

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* var. *major*) 胞外酸性多糖的分离、纯化及其理化特性*

梅秋红 缪月秋 张成武 陆长梅 吴国荣**

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要 本实验的目的是提取和纯化铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* var. *major*) 胞外带酸性基团的多糖, 为综合利用爆发的水华提供一定的理论依据。采用 pH 8.0、80℃ 的热水抽提铜绿微囊藻的胞外多糖。经充分脱蛋白、脱色后用 DEAE-纤维素 (DE-52) 作离子交换柱层析, 分离出其中不被 DE-52 吸附和被吸附的两种组分。取后者上 sephadexG-150 柱进一步分离得到两种分子量不同的酸性多糖 (EAPS I 和 EAPS II) 质量比为 1.92:1。经 HPLC 测定 EAPS I 均分子量为 7.01×10^4 D, EAPS II 均分子量为 4.21×10^4 D。经测定, 它们各带有不同含量的酸性基团: EAPS I 糖醛酸含量为 10.74%, SO_4^{2-} 含量为 44.44 $\mu\text{g}/\text{mg}$, EAPS II 糖醛酸含量为 7.08%, SO_4^{2-} 含量为 9.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。EAPS I 单糖组成为 9.6549% D (+) 木糖, 19.2522% D-果糖, 71.0930% 葡萄糖; EAPS II 单糖组成为 6.4065% D (+) 木糖, 18.0016% D-果糖, 75.5919% 葡萄糖。
关键词 铜绿微囊藻, 胞外酸性多糖, 分离, 纯化, 理化特性

Preliminary Studies on the Isolation, Purification and Physicochemical Properties of Extracellular Acidic Polysaccharides from *Microcystis aeruginosa* var. *major*

MEI Qiu hong, MIAO Yue qiu, ZHANG Cheng wu, LU Chang mei & WU Guo rong

(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097 P. R. China)

Abstract: The occurrence of harmful microcystis blooms in eutrophic water bodies is a world wide problem. *Microcystis* usually forms mucilaginous sheath surrounding colony which floats on the surface of water body. The mucilaginous sheath was mainly composed of polysaccharides. To provide theoretical evidences in multipurpose use of *Microcystis* bloom, the aim of this study was to isolate and purify acidic polysaccharides from *Microcystis aeruginosa* var. *major* cultures. Extracellular acidic polysaccharides were extracted by hot water at 80℃ and pH 8.0 from *M. aeruginosa* var. *major* in the study. After being deproteinized and decolorized, the neutral and acidic polysaccharides were pooled from the elutes of DEAE-52 gel column. Then, the acidic polysaccharides were further loaded on Sephadex G-150 column, two fractions (fraction I, EAPS I; fraction II, EAPS II) of different molecular weights were obtained. Their mass ratio is 1.92:1. Detected by HPLC, the results showed that the average molecular weight of EAPS I was 7.01×10^4 and the mean molecular weight of EAPS II was 4.21×10^4 . EAPS I was consisted of 10.74% uronic acid, the content of SO_4^{2-} was 44.44 $\mu\text{g}/\text{mg}$; EAPS II was consisted 7.08% uronic acid, the content of SO_4^{2-} was 9.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$. The monosaccharide constitutions of EAPS I were 9.6549% D (+) xylose, 19.2522% D-fructose, 71.0930% glucose. The monosaccharide constitutions of EAPS II were 6.4065%, D (+) xylose, 18.0016% D-fructose, 75.5919% glucose.

Keywords: *Microcystis aeruginosa* var. *major*; extra cellular acidic polysaccharide; isolation; purification; physicochemical properties

铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*) 属于蓝藻门、色球藻科、色球藻目、微囊藻属, 分为无毒微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* Kutz) 和有毒微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* var. *major* A. M. Smith) 两类^[1], 其中在夏天由于水温升高形成的水华主要是有毒的铜绿微囊藻, 其藻体内会形成小分子肽的有毒物质^[2]。目前国内外对于铜绿微囊藻的研究, 主要集中在通过水体营养条件和环境温度的调节等方法来控制微囊藻的生长以及施

* 国家自然科学基金项目 (30370083) 和教育部科学技术研究重要项目 (01043) 联合资助。

2005-05-02 收稿, 2005-09-21 收修改稿。梅秋红, 女, 1979 年生, 硕士研究生。

** 通讯作者。

用药物抑制其繁衍生长或使其毒素降解来防止水质的恶化等方面^[3]。对爆发的水华的利用也还是简单地局限于将其处理成土壤肥料等较粗放的技术。现有资料表明蓝藻门中有许多微藻富含多糖,如富含酸性基团的螺旋藻多糖具有提高免疫力和抗肿瘤的生物学效应,引起了医药界的极大关注。具有酸性基团的蓝藻多糖的研究与开发在相关的研究机构已成为新的热点。前人的研究资料和研究工作都表明铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* K-3A) 在胞外能产生大量的黏液层多糖^[4],但是对于这种铜绿微囊藻胞外多糖,特别是酸性多糖的研究还未见报道,我们的工作旨在更有效的提取这种胞外酸性多糖,并力求避免藻体内小分子肽的污染,并研究其是否具有其他蓝藻酸性多糖类似的生物学活性,为充分利用水华资源,变害为宝提供有价值的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

铜绿微囊藻来自南京大学生科院藻类生物学研究室曾昭琪教授友情提供,藻细胞由南京师范大学生科院植物生物工程研究室培养。DEAE-纤维素(DE-52)、和 sephadex G-150 及各种标准分子量多糖均为 Sigma 产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 铜绿微囊藻胞外多糖的提取、分离和纯化

多糖的提取 3000pm/min 离心藻液,取上清液真空浓缩。收集的藻细胞加 5 倍体积水将 pH 调至 8.0,80℃ 提取 2 h,离心,取上清液浓缩。合并浓缩液,乙醇沉淀,丙酮洗涤,乙醚干燥,得到褐色的铜绿微囊藻胞外多糖粗提物。

脱蛋白、脱色 将铜绿微囊藻胞外多糖粗提物溶于水,加胰蛋白酶 37℃ 反应 4 h 后,蒸馏水透析,再采用 servage 法^[5]反复处理去掉蛋白质和小分子肽,直至多糖的紫外光谱分析^[6]显示无蛋白吸收峰,再按 1% (m/v) 比例加入活性炭粉末,80℃ 水浴搅拌 40 min,冷却后过滤,滤液冷冻干燥,得到粗多糖。

多糖的分离、纯化 将适量多糖溶解于 0.1 mol/L NaCl 溶液中,上 DE-52 (40 × 3.6 cm) 层析柱,先用 pH 8.0 的 0.1 mol/L 的 NaCl 洗脱,然后换用 0.1 mol/L-4 mol/L NaCl 浓度梯度溶液进行梯度洗脱,流速控制为 20 ml/h,收集过程中用硫酸蒽酮法跟踪检测多糖峰的出现^[6]。收集多糖峰部位的洗脱液,浓缩,透析脱盐,加无水乙醇沉淀,乙醚干燥。再将收集的多糖上 Sephadex G-150 层析柱 (80 × 2.6 cm),蒸馏水洗脱,硫酸蒽酮跟踪检测,收集合并多糖峰的洗脱部分,浓缩,冷冻干燥得精品多糖。

1.3 多糖分子量的测定

参考魏远安等的方法^[7],采用高效液相色谱法测定所得多糖的分子量,色谱采用 TSK-GEL 色谱仪, GMPWXI (7.8 mm × 30 cm, 粒径 13 μ) 凝胶分析柱,流动相为 H₂O,流速 0.6 ml/min, RID 示差检测器。

1.4 多糖中的糖醛酸含量的测定

采用硫酸-吡啶法^[8] 样品中的己糖醛酸与浓硫酸作用形成生色原,后者定量与吡啶成色。以葡萄糖醛酸作参比绘制标准曲线。

1.5 多糖中的硫酸根含量的测定

采用硫酸比浊法^[9]检测,通过酸水解从糖复合物中释放硫酸基团,即可与氯化钡起沉淀反应,形成沉淀。其明胶溶液的 360 nm 光吸收值同样品中的硫酸根的浓度成线性关系,由标准硫酸盐作参比绘制标准曲线,根据标准曲线换算样品中硫酸根的含量。

1.6 胞外多糖各组分单糖结构组成分析

参考夏尔宁的方法^[10],取精品多糖 5 mg,分别加 3 mol/L 硫酸 2 ml 于沸水浴中水解 10 h,65℃、BaCO₃ 中和,抽滤,滤液定容至 5 ml,留作高效液相色谱分析用,色谱采用 ZORBAX 碳水化合物分析柱。

2 结果与讨论

2.1 铜绿微囊藻胞外多糖的提取

提取铜绿微囊藻胞外多糖时,藻液 pH 控制为 8.0,提取温度控制在 80℃,时间控制在 2 h,其目的是尽量提取出藻细胞外的酸性多糖,其热水抽提物脱水干燥后为黄褐色粉末,得率约为 10% (W/W),经检测,

粗提物中含蛋白类物质较多. 经反复脱色、脱蛋白至紫外检测无核酸和蛋白吸收峰(图1)为止, 所得粗多糖为粗提物的60%(W/W)左右.

2.2 铜绿微囊藻胞外酸性多糖的分离与纯化

粗多糖经 DE-52 离子交换柱层析分离, 在水洗阶段得到一个不能被 DE-52 吸附的数量较少的中性杂多糖峰, 再经 0.1-4 mol/L NaCl 梯度洗脱, 得到一个被 DE-52 吸附的多糖峰, 洗脱曲线如图 2 所示, 为单一对称峰(简称 EAPS), 该洗脱峰在 1 mol/L NaCl 浓度时出现, 提示 EAPS 含有酸性基团, 在偏碱性的环境中可能被 DE-52 所吸附. 其后没有其他洗脱的糖峰出现. EAPS 经透析脱盐后上 Sephadex G-150 柱层析进行进一步分离纯化, 蒸馏水洗脱. 得到如图 3 所示的洗脱曲线, 分别在 31 管和 70 管附近出现两个洗脱的多糖峰, 这两个多糖峰均呈对称状态, 且已经完全分开, 分别收集得到 2 个组分, 简称 EAPS I 和 EAPS II(质量比为 1.92:1).

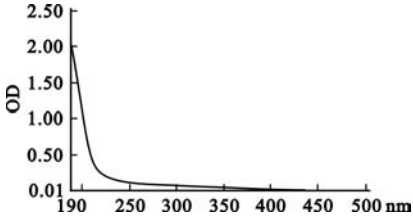


图1 多糖的紫外光谱扫描图谱

Fig. 1 Ultraviolet spectrum of polysaccharides

2.3 多糖中糖醛酸、 SO_4^{2-} 含量的测定

为进一步确定 EAPS I 和 EAPS II 中含有的酸性基团的种类和数量, 对这两个样品中的糖醛酸和 SO_4^{2-} 含量分别进行了测定. 结果为: EAPS I 糖醛酸含量为 10.74%, SO_4^{2-} 含量为 44.44 $\mu\text{g}/\text{mg}$; EAPS II 糖醛酸含量为 7.08%, SO_4^{2-} 含量为 9.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$. 表明这两者均含有糖醛酸和 SO_4^{2-} , 特别是糖醛酸的含量分别达到 10.74% 和 7.08%, 属于酸性多糖, 这与其能被 DE-52 吸附是吻合的.

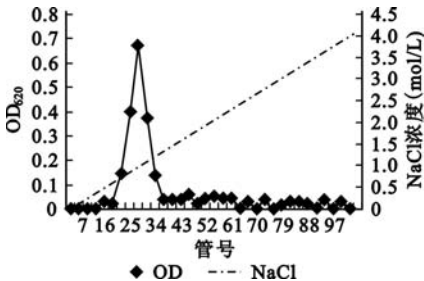


图2 过 DEAE-52NaCl 梯度洗脱曲线

Fig. 2 Chromatograph of crude Polysaccharides on DEAE column

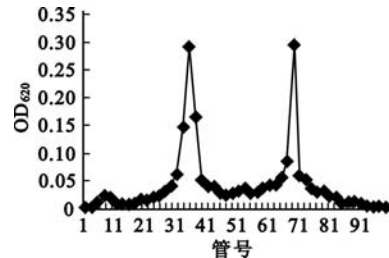


图3 过 Sephadex G-150 洗脱曲线

Fig. 3 Chromatograph of EAPS on Sephadex G-150

2.4 胞外酸性多糖各组分分子量的测定

根据图 3 与 EAPS I 和 EAPS II 的高效液相色谱图(图 4, 图 5), 分析表明, 经 DE-52 和 Sephadex G-150 柱层析分离后, 得到的两个酸性多糖的组分已达到均分子量的水平, 参照不同分子量的多糖标准品的高效液相色谱图, 根据其保留时间, 可推算 EAPS I 的均分子量约为 $7.01 \times 10^4 \text{D}$, 其分子量分布宽度为 2.89 min; EAPS II 的均分子量约为 $4.21 \times 10^4 \text{D}$, 分子量分布宽度为 2.26 min.

2.5 多糖中单糖组成测定

EAPS I 和 EAPS II 经酸水解后分别作 HPLC 测定. 根据标准单糖样品及 EAPS I 和 EAPS II 的水解样品 HPLC 出峰时间(图 6, 图 7), 可以推算出 EAPS I 和 EAPS II 的单糖组成及相对含量. EAPS I 中主要含有: 9.6549% 的 D(+)-木糖, 19.2522% 的 D-果糖, 71.0930% 的葡萄糖; EAPS II 中主要含有: 6.4065% 的 D(+)-木糖, 18.0016% 的 D-果糖, 75.5919% 的葡萄糖. 表明 EAPS I 和 EAPS II 都是杂多糖.

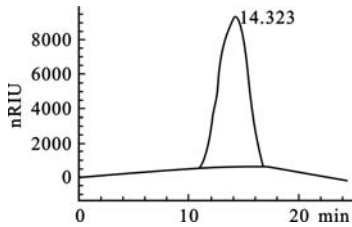


图4 EAPS I 高效液相色谱图

Fig.4 The HPLC spectrum of EAPS I

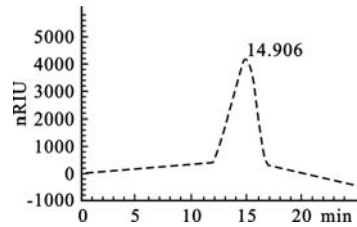


图5 EAPS II 高效液相色谱图

Fig.5 The HPLC spectrum of EAPS II

3 讨论

铜绿微囊藻胞外具有粘液层,胞内亦含有丰富的多糖组分,目前对于微囊藻多糖的提取通常是用热水抽提,而这种抽提方法无法将铜绿微囊藻胞外和胞内多糖严格区分开,因此我们将提取温度控制在 80℃ 并将提取时间控制在 2 h,且为使提取的胞外多糖尽量是含酸性基团的组分,故采用弱碱液抽提,将提取的藻液 pH 控制为 8.0. 实验结果表明这种提取方法是有效的,提取率高达 10%,得到的胞外粗多糖含有少量中性杂多糖,但以酸性多糖为主. 中性多糖不能为 DE-52 所吸附,而带有酸性基团的组分在 NaCl 梯度洗脱时呈单一对称峰,表明离子交换柱层析能成功分离铜绿微囊藻胞外多糖中的中性杂多糖和酸性多糖. 酸性多糖经具有分子筛效应的 Sephadex G-150 的进一步分离,得到均分子量大小不同的两种酸性多糖 (EAPS I 和 EAPS II),其分子量、单糖组分和酸性基团的构成与铜绿微囊藻胞内酸性多糖均有显著区别^[11],该结果不仅表明提取铜绿微囊藻胞外酸性多糖的目的基本达到,还显示出该藻的胞外黏液多糖较后者更为丰富,其粗多糖的提取率能达到 6%,为铜绿微囊藻今后的开发应用奠定了坚实的基础.

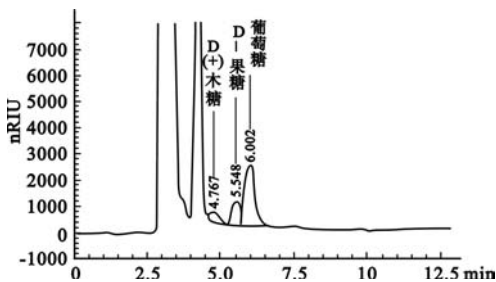


图6 EAPS I 水解高效液相色谱图

Fig.6 The HPLC spectrum of EAPS I after hydrolysis

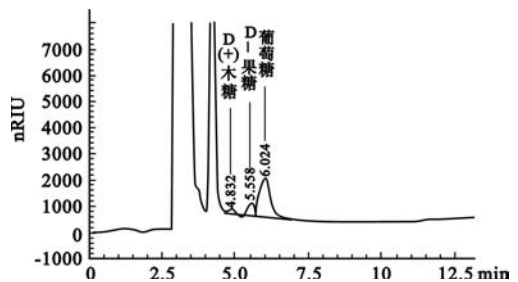


图7 EAPS II 水解高效液相色谱图

Fig.7 The HPLC spectrum of EAPS II after hydrolysis

对于多糖的单糖组成分析,传统方法为将多糖进行衍生后做气相色谱分析,或水解后做薄层层析,由于多糖衍生过程非常复杂并且条件难以控制,给分析带来了较大难度,薄层层析也常显示不清,因此我们采用盐酸水解多糖,然后用氨基柱对水解后的产物结合标准单糖进行 HPLC 色谱分析;另外传统的分析多糖分子量的方法是将多糖上普通凝胶柱,根据多糖样品的洗脱体积和标准分子量多糖的洗脱体积之间的关系来推测其分子量范围,这种方法的缺点是操作复杂,分子量测定误差较大,我们结合标准分子量葡聚糖,采用高效液相色谱对多糖的分子量进行测定,所得到的结果应该更可靠更准确. 分子量测定的结果表明 EAPS I 的均分子量明显较 EAPS II 大,前者含木糖的比例较后者大,而含果糖和葡萄糖的比例较后者小,特别是 EAPS I 的糖醛酸含量和 SO_4^{2-} 含量均明显高于 EAPS II,在酸性强弱上应该亦有区别. 之所以在 DE-52 柱层析时呈单一洗脱峰,可能是两者分子大小不一使电荷密度相差不大所致.

对于这两种酸性多糖的结构上的特点分析和比较,我们正在用红外、紫外光谱、核磁共振的 C 谱、H 谱和一些化学方法作深入的研究,将进一步报道由于这两种酸性多糖在分子大小、糖醛酸等酸性基团数量上的不同和结构上存在的差异,可能导致他们的生物学效应不同,两者的生物学活性比较的实验我们也正在进行之中。

4 参考文献

- [1] Steyn D G. Poisoning of animals and human being by algae. *S Afr J Sci* ,1945 :41 -43.
- [2] Hee-Hock oh , Seog June Lee , Min-Ho Jang , Byung-DaeYoon. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorous-limited chemostat. *Appl Environ Microbiol* ,2000 ,**66**(1) :176 - 179.
- [3] Vincenzini M. Studies of molecular and theological properties of the exopolysaccharide produced by *Cyanospira capsulate* cultivated under different growth conditions. *J Appl Phocol* ,1993 **5** :539 -541.
- [4] Kakagawa M. Isolation and characterization of the slime from a cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* K - 3A. *Agric Biol Chem* ,1987 ,**51**(2) :329 -337.
- [5] Hilde B. Separation , isolation and characterization of acidic polysaccharides from the inner bark of *Ulmus glabra Huas* . *Carbohydrate Polymers* ,1992 ,**20**(11) :2491 -2495.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1997 :12.
- [7] 魏远安, 方积年. 用 HPLC 测定多糖的纯度及分子量的研究. *药学报* ,1989 **24** :532.
- [8] Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *Biol Chem* ,1947 **16**(7) :189 -198.
- [9] Kato T. Effects of *Spirulina* (*S. platensis*) on dietary hypercholesterolemia in rats. *J Jap Soc Food Sci* ,1984 ,**37** :323 -332.
- [10] 夏尔宁. 黑木耳多糖的分离、纯化与鉴定. *生物化学与生物物理学报* ,1988 **20**(6) :613 -618.
- [11] 王习达, 吴国荣, 陈景耀等. 铜绿微囊藻酸性多糖提取分离及理化性质研究. *中药材* ,2003 **26**(12) :865 -867.