

螺旋藻富铬及其含铬蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶抑制的研究

何颖敏¹, 孙宜君², 张 娇³, 李博生^{1*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 北京林业大学螺旋藻研究所, 北京 100083)

摘 要: 在富铬 Z 氏培养液条件下, 研究了钝顶螺旋藻对 Cr(III) 的吸收及其有机化程度, 采用不同饱和度硫酸铵沉淀的方法分离提取不同蛋白组份, 对其含 Cr(III) 量进行了分析, 并探讨了蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制作用。结果表明, 螺旋藻培养液中 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 添加浓度为 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 螺旋藻总铬富集量可达到 $3.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 有机化程度为 70.2%; 不同饱和度 (25%、50% 和 75%) 硫酸铵沉淀出的蛋白组份中铬占总铬的情况分别为 2.1%、16.8% 和 7.0%, 不同蛋白质结合铬的能力各异; 3 种蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶均有抑制作用, 其中 50% 饱和度硫酸铵沉淀的蛋白组份抑制活性最高, IC_{50} 为 $69.87 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 三价铬; 螺旋藻蛋白; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: Q949.22

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)04-0571-05

Effects of chromium (III)-riched *Spirulina platensis* proteins on the activity inhibition of α -glucosidase

HE Ying-min¹, SUN Yi-jun², ZHANG Jiao³, LI Bo-sheng¹

(School of Biology Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: In this paper, we studied the absorption degree of Cr(III) in *Spirulina platensis* which cultivated in chromium (III)-riched Zarrouk medium, by extracting proteins with ammonium sulfate precipitation, analyzing the content of Cr(III) in protein components. And then we investigated the inhibition effect of chromium (III)-riched *Spirulina platensis* proteins on alpha-glucosidase. The results showed that *Spirulina platensis* grown in culture medium added with $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, the total enriched Cr(III) and its organic degree of Cr(III) could reach to $3.30 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and 70.2%, correspondingly. When different saturated solution (25%, 50% and 75%) of ammonium sulfate were used to precipitate proteins, the proportion of Cr(III) in protein components to total Cr(III) were 2.1%, 16.8% and 7.0%, respectively. The abilities of different proteins combined with Cr (III) were different. The three protein components had different inhibition activities on alpha-glucosidase. Among them, protein components precipitated by 50% saturation solution of ammonium sulfate revealed the best inhibition effect on alpha-glucosidase, with IC_{50} of $69.87 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Key words: Chromium (III); *Spirulina platensis* proteins; α -glucosidase

Cr(III) 是人体必需的微量元素, 是正常糖脂代谢所不可缺少的。Schwarz 和 Mertz 于 1959 年首次从啤酒酵母中提取出含有铬的葡萄糖耐量因子 (GTF), 并证实 Cr(III) 是 GTF 的重要活性成分; Cr(III) 通过 GTF 协同和增强胰岛素的作用来影响糖类、脂类、蛋白质及核酸代谢^[1-2]。国内外科技工作者进行的动物实验及临床研究表明, 缺铬会引起胰岛素作

用降低、糖的利用受阻, 导致糖尿病; 同时引起血内脂肪尤其是胆固醇增高, 造成高脂蛋白血症, 并与动脉粥样硬化发病有关^[3]。由于不同形式的铬在组织中结合程度不同, 导致吸收率不同。无机铬不但毒性大, 且吸收水平极低为 0.4%~3%; 而有机铬的吸收迅速且安全, 吸收率为 10%~25%^[4]。

螺旋藻有丰富的蛋白质及多种生理活性成分如

收稿日期: 2012-01-05

基金项目: 教育部重点研究项目 (102023) 和国家林业公益性行业科研专项 (200704025) 共同资助。

作者简介: 何颖敏, 女, 硕士研究生。E-mail: hymj_05@163.com

* 通讯作者: 李博生, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: lbs7788@yeah.net

β -胡萝卜素、 γ -亚麻酸、藻蓝蛋白、多糖等，具有极强的保健功能^[5]。藻类生物富集是一种新兴的生物技术手段^[6-8]，富铬螺旋藻可用来补充铬，其对铬的吸收率和生物利用率远高于无机铬^[9]。其中铬以有机大分子形式存在，无毒无副作用，生物利用度高，吸收效果好，提高胰岛素生物效应，还同时提供其他有益营养物质。目前有关螺旋藻对 Cr(III)的生物富集及 Cr(III)在螺旋藻体内的存在形态的研究已见报道，但尚无富铬螺旋藻对 α -葡萄糖苷酶抑制作用的研究。

本试验的目的在于采用不同饱和度硫酸铵盐析提取富铬螺旋藻蛋白组份，并研究其对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

钝顶螺旋藻：北京林业大学螺旋藻研究所； α -葡萄糖苷酶，美国 Sigma Chemical 公司；4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷，美国 Sigma Chemical 公司；其他所有试剂：分析纯。

1.2 仪器与设备

FA1004 电子天平：上海衡平仪器仪表厂；GXZ 智能型光照培养箱：宁波江南仪器厂；JAC-IV 超声波细胞粉碎机：济宁市奥波超声波电气有限公司；VISTA-MPX 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES)：美国 VARIN 公司；HJ-3 磁力搅拌机：金坛市金城金华仪器厂；Thermo BIOFUGE PRTMO R centrifuge：美国 Thermo Fisher Scientific 公司；Thermo Heto Power Dry LL1500 Freeze Dryer：美国 Thermo Fisher Scientific 公司；KDY9830 凯氏定氮仪：北京市通润源机电技术有限责任公司；KXZ-1010 控温消煮炉：北京市通润源机电技术有限责任公司；752 型紫外分光光度计：上海美谱达仪器有限公司；Model 680 酶标仪，美国 BIO-RAD 公司；LRH-250 生化培养箱：上海一恒科技有限公司。

1.3 钝顶螺旋藻及其富铬培养

采用 Zarrouk 培养基^[10]培养钝顶螺旋藻。

接种对数生长期的藻种 ($OD_{560\text{nm}}$ 为 0.20)，培养温度为 30℃，pH8.5~9.5，光照度 4 000 lx，光照时间 24 h·d⁻¹。以空气压缩泵通气培养 7 d 采收。从接种时期，连续 6 d 在每天的同一时间，于培养盆中等量加入含 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100 mg·mL⁻¹ 的溶液，使 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 总加入量达到 300 mg·L⁻¹。在第 7 d 采收，藻液用 300 目筛网过滤，藻泥用清水冲洗后再用蒸

馏水反复洗涤，收集藻体，沥干后，真空冷冻干燥得螺旋藻干粉。

1.4 钝顶螺旋藻对铬的富集总量和有机化程度

富铬螺旋藻藻粉中总铬及无机铬的含量用 ICP-OES 测定。

总铬测定：取各组收集的干燥藻粉 4 mg 加混酸 $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4(4:1)$ 5 mL，电热板上 180℃ 加热消化 6 h，冷却后过滤，用超纯水定容，稀释后上机检测。

有机 Cr 测定：取收集的各组干燥藻粉 2 mg，加超纯水 5 mL，超声破碎仪上破碎 30×5 s(间歇为 4 s)，离心收集上清液，稀释 10 倍上 ICP-OES 检测。有机铬的含量用总铬和无机铬之差表示，转化为 Cr 的有机化百分比含量。

1.5 螺旋藻蛋白提取

取富铬螺旋藻藻粉 20.0 g，加 200 mL 蒸馏水混合，搅 2 h，置于液氮中反复冻融数次，使细胞全部破碎，搅 2 h，静置 6 h，以 8 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 30 min，上清液合并。

总蛋白：取上清液，加入固体硫酸铵至饱和，静置 2 h，以 8 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 30 min，收集沉淀，用 pH6.8 PBS 缓冲液溶解，蒸馏水透析至平衡，收集蛋白质溶液，冷冻干燥，测定其中铬含量。用凯氏定氮法测定干藻粉蛋白含量。

不同饱和度硫酸铵沉淀：取上清液，依次用 25%、50% 和 75% 饱和度的硫酸铵沉淀，以 8 000 r·min⁻¹ 4℃ 离心 30 min，所得沉淀用 pH6.8 PBS 缓冲液溶解，蒸馏水透析至平衡，收集蛋白质溶液，测蛋白质含量^[11]，并测定其中铬含量^[12]。

1.6 富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

富铬螺旋藻藻体蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性的测定可以通过测定反应体系 α -葡萄糖苷酶催化对硝基苯酚- α -D-葡萄糖苷(PNPG)生成的对硝基苯酚(PNP)的多少来确定。

1.6.2 操作步骤 将样品配成一系列梯度浓度。在 96 孔酶标板上，加入 120 μL 0.5 mol 的磷酸缓冲液 (pH 6.7)，20 μL 样品，50 μL α -葡萄糖苷酶溶液 (25 mg·mL⁻¹)，50 μL PNPG (0.9133 mg·mL⁻¹)。混匀后在 37℃ 的培养箱中反应 2 h。加入 50 μL 碳酸钠溶液 (0.67 mol) 终止反应，在 405 nm 下用酶标仪测定吸光度值。空白组以 20 μL 的去离子水代替提取液，背景组是指只有提取物之吸光值。

酶活性抑制率的计算公式为：酶活性抑制率 (%) = $[A_{\text{空白}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{背景}})] / A_{\text{空白}}$

表 1 富铬螺旋藻蛋白组份 α -葡萄糖苷酶抑制率检测反应体系的组成Table 1 Reaction system for evaluating the inhibitory activity of chromium (III)-riched *Spirulina platensis* protein on α -glucosidase

组别 Group	PH6.7 缓冲液 Buffer solution	0.9133 mg·mL ⁻¹ PNPG	25 mg·mL ⁻¹ α -葡萄糖苷酶 25 mg·mL ⁻¹ α -glucosidase	样品溶液 Sample solution
空白组 Blank	120 μ L	50 μ L	50 μ L	20 μ L ddH ₂ O
样品组 Sample	120 μ L	50 μ L	50 μ L	20 μ L
背景组 Background	120 μ L	50 μ L (buffer solution instead of PNPG)	50 μ L (buffer solution instead of α -glucosidase)	20 μ L

2 结果与分析

2.1 钝顶螺旋藻中总富铬量和有机化程度

钝顶螺旋藻对金属 Cr(III)在一定浓度范围内有良好的富集作用^[13], 试验选用 CrCl₃·6H₂O 为铬源,

CrCl₃·6H₂O 添加浓度为 300 mg·L⁻¹。实验室培养, 经过 6 d 得 Cr(III)富集后, 收集藻液制得富铬螺旋藻藻粉。试验测定藻粉中总铬及无机铬的含量, 可知藻粉的有机化程度, 如表 2。

表 2 螺旋藻粉总铬和有机化程度

Table 2 Content of total Cr(III) and its organic degree in *Spirulina platensis*

总铬含量/mg·g ⁻¹ Content of total Cr (III)	无机铬含量/mg·g ⁻¹ Content of inorganic Cr (III)	有机铬含量/mg·g ⁻¹ Content of organic Cr (III)	有机化程度/% Organic degree
3.30±0.02	0.99±0.04	2.31	70.2

表 3 藻体总蛋白含铬量

Table 3 Content of Cr(III) in *Spirulina platensis* protein

总蛋白含量/% Content of total protein	蛋白含铬量/mg·g ⁻¹ Content of Cr (III) in protein	占藻粉总铬/% Percentage of total Cr (III)	占藻粉有机铬/% Percentage of organic Cr (III)
62.5	2.53±0.05	47.9	68.2

表 4 不同饱和度硫酸铵沉淀中蛋白含铬量

Table 4 Contents of Cr (III) in protein by sedimentation with different saturation of ammonium sulfate

(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和度/% Ammonium sulfate saturation	蛋白含量/mg·g ⁻¹ Content of protein	蛋白含铬量*/ μ g·g ⁻¹ Content of Cr (III) in protein	占藻粉总铬/% Percentage of total Cr(III)	蛋白颜色 Protein color
25	86.5	815.5	2.1	草绿 Grass green
50	375.4	1 475.7	16.8	蓝绿 Bluish green
75	227.6	1 019.4	7.0	墨绿 Blackish green

注: 蛋白含量*指藻粉蛋白含量。Note: The protein content is *Spirulina platensis* protein.

从表 2 可以看出, 螺旋藻对铬的富集效果达到 3.30 mg·g⁻¹, 有机铬含量为 2.31 mg·g⁻¹, 有机化程度为 70.2%。由此可见钝顶螺旋藻对 Cr(III)的良好富集能力和生物转化效果。

2.2 硫酸铵沉淀钝顶螺旋藻蛋白含铬量的分析

螺旋藻对 Cr(III)的富集转化是经吸附、吸收和生物代谢过程而实现的, 无机铬转化为有机铬主要是因为铬与螺旋藻大分子物质的结合。在同上述的培养条件下培养富铬螺旋藻, 培养 6 d 后, 提取其蛋白, 并测定蛋白含量及其中铬含量。

富铬螺旋藻干粉中总铬含量为 3.30 mg·g⁻¹, 从藻粉中分离提取的水溶蛋白含量为 453 mg·g⁻¹。由表 3 可知, 提取的蛋白中含铬 2.53 mg·g⁻¹。经测定, 藻粉总蛋白含量为 62.5%, 以提取的蛋白含铬量推

算藻粉总蛋白中铬占总铬的 47.9%, 占有有机铬的 68.4%, 这说明 Cr(III)在钝顶螺旋藻中以与蛋白质结合为主。

利用不同饱和度的硫酸铵盐析处理富铬螺旋藻蛋白, 对蛋白进行初步分离。

表 4 显示不同饱和度硫酸铵沉淀出的蛋白含铬量。说明在螺旋藻中, Cr(III)虽与蛋白质结合为主, 但在不同蛋白组份中 Cr(III)的结合量存在较大的差异。试验结果表明饱和度 50%的硫酸铵沉淀出的蛋白含铬量最高, 可达到 1 475.7 μ g·g⁻¹, 占总铬的 16.8%, 在该组份中主要为藻蓝蛋白, 估计铬是与藻蓝蛋白结合。

一般情况下, 25%饱和度的硫酸铵沉淀出叶绿素蛋白、一些杂蛋白以及一部分的藻胆蛋白, 蛋白

颜色呈草绿色；50%饱和度的硫酸铵可将大部分藻胆蛋白沉淀出来，其蛋白的含量和纯度均很高，蛋白颜色呈蓝绿色，而正常螺旋藻的50%组份蛋白是蓝色的，这可能是由于富集了Cr(III)，Cr(III)溶液本身是绿色的；75%饱和度的硫酸铵沉淀出除了部分藻胆蛋白，还有一些杂蛋白，蛋白呈墨绿色^[14-16]。

2.3 富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

研究25%、50%和75%饱和度的硫酸铵分级沉淀出的富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。图1是蛋白浓度梯度为10、15和20 mg·mL⁻¹时，蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制率。

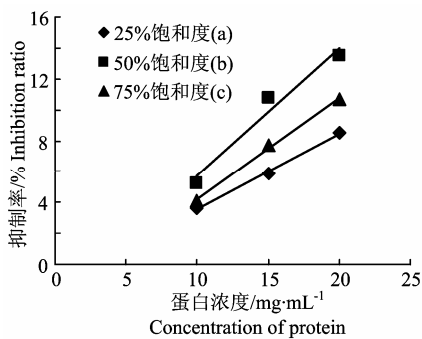


图1 富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Figure 1 Inhibition effects of chromium (III)-riched *Spirulina platensis* proteins on alpha-glucosidase

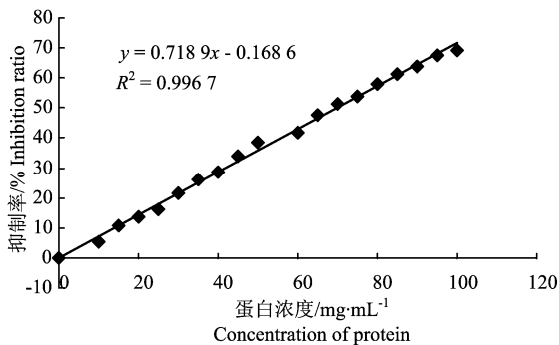


图2 50%饱和度硫酸铵沉淀蛋白对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

Figure 2 Inhibition effects of proteins precipitated by 50% saturation solution of ammonium sulfate on alpha-glucosidase

从图1中可看出，3种蛋白组份均表现出对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用。b组蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制率最高，蛋白浓度为10 mg·mL⁻¹时，抑制率为5.2%，浓度为20 mg·mL⁻¹时，抑制率增至13.5%；c组的抑制作用次之，随着蛋白浓度从10~20

mg·mL⁻¹，抑制率由4.1%升到了10.7%；a组的抑制率最低，抑制率从蛋白浓度10 mg·mL⁻¹的3.6%增长到20 mg·mL⁻¹的8.5%。由此可得出，随着蛋白浓度的增大，蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性也增大。这表明富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的活性抑制作用与蛋白的浓度有关。

由图1中3种蛋白组份的抑制率比较可知，50%饱和度硫酸铵沉淀出的富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性最大。将此蛋白组份配置成从10~100 mg·mL⁻¹的梯度浓度，进行试验，绘制抑制曲线，如图2。

50%饱和度硫酸铵沉淀出的富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶抑制率方程为： $y=0.718x-0.168$ ， $R^2=0.996$ 。这说明，在10~100 mg·mL⁻¹的浓度范围内，蛋白浓度与 α -葡萄糖苷酶的抑制率有良好的线性关系，其半抑制浓度IC₅₀为69.87 mg·mL⁻¹。

3 讨论

利用生物体进行Cr(III)的有机化是开发有机铬的合理途径，国内已采用酵母作为Cr(III)的有机化载体。被誉为人类“未来食品”的螺旋藻具有生长快、营养价值高、培养简便、对无机Cr(III)有较强耐性等优点，是对无机Cr(III)进行生物有机化的理想载体。螺旋藻营养价值的突出特点表现在蛋白质含量极高，而Cr(III)在螺旋藻中又主要与蛋白质结合。通过对钝顶螺旋藻进行富集Cr(III)培养，藻体可有效地对无机Cr(III)进行生物有机化。且有报道证实，无机Cr(III)经钝顶螺旋藻富集后，转化为有机Cr(III)，且并不会转化为有毒性的Cr(VI)^[17]，食用不会给人体带来Cr(VI)的毒性危害。

本试验采用不同饱和度的硫酸铵沉淀初步分离富铬螺旋藻蛋白，发现50%饱和度硫酸铵沉淀出的蛋白含量最高，为375.4 mg·g⁻¹，蛋白含铬量为1475.7 μ g·g⁻¹，占总铬的16.8%。试验结果初步证明了不同蛋白组份中铬的相对含量差异显著，说明富铬螺旋藻中铬与蛋白质结合存在较大差异性，不同蛋白质结合铬的能力各异。铬在不同蛋白质中的分布差别及变化对阐明富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制是重要的，值得进一步研究。

本试验通过测定富铬螺旋藻蛋白组份对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性，发现不同饱和度硫酸铵沉淀出的富铬螺旋藻蛋白对 α -葡萄糖苷酶均有抑制作用，且抑制率与蛋白浓度相关，其中50%饱和度硫酸铵沉淀出的蛋白组份抑制作用强于其他2种蛋白组份，抑制活性最强，其半抑制浓度69.87 mg·mL⁻¹。

1990 年拜耳公司研发出世界上第一个 α -葡萄糖苷酶抑制剂——阿卡波糖 (acarbose), 是目前针对 2 型糖尿病应用最广泛的制剂, 阿卡波糖降血糖作用的机制是竞争水解碳水化合物的酶, 减慢水解葡萄糖的速度, 其对 α -葡萄糖苷酶的 IC₅₀ 约为 1 mg·mL⁻¹, 半抑制浓度远远低于 50% 饱和度硫酸铵沉淀出的富铬螺旋藻蛋白组份, 原因可能是利用 50% 饱和度硫酸铵沉淀的蛋白组份仍为混合物, 随着进一步的分离纯化, 有可能提取出对 α -葡萄糖苷酶抑制作用更强的蛋白, 这对深入探讨富铬螺旋藻蛋白对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制机理及其应用有着重要意义。

参考文献:

- [1] Schwartz K, Mertz W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor [J]. Arch Biochem Biophys, 1959(85): 292-295.
- [2] Sun Y, Ramirez J, Woski S A, et al. The binding of trivalent chromium to low-molecular weight chromium-binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr[J]. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2000, 5 (1): 129-136.
- [3] 王巛等. 生命科学中的微量元素[M]. 2 版. 北京: 中国计量出版社, 1996: 172-198.
- [4] Liu J, Zhang B, He X, et al. Selection of a high-biomass, chromium-rich yeast strain and optimization of cultivation conditions[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 27(4): 195-198.
- [5] 李志勇, 郭琳远, 李琳, 等. 功能性螺旋藻保健食品的研制与开发[J]. 粮食与饲料工业, 1997(10): 37.
- [6] 李志勇, 郭琳远, 李琳, 等. 藻类富集微量元素的机理研究[J]. 华南理工大学学报, 1998, 26(2): 33-37.
- [7] 李志勇, 郭琳远, 李琳, 等. 工业污水中金属的藻类去除与回收[J]. 重庆环境科学, 1997, 19(6): 27-31.
- [8] 李志勇, 郭琳远, 李琳, 等. 藻类对微量元素的生物富集及其应用[J]. 微生物学报, 1997, 24(6): 368-369.
- [9] 曾文辉, 何燕宇, 万云鹏, 等. 钝顶螺旋藻生物富集铬及藻体中铬的存在形态研究[J]. 广东化工, 2006, 33(7): 37-39.
- [10] Watanabe Y, Noue J, Hall D O. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1995, 47: 261-269.
- [11] 李建武, 萧能庚, 余瑞元. 生物化学原理与方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997: 69-100.
- [12] GBT5009.123-2003 食品中铬的测定[S].
- [13] Pirszel J, Pawlik B, Skowronski T. Cation-exchange capacity of algae and cyanobacteria: parameter of their metal sorption abilities[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1995, 14: 319-322.
- [14] 蔡春尔, 何培民. 硫酸铵三步盐析对藻胆蛋白纯化的影响[J]. 生物技术通报, 2006(4): 121-125.
- [15] 朱丽萍, 颜世敢, 李雁冰, 等. 硫酸铵盐析条件对多管藻 R-藻红蛋白和 R-藻蓝蛋白得率和纯度的影响[J]. 科技导论, 2010, 28(4): 37-41.
- [16] 刘杨, 王雪青, 庞广昌, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的富集分离及其稳定性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 39-42.
- [17] 许文涛, 王颖, 罗云波, 等. Cr (III)在钝顶螺旋藻中的生物富集及其对钝顶螺旋藻生长的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 153-157.