3.4.3 硫酸基含量测定

本实验采用硫酸钡比浊法测定硫酸基含量^[12]。样品经过前处理后,移取 0.1 mL 样品后依次加入 1.00 mL 8% 的三氯乙酸水溶液和 1.0 mL 氯化钡溶液(0.5 g 氯化钡溶于 100 mL 明胶溶液)紫外分光光度计在 360 nm 波长下测定浊度。以硫酸钾标准水溶液(0.5、10、15、20、30 μg/mL)建立硫酸基测定标准曲线,回归方程为 $y = 0.0069x - 0.0022$, $R^2 = 0.9924$ 。

1.3.4.4 分子量检测

使用高效液相色谱使用凝胶排阻色谱柱 Ohpak SB-805 HQ(300 mm × 8 mm)和 Ohpak SB-803 HQ(300 mm × 8 mm)串联测定分子量,检测器为 Optilab T-rEX 示差检测器。将样品溶解在 0.1 mol/L NaNO₃ 水溶液(含 0.02% NaN₃, W/W)中,终浓度为 1 mg/mL,并通过孔径为 0.45 μm 的过滤器过滤后上机检测。条件为:色谱柱温 45 °C,进样 100 μL,流动相 A(0.02% NaN₃, 0.1 mol/L NaNO₃),流速 0.6 mL/min。

1.3.4.5 单糖组成检测

采用糖脲乙酸酯衍生法^[13]。依次往 IPSs 水解样品中加入 10 mg 盐酸羟胺和 0.5 mL 吡啶,以及 0.5 mL 乙酸酐,分别使用 1 mL(1 mol/L)盐酸和 1 mL H₂O 进行三次萃取,使用二氯甲烷定容 1 mL,最后过 0.22 μm 尼龙过滤膜,进行气质联用(GC-MS)。条件为:CP-Sil 24 LOWBLEED MS 毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),载气为高纯 He,流速 1.0 mL/min。红外光谱采用 KBr 压片法测定^[14],红外光谱扫描范围 400 ~ 4 000 cm⁻¹。

1.3.4.6 抗氧化活性

根据 Smirnof 等^[15]方法进行 DPPH 自由基清除检测。样品在含有 0.04 mg/mL 的 DPPH 乙醇溶液中采用 96 孔微孔板进行测定。每个样品不同浓度(0.4 ~ 4 mg/mL)进行测试,以维生素 C(vitamin C, V_C)为阳性对照组,黑暗中在室温下保持 30 min,在 517 nm 处测定吸光度。根据公式(1)计算 DPPH 自由基清除率(R_1)。

$$R_1 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_1 为不同浓度下多糖测得的吸光值; A_2 为无水乙醇代替 DPPH 作为样品对照管吸光度; A_0 为无水乙醇代替样品溶液作为空白吸光度。

1.3.4.7 羟基自由基清除检测

根据 Seedeivi 等^[16]方法进行羟基自由基清除检测,以 6 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液和 6 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液与样品反应在 96 孔板中检测,测定其在 510 nm 处吸光值。根据公式(2)计算羟基自由基清除率(R_2)。

$$R_2 = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_0 为用水代替多糖时测得的吸光值; A_1 为不同浓度下多糖测得的吸光值; A_2 为用水代替水杨酸时不同浓度下多糖测得的吸光值。

1.3.5 数据处理

所有检测数据均为3次重复的平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用 Design-Expert 13 进行响应曲面分析,使用 Origin 2022 绘图,使用 SPSS 20 进行 ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 结果

2.1.1 温度、时间、固液比对 IPSs 提取影响的单因素实验

如图1所示,温度、时间和固液比对 IPSs 提取量(g/g)有影响。在70~80℃时,随着温度升高,IPSs 提取量显著增加($P < 0.01$);然而,在进一步升温后,其对提取含量几乎无影响。不同固液比和提取时间数值的增大会导致 IPSs 含量呈先上升后下降趋势。当时间为1~1.3 h,IPSs 提取量达到最大值,之后开始下降。结果表明,IPSs 提取量会受到多种因素的影响而产生改变,需要进一步的研究和优化。

2.1.2 响应曲面优化实验

根据单因素实验结果,按照 CCD 设计试验,总共进行20组试验,其中14组析因点,6组中心点,以 Design-Expert 13 对数据进行多元回归拟合分析,建立二次回归模型。由此得 IPSs 多糖提取工艺的

二次多项回归方程:

$$Y = 0.0551 + 0.0015A + 0.0049B + 0.0026C + 0.0038AB - 0.0030AC + 0.0007BC - 0.0157A^2 - 0.0114B^2 - 0.0154C^2$$

根据表2结果显示,CCD模型的 F 值为48.77, $P < 0.0001$,由此认定该模型具有极显著性;失拟项为0.1351,差异不显著($P > 0.05$),模型能够充分体现实验情况。模型相关系数 $R^2 = 0.9777$, $R^2_{adj} = 0.9577$,表明实验结果与模型预测结果具有良好的相关性,实验误差小可重复。因此,该模型可用于预测沙漠小球藻 IPSs 提取量的实验结果。通过模型呈现弯曲趋势可知,模型中 C 和 AB 对 IPSs 提取量具有显著影响, B 、 A^2 、 B^2 、 C^2 对 IPSs 提取量具有极显著影响,证明温度、固液比和时间均对 IPSs 提取具有复合影响,表明实验的可行性和必要性。各因素对 IPSs 提取量的影响大小顺序为:提取温度>固液比>提取时间。

由图2可知,两因素交互效应三维响应面分析结果显示出明显的坡度,同时,通过等高线图可以观察到 AB 等高线为椭圆形,说明其相互作用显著。 BC 更加接近圆形,说明其相互作用较小。基于 Design-Expert 13.0 分析结果得知,在时间1.03 h、温度

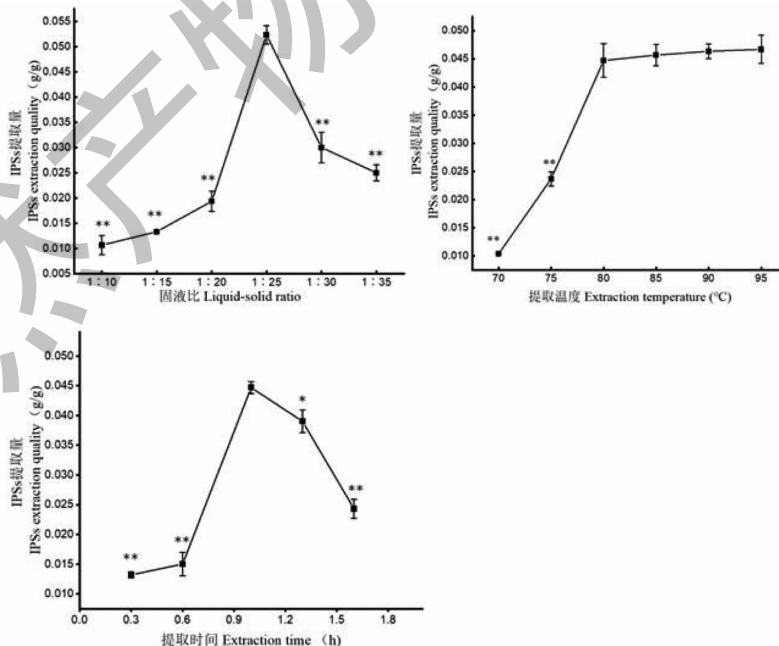


图1 单因素实验结果

Fig. 1 Single factor experimental results

注:*与最高值相比,差异显著($P < 0.05$);**与最高值相比,差异极显著($P < 0.01$)。Note:* Compared with the highest value, significant difference ($P < 0.05$); ** Compared with the highest value, very significant difference ($P < 0.01$).

表 2 回归模拟方差分析结果

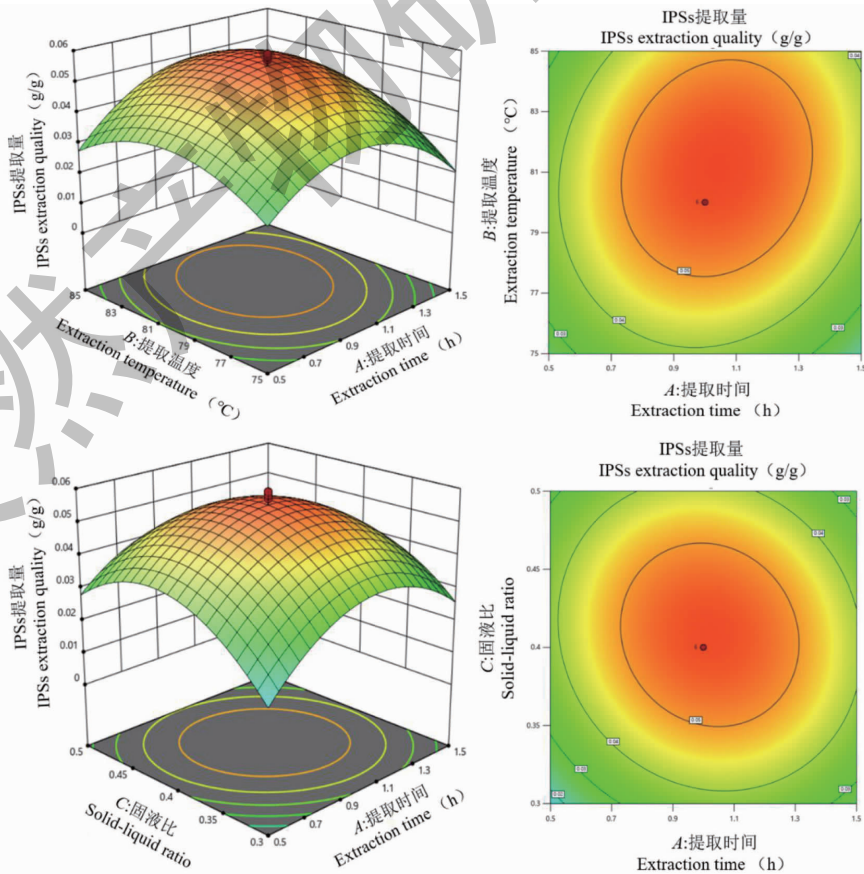
Table 2 shows the results of regression simulation analysis of variance

差异来源 Source	均方 Mean square	F	P	显著性 Significance
Model 模型	0.000 9	48.77	<0.000 1	**
A	0.000 0	1.77	0.213 5	-
B	0.000 3	17.67	0.001 8	**
C	0.000 1	5.07	0.048 0	*
AB	0.000 1	6.12	0.032 8	*
AC	0.000 1	3.92	0.075 9	-
BC	0.000 000 45	0.2449	0.631 4	-
A ²	0.003 5	192.37	<0.000 1	**
B ²	0.001 9	102.26	<0.000 1	**
C ²	0.003 4	186.77	<0.000 1	**
残差 Residual	0.000 0	-	-	-
失拟项 Lack of fit	0.000 0	2.88	0.135 1	不显著
纯误差 Pure error	0.000 000 946 7	-	-	-
相关系数 Correlation coefficient	R ² = 0.977 7	R ² _{adj} = 0.957 7	-	-

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

81.14 °C、固液比 1:25 的条件下, IPSs 最优提取工艺可获得 0.055 g 提取量。为验证响应模型准确性并结合实际情况, 最终确定优化条件为时间 1 h、温度 80 °C、固液比 1:25, 在此条件下进行 3 次实验。

实验结果显示 IPSs 提取量为 (0.054 ± 0.002) g, 超过 *Dunaliella salina* 多糖提取量 0.041 g 和 *Arthrospira platensis* 多糖提取量 0.042 g^[17], 但低于 Wang 等^[18] 对 *Rhodorus* sp. SCSIO-45730 的多糖提取量 0.093 g。



续图 2 (Continued Fig.2)

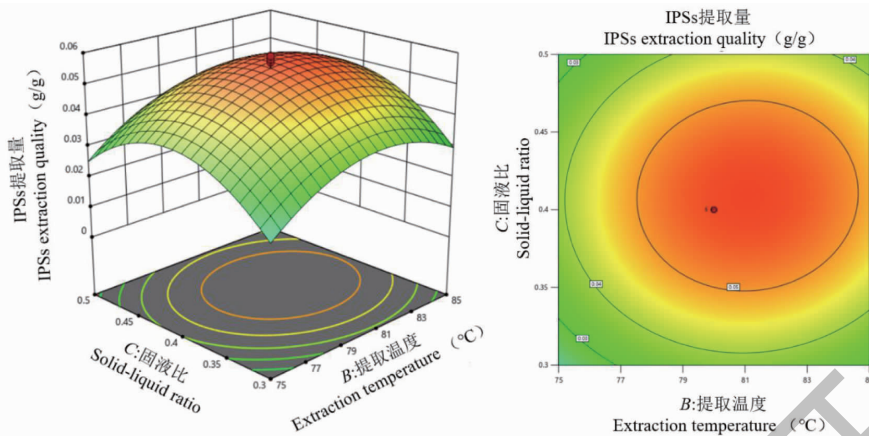


图 2 两因素交互效应三维响应面及等高线

Fig. 2 Three-dimensional response surface and contour lines of interaction between two factors

2.1.3 IPSs 分离纯化

利用离子交换层析柱,进行 IPSs 分离。先使用 0.00 mol/L NaCl 洗脱(见图 3),得到多糖 IPS-1 提取率为 5%。而后依次使用 0.50 mol/L 和 1.00 mol/L NaCl 溶液进行洗脱,得到酸性多糖 IPS-2、IPS-3,提取率分别为 6%、12%。实验主要对以 NaCl 为洗脱液获得的两组多糖,进行后续实验。

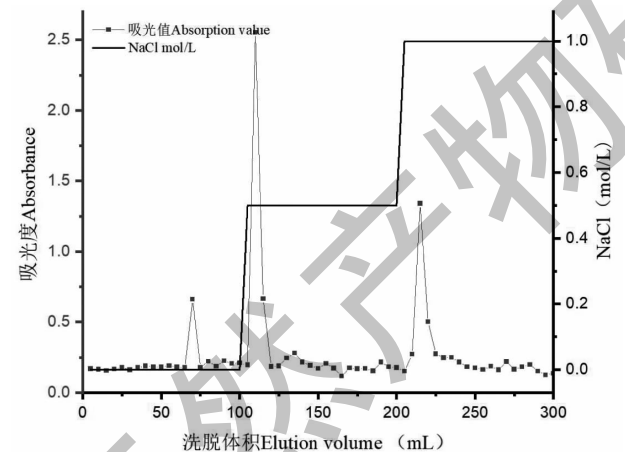


图 3 IPSs 的 DEAE Sephacel FF 梯度洗脱曲线

Fig. 3 DEAE Sephacel FF elution curve of IPSs

2.1.4 IPSs 纯度鉴定

实验采用紫外吸收光谱对多糖纯度进行鉴定,核酸在紫外光谱下吸收峰为 260 nm,蛋白质在紫外光谱下吸收峰为 280 nm,IPS-2 和 IPS-3 在 260 nm 和 280 nm 无明显吸收峰(见图 4),在一定程度上说明三氯乙酸法除蛋白相对彻底,表明样品具有较高纯度。使用紫外光谱检测法检测多糖纯度具有一定的普遍性。

2.1.5 IPSs 组成分析

利用凝胶色谱、激光光散射和示差检测器联用测得样品的绝对分子量。多糖聚合物没有固定分子量,所测分子量为分布平均值。IPSs 为多糖粗提物,含有一定的蛋白及核酸,其分子量检测数据误差较大,不具有实际意义。通过离子层析柱将 IPS-2 和 IPS-3 根据糖骨架进行分离,结果显示 IPS-2 分子量大于 IPS-3。通过表 3,可知 IPSs、IPS-2 和 IPS-3 均含有硫酸基,其 IPSs 含量最高为(11.97 ± 0.23)%,可见离子纯化后的多糖硫酸基含量相对降低。实验结果中 IPS-2、IPS-3、IPSs 三种样品组成均以葡萄糖和半乳糖为主,与 Sun 等^[19]和 Sang 等^[20]相似,植物多糖大多含有葡萄糖、半乳糖。

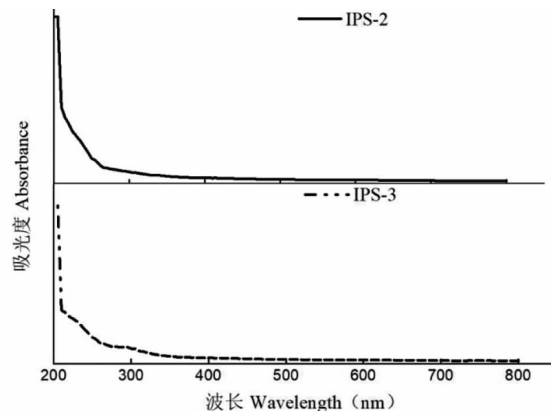


图 4 IPS-2、IPS-3 紫外吸收光谱图

Fig. 4 Ultraviolet absorption spectrum of IPS-1 and IPS-2

2.1.6 红外检测分析

红外检测结果如图 5,IPSs、IPS-2、IPS-3 的 FT-IR 光谱表现出极其相似的特征官能团。-NH、-OH

表 3 IPSs 的化学成分 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Chemical composition of IPSs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化学组成 Chemical composition	分子量 Molecular weight (kDa)	硫酸基含量 Sulfate group (%)	单糖组成 Monosaccharide composition (mg/g)	
			葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose
IPSs	—	11.97 ± 0.23	0.199 6	0.043 0
IPS-2	53.1	5.69 ± 0.11	1.460 0	0.026 6
IPS-3	25.6	8.46 ± 0.03	0.776 2	0.201 5

在 3 250 ~ 500 cm^{-1} 伸缩振动, C-H 在 2 900 cm^{-1} 附近的伸缩振动^[21] 以及 -COOH 在 1 700 ~ 1 750 cm^{-1} 内振动^[22] 均为多糖结构特征吸收峰。1 200 ~ 1 000 cm^{-1} 范围内 C-O-H 侧基和 C-O-C 糖苷振动吸收峰^[23]。-NO₂ 在 1 500 ~ 1 600 cm^{-1} 出峰, C-H 弯曲吸

收在 1 433 cm^{-1} 附近^[21], 1 433 cm^{-1} 和 1 733 cm^{-1} 吸收峰, 明显说明 IPSs 中具有糖醛酸^[24]。在 790 ~ 850 cm^{-1} 处的强吸收带, 表明多糖硫酸基团的存在^[25] 此外在 845 cm^{-1} 和 918 cm^{-1} 处出现振动峰, 表明 IPSs 中存在 α -和 β -构型^[26,27]。

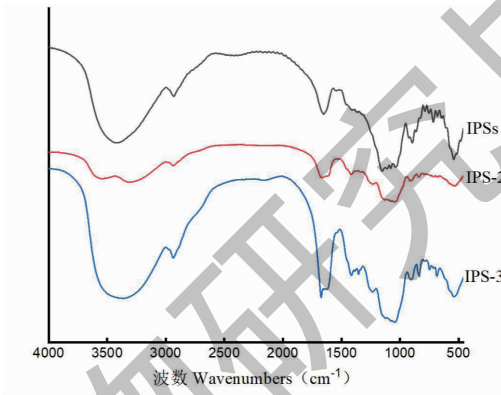


图 5 IPSs、IPS-2、IPS-3 的 FT-IR 光谱

Fig. 5 FT-IR spectra of IPSs, IPS-2 and IPS-3

2.1.7 抗氧化活性分析

三份样品均具有明显的 DPPH 及羟基自由基清除活性, IPSs、IPS-2 及 IPS-3 对自由基清除活性表现出明显的浓度依赖性。以 V_C 为阳性对照, 发现 IPSs 对 DPPH 自由基的 IC₅₀ = 0.011 mg/mL, 接近 V_C 对 DPPH 自由基的 IC₅₀ = 0.007 mg/mL, IPSs 对羟基自由基的 IC₅₀ = 0.737 mg/mL, 同样接近 V_C 对羟基

自由基的 IC₅₀ = 0.626 mg/mL, 反而经离子纯化后多糖自由基清除活性减弱。在 2 mg/mL 时 IPSs、IPS-2 和 IPS-3 对 DPPH 自由基清除率分别为 (91.13 ± 2.93)%、(23.16 ± 0.79)% 及 (27.36 ± 2.44)% (见图 6), 在 2 mg/mL 时 IPS、IPS-2 和 IPS-3 对羟基自由基清除率分别为 (80.01 ± 0.98)%、(23.19 ± 2.35)% 及 (32.06 ± 3.78)%。即相同浓度条件下

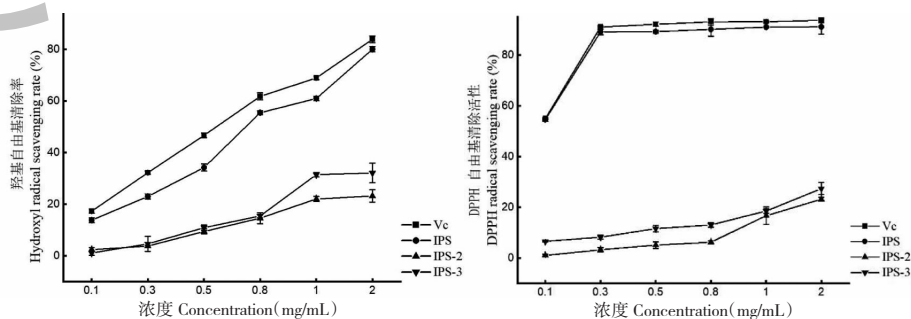


图 6 IPSs 清除 DPPH 和羟基自由基活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Scavenging activity of IPSs on DPPH and hydroxyl radical ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

抗氧化活性大小为:IPSs > IPS-3 > IPS-2。氧化活性与多糖结构组成、分子量大小等多种因素相关。低分子量对抗氧化强度具有正向影响^[28]。单糖(葡萄糖)含量与自由基清除活性呈负相关关系($y = 0.785 - 0.006x, r = -0.905$)^[29],这与本实验结果相互印证。此外,多糖自由基清除活性还与官能团(如 $\text{C}=\text{O}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{O}-$ 和 $-\text{OH}$)以及硫酸基含量呈相关性^[30]。

3 结论

沙漠小球藻具有极强的抗盐碱和耐旱性,然而对其多糖提取与抗氧化活性检测的研究却相对较少。本文优化沙漠小球藻 IPSs 提取工艺,并进行分离纯化和活性检测。采用 CCD 法对 IPSs 提取工艺进行优化,最终使在温度:80 °C;时间:1 h;固液比(g/mL)1:25,条件下 IPSs 提取量最高。通过离子层析法成功分离出两种酸性多糖 IPS-2 和 IPS-3,其硫酸基含量分别为(5.69 ± 0.11)%、(8.46 ± 0.03)%。同时 IPSs、IPS-2 和 IPS-3 三种样品均主要由葡萄糖和半乳糖组成。沙漠小球藻 IPSs 对 DP-PH 自由基表现出 $\text{IC}_{50} = 0.011 \text{ mg/mL}$ 的抑制效果,接近 V_c 对 DPPH 自由基的 $\text{IC}_{50} = 0.007 \text{ mg/mL}$;而在对羟基自由基方面,沙漠小球藻 IPSs 表现出 $\text{IC}_{50} = 0.737 \text{ mg/mL}$ 的抑制效果,同样接近 V_c 对羟基自由基的 $\text{IC}_{50} = 0.626 \text{ mg/mL}$ 。这种极强的抗氧化活性可能与单糖组成(葡萄糖)含量有关。本文研究结果为沙漠小球藻多糖结构与活性领域提供文献依据,并为食品、药品、化妆品等多个领域潜力产品的开发奠定学术基础。

参考文献

- Wang B, Ye T, Li CY, et al. Cell damage repair mechanism in a desert green algae *Chlorella* sp. against UV-B radiation [J]. *Ecotoxicol Environ Safe*, 2022, 242: 113916.
- Mao WW, Zhang L, Yin QR, et al. Enhancement strategy and the prospect of carbon fixation photosynthesis of microalgae [J]. *Clean Coal Technol* (洁净煤技术), 2022, 28: 30-43.
- Levin G, Kulikovskiy S, Liveanu V, et al. The desert green algae *Chlorella ohadii* thrives at excessively high light intensities by exceptionally enhancing the mechanisms that protect photosynthesis from photoinhibition [J]. *Plant J*, 2021, 106: 1260-1277.
- Zhang Y, Lei Y, Qi S, et al. Ultrasonic-microwave-assisted extraction for enhancing antioxidant activity of *Dictyophora indusiata* polysaccharides; the difference mechanisms between single and combined assisted extraction [J]. *Ultrason Sonochem*, 2023, 95: 106356.
- Huang H, Huang G. Extraction, separation, modification, structural characterization, and antioxidant activity of plant polysaccharides [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2020, 96: 1209-1222.
- Kobra Z, Ataie Z, Mokhtari M, et al. An insight to the therapeutic potential of algae-derived sulfated polysaccharides and polyunsaturated fatty acids: focusing on the COVID-19 [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 209: 244-257.
- Muthu Kuma J, Chidambaram R, Sukumaran S. Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries—a review [J]. *J Food Sci Tech Mys*, 2021, 58: 2453-2466.
- Zhang R, Zhang X, Tang Y, et al. Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides; a review [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 228: 115-118.
- Bhattacharya S. Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy [M]. *Intech Open*, 2021, 54: 56-74.
- Gong CX, Wang D, Gou YF, et al. Isolation, culture, morphological and molecular identification of four strains of *Chlamydomonas aeruginosa* in desert soil [J]. *J Shihezi Univ* (石河子大学学报), 2013, 31: 294-300.
- Wen YX, Huang XZ, Lin XS. Chemical composition and antioxidant activity analysis of water-insoluble and water-soluble polysaccharides from *Gymnospermum* [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2022, 43: 10-13.
- Coleman RL, Shults WD, Kelley MT, et al. Turbidimetry via parallel photometric analysis Determination of sulfate [J]. *Anal Chem*, 1972, 44: 1031-1034.
- Zhu YT, Wen X, Xiang J, et al. Monosaccharide composition and antioxidant activity of extracellular polysaccharide of *Lactobacillus plantarum* [J]. *J Dairy Sci Technol* (乳业科学与技术), 2022, 45: 5-7.
- Liang CH, Liang WQ, Li W. Study on functional groups of different rank coals based on Fourier infrared spectroscopy [J]. *Coal Sci Technol* (煤炭科学技术), 2020, 5: 120-131.
- Espin JC, Soler-rivas C, Wichers HJ. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical [J]. *J. Agric Food Chem*, 2000, 48: 648-656.
- Smirnof N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28: 1057-1060.
- Farid R, Redouane B, Yassink K, et al. Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches [J]. *Sci Rep-UK* 2021, 11: 930-941.

- 18 Wang N, Dai LM, Chen ZH. Extraction optimization, physico-chemical characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from *Rhodospira* sp. SCSIO-45730 [J]. *J Appl Phycol*, 2022, 34:285-299.
- 19 Sun JR, Zhang JF, Fu DD, et al. Optimization of *Chlorella vulgaris* 224 exopolysaccharide accumulation and its antibacterial and antioxidant activities by response surface method [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32:496-452.
- 20 Sang YM, Gao YC, Wu JP, et al. Research progress in extraction, purification, and structural characterization of edible fungal polysaccharides [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2023, 44:210-218.
- 21 Seedeivi P, Moovendhan M, Sudharsan S, et al. Isolation and chemical characteristics of rhamnose enriched polysaccharide from *Grateloupia lithophila* [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 195:486-494.
- 22 Lin X, Ji X, Wang M, et al. An alkali-extracted polysaccharide from *Zizyphus jujuba* cv. Muzao: structural characterizations and antioxidant activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136:607-615.
- 23 Nurmamat E, Xiao H, Zhuang Y, et al. Effects of different temperatures on the chemical structure and antitumor activities of polysaccharides from *Cordyceps militaris* [J]. *Polymers*, 2018, 10:430-442.
- 24 Qiu HR, He SZ, Che CP. Analysis of the influence of thermal aging on the performance of transformer oil based on mid-infrared spectrum [J]. *Contemp Chem Ind* (当代化工), 2019, 48:1154-1157.
- 25 Zhang Q, Hua Q. Determination of polysaccharide content in *Ganoderma lucidum* fruiting body by near-infrared spectroscopy [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2021, 40:252-260.
- 26 Jun YY, Ben Cl, Yu H, et al. Separation, structure characterization, conformation, and immunomodulating effect of a hyperbranched heteroglycan from *Radix Astragali* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 87:667-675.
- 27 Li B, Chen N, Wang Y, et al. Spatio-temporal quantification of the trade-offs and synergies among ecosystem services based on grid-cells: a case study of Guanzhong Basin, NW China [J]. *Ecol Indicators*, 2018, 94:246-253.
- 28 Su Y, Li L. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 229:115407.
- 29 Meng L, Sasa S, Rong L, et al. Antioxidant activity of polysaccharides produced produced by *Hirsutella* sp. and relation with their chemical characteristics [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 117:452-457.
- 30 Ye SC, Hou YC, Yang SR, et al. Optimization of liquid submerged fermentation conditions for preparing polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* and study on antioxidant activity in vitro [J]. *J Food Saf Qual Test* (食品安全质量检测学报), 2023, 14:58-67.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委 (以姓氏笔划为序)

Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		