

滇池微囊藻水华多糖的提取和化学特征*

耿兰芳^{1,2,3}, 李朋富^{1,2}, 宋立荣⁴, 孔繁翔^{1**}, 于洋¹, 王玉炯³, 刘志礼²

(1:中国科学院南京地理与湖泊研究所湖泊与环境国家重点实验室, 南京 210008)

(2:南京大学生命科学学院, 南京 210093)

(3:宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

(4:中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要:为了研究“水华”微囊藻多糖及其对水体化学和生态特性的影响,以去离子水、pH5 的缓冲液和 pH9.2 的缓冲液为提取液,分别在 4℃ 和 80℃ 条件下从滇池“水华”微囊藻中提取多糖,并对其所提多糖部分化学特征进行分析. 结果表明 pH9.2 的缓冲液所提多糖总得率最高,为 2.25%; pH5 的磷酸盐缓冲液所提多糖总得率最低,为 0.383%. 溶解性分析表明,不同提取液所提多糖在所试验的几种溶剂中表现为不溶、分散或部分溶解,未能找到将多糖完全溶解的溶剂. 气相色谱和气-质联用分析表明,不同提取液所提多糖都含有中性单糖鼠李糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和一个未知糖. 硫酸-咪唑法分析显示不同提取液所提多糖含有糖醛酸. 电感耦合等离子光谱显示去离子水 4℃ 条件下所提多糖含有很高的金属元素钙和镁,分别为 2.15% 和 0.4%. 初步研究显示,“水华”微囊藻多糖为酸性杂多糖,低溶解性显示在自然水体中它易形成多糖颗粒,有较高含量的金属元素说明它会影响到这些金属元素在滇池中的溶解、沉积、生物利用和循环,特别是钙和镁.

关键词:滇池;微囊藻;多糖;化学特征

Extraction and chemical characterization of polysaccharides from a *Microcystis* water-bloom in Lake Dianchi

GENG Lanfang^{1,2,3}, LI Pengfu^{1,2}, SONG Lirong⁴, KONG Fanxiang¹, YU Yang¹, WANG Yujiong¹ & LIU Zhili²

(1: State Key Laboratory of Lake Science and Environment, Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China)

(2: College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China)

(3: College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, P. R. China)

(4: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China)

Abstract: The aim of this paper is to study the polysaccharide of the native water-bloom cyanobacterium *Microcystis* spp. and its effect on chemical and ecological properties of aquatic environments. Polysaccharides from the water-bloom cyanobacterium *Microcystis* spp. of Lake Dianchi were extracted with deionized water, pH5 and pH9.2 buffer at 4℃ and 80℃. Partial chemical characteristics of extracted polysaccharides was investigated. The results showed that pH 9.2 buffer got the highest yield that was 2.25%. The lowest yield was 0.383% with pH5 buffer. The solubility test indicated that polysaccharides extracted by various methods were insoluble, partly solubilized or dispersed in the examined solvents. The monosaccharide composition analysis with GC and GC-MS indicated the extracted polysaccharides contained rhamnose, arabinose, mannose, galactose, glucose and one unknown sugar. The sulfuric acid carbazole method showed the presentation of uronic acid in the extracted polysaccharides. The metal content was determined with inductively coupled plasma quantometer. The polysaccharide extracted with deionized water at

* 江苏省博士后科研资助计划项目(0601053B)和国家重点基础研究发展计划项目(2002CB412305)联合资助. 2006-12-07 收稿, 2007-03-19 收修改稿. 耿兰芳, 女, 1982 年生, 硕士研究生; E-mail: sunny668822@sina.com.

** 通讯联系人; E-mail: fxxkong@niglas.ac.cn.

4°C was found to contain high concentration of Ca and Mg, which was 2.15% and 0.4%, respectively. Preliminary study indicated that the polysaccharide from *Microcystis* spp. was acidic heterogeneous polysaccharides. The low solubility of the polysaccharide showed it may form transparent exopolymer particles easily in natural water. The high metal-binding capability of the polysaccharide showed it may influence the solubilization, precipitation, bio-availability, and cycling of metals in aquatic environments, especially Ca and Mg.

Keywords: Lake Dianchi; *Microcystis* spp.; polysaccharide; chemical characterization

由于内陆水体富营养化程度不断加剧而导致有害蓝藻水华的频繁发生已经是一个世界性的环境问题, 在一些湖泊、水库和池塘等水体中发生的蓝藻水华使饮用水质下降, 水产养殖业减产, 严重影响生态景观. 我国是受这类水华影响最大的国家之一, 太湖、巢湖和滇池等湖泊中每年都会发生严重的蓝藻水华. 微囊藻 (*Microcystis* spp.) 是形成蓝藻水华的主要种类之一^[1].

形成水华时微囊藻多以群体形式存在, 微囊藻细胞产生大量的多糖类胶鞘将藻细胞粘结在一起形成群体, 其中一部分胶鞘多糖被溶解和释放到周围水体中. 在藻死亡后, 胶鞘多糖以及微囊藻胞内多糖都将释放到周围水体中. 这些多糖能够螯合水中的金属离子, 影响水体中金属离子的溶解、沉积、生物利用和循环. 微囊藻释放的多糖不仅会影响到水体中多糖的浓度, 还会与微生物和碎屑粘结形成有机聚集体 (organic aggregates). 因此, 水华爆发过程中以及水华分解后所产生的多糖将影响水体的一些化学和生态特性^[2-4].

一些报道显示室内纯培养的微囊藻胶鞘多糖是酸性杂多糖, 能够富集金属离子^[2,3,5-9]. 但是, 对野外采集的微囊藻的多糖研究很少, 能够找到的文献只有关于巢湖微囊藻多糖提取的研究^[10]. 本文主要研究去离子水、酸与碱提取液对滇池微囊藻多糖提取得率的影响, 以及所提多糖的溶解性和部分化学特征, 旨在为微囊藻水华的利用提供基础信息.

1 材料和方法

1.1 材料

微囊藻样品: 将从滇池海埂基地采收的水华微囊藻经尼龙筛过滤采收后晒干制成, 采收时间 2004 年夏天, 其水华蓝藻主要成分为微囊藻属, 束丝藻属 (*Aphanizomenon* Morr.) 占极少部分.

1.2 “水华”微囊藻多糖的提取

称取滇池微囊藻样品, 经 70°C 烘箱烘干至恒重后, 分别加入 20 倍 (质量体积比) pH5 的缓冲液、pH9.2 的缓冲液和去离子水, 4°C 冰箱浸泡藻块 12 h, 然后用研钵将其研碎, 于 4°C 条件下浸提过夜, 12000 转/min 离心 20 min, 收集上清液, 分别重复提取三次, 合并上清液. 4°C 浸提后剩余残渣分别用相应的 pH5 的缓冲液、pH9.2 的缓冲液和去离子水在 80°C 水浴中浸提 6 h, 离心收集上清液, 分别重复提取三次, 合并上清液.

pH5 的缓冲液配制: 将 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 5.0. pH9.2 的缓冲液配制: 0.2 mol/L 碳酸钠溶液和 0.2 mol/L 碳酸氢钠溶液以 4:46 的体积比混匀.

1.3 用三氯乙酸法去除多糖中的蛋白、核酸和色素^[11]

将收集的上清液分别加三氯乙酸至终浓度 10% 于 4°C 冰箱静置过夜后, 12000 转/min 离心 20 min 除去沉淀, 上清液用旋转蒸发仪在 45°C 下减压浓缩至原体积的 1/5, 然后加 3 倍体积的 95% 酒精醇析, 离心收集沉淀, 将收集的多糖溶于水后, 自来水流水透析 48 h, 再用蒸馏水透析 36 h, 每 12 h 换一次蒸馏水. 将多糖溶液冻干, 恒重后计算得率, 得率是三次重复实验结果的平均值.

1.4 多糖溶解性分析

用蒸馏水、1 mol/L 氢氧化钠、0.1 mol/L 氢氧化钠、6 mol/L 尿素、2% Triton X-100、1% 十二烷基硫酸钠、10% 三氯乙酸和 2% 六偏磷酸钠分别作为溶剂, 将 3 mg 多糖加到 3 ml 溶剂中, 室温下摇床上搅动 48 h, 观察不同方法所提多糖的溶解性.

1.5 红外光谱分析

取冻干的多糖样品 3 mg 经溴化钾压片, 在波数 4000 - 400 cm⁻¹ 区间内进行扫描. 红外光谱分析使用美

国 NICOCET 公司 NEXUS 870 型傅里叶变换红外光谱仪。

1.6 单糖组分分析

1.6.1 中性单糖组成分析 取多糖样品 7 mg 放入安瓿瓶中,加入 3 mol/L 三氟乙酸 2 ml,充入氮气,烧融封口,在 120℃ 下水解 2 h,水解后的糖溶液用过滤空气将样品吹干。按照李铁林等人的方法进行糖脎衍生化^[12],加入 7 mg 盐酸羟胺和 0.5 ml 吡啶,90℃ 水浴反应 30 min 并振荡,取出后冷却至室温,加入 0.5 ml 醋酸酐,在 90℃ 下继续反应 30 min 进行乙酰化,反应完成后进行气相色谱和气-质联用分析。单糖标准品处理同上。

气相色谱条件:仪器惠普 HP-6890,色谱柱为 HP-55% 苯甲基硅烷(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),流量 1.3 ml/min;无分流进样,进样温度 260℃;程序升温:150℃ 保留 2 min,从 150℃ 以 2℃/min 升温到 220℃,从 220℃ 以 30℃/min 升温到 280℃;氢火焰离子检测器,检测温度 300℃,载气为氮气。

气-质联用条件:气-质联用仪器(安捷伦-5975);气相色谱条件:色谱柱为 DB-5 毛细管柱(30 m × 0.32 mm × 0.25 μm),进样温度 260℃,分流比 100:1;程序升温:140℃ 保留 2 min,从 140℃ 以 4℃/min 升温到 220℃,从 220℃ 以 30℃/min 升温到 280℃。质谱条件:EI 离子源,电子能量 70 eV,源温 250℃,扫描范围:40-550 amu。

1.6.2 硫酸-吡啶法分析多糖中糖醛酸含量^[13] 量取 0.8 ml 微囊藻多糖溶液于带塞试管中,然后向试管中分别加入 4 mol/L 氨基磺酸和 pH8.4 的硼酸缓冲液各 0.1 ml,混匀后再加入 96.4% 的浓硫酸 5 ml,于 100℃ 水浴锅中加热 6.5 min,冷却后加 0.2 ml 0.2% 吡啶乙醇溶液混匀,100℃ 水浴锅中加热 10 min,冷却后于 525 nm 测 OD 值,以葡萄糖醛酸为标准品绘制标准曲线,由标准曲线计算出糖醛酸含量。不同提取液所提多糖的糖醛酸含量的测定如上述方法操作。

1.7 电感耦合等离子光谱分析

取冻干的多糖样品经硝化处理,用 ICPS-1000 II 型电感耦合等离子体发射光谱仪(日本岛津公司产品)分析金属离子的含量。

2 结果与分析

2.1 “水华”微囊藻多糖提取得率

不同提取方法所提多糖经三氯乙酸处理后在 200-400 nm 处进行紫外扫描,发现 260 nm 和 280 nm 处无吸收峰,表明多糖中蛋白质和核酸已经被除去。

表 1 不同提取液在不同温度下对多糖提取得率的影响

Tab. 1 Effect of various solutions at different temperature on the polysaccharide extraction yield

提取液	pH5 缓冲液			去离子水			pH9.2 缓冲液		
	4℃	80℃	总计	4℃	80℃	总计	4℃	80℃	总计
提取得率(%)	0.20	0.19	0.39	0.43	0.33	0.76	1.57	0.68	2.25

不同提取液在不同温度下对“水华”微囊藻多糖的提取得率不同(表 1)。不管是 4℃ 条件下,还是 80℃ 条件下,多糖的提取得率从大到小的顺序总是:pH9.2 缓冲液 > 去离子水 > pH5 缓冲液。从总的多糖提取得率看,pH9.2 缓冲液是去离子水的 2.96 倍,是 pH5 缓冲液的 5.76 倍,这显示微囊藻多糖更易于被碱性提取液溶解。不管是哪一种提取液,4℃ 条件下的多糖得率总是高于 80℃ 条件下的多糖得率,尤其是 pH9.2 缓冲液提取时,4℃ 条件下的得率是 80℃ 条件下得率的 2.3 倍,这显示了微囊藻多糖在 4℃ 条件下易被提取液溶解。pH9.2 缓冲液提取时多糖的总提取得率为 2.31%,这显示滇池“水华”微囊藻所含多糖至少为 2.25%。

2.2 多糖溶解性分析

三种提取液在不同温度下所提多糖在水中都是部分溶解,为此我们试验了文献中所用的几种溶剂^[7],结果没有找到合适的溶剂能将多糖完全溶解。所提多糖在这些溶剂中呈部分溶解、分散或不溶解状态(表

2). 当呈现部分溶解状态时,大部分多糖溶解,溶液中有少量的絮状物漂浮;当呈现分散状态时,块状多糖在溶剂中变成小的颗粒分散于溶剂中或者贴于容器壁上,但肉眼观察此时总的多糖并未见明显减少;当呈现不溶解状态时,多糖在溶剂中仍然呈现悬浮的块状,肉眼观察多糖未见减少或者分散.

表 2 不同提取液所提“水华”微囊藻多糖的溶解性

Tab. 2 The solubility of the extracted polysaccharides by various solvents from the water-bloom cyanobacterium *Microcystis* spp.

溶剂	pH5 缓冲液 (4℃)	pH5 缓冲液 (80℃)	pH9.2 缓冲液 (4℃)	pH9.2 缓冲液 (80℃)	去离子水 (4℃)	去离子水 (80℃)
蒸馏水	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解
0.1 mol/L 氢氧化钠	分散	分散	部分溶解	部分溶解	分散	分散
1 mol/L 氢氧化钠	分散	分散	部分溶解	部分溶解	分散	分散
6 mol/L 尿素	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解
1% 十二烷基硫酸钠	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解	部分溶解
10% 三氯乙酸	部分溶解	部分溶解	不溶解	不溶解	不溶解	不溶解
2% 六偏磷酸钠	部分溶解	部分溶解	不溶解	不溶解	分散	分散
2% Triton X-100	不溶解	不溶解	不溶解	不溶解	不溶解	不溶解

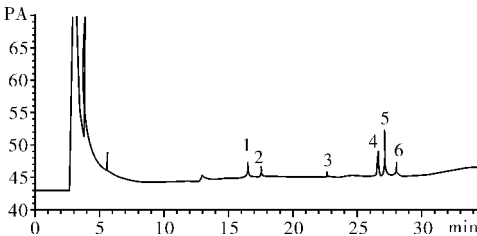


图 1 去离子水 80℃ 条件下所提多糖的气相色谱
(1: 鼠李糖; 2: 阿拉伯糖; 3: 未知糖;
4: 甘露糖; 5: 葡萄糖; 6: 半乳糖)

Fig. 1 Gas chromatography of the polysaccharide extracted with deionized water at 80℃

2.3 红外光谱分析

选取了提取的 4 个多糖样品进行红外光谱分析(红外光谱图略),红外光谱都显示了多糖类物质的特征吸收峰:3420-3380 cm^{-1} 有宽展圆滑的强吸收峰为 O-H 键的伸缩振动;2940-2930 cm^{-1} 的吸收峰为 C-H 键的伸缩振;1260-1240 cm^{-1} 的吸收峰为 C-H 键的变角振动. 三种提取液在 80℃ 下所提多糖的红外光谱相似, pH9.2 缓冲液在 4℃ 和 80℃ 条件下提取的多糖红外光谱也相似.

2.4 单糖组分分析

气相色谱的结果(表 3)显示,不同条件下提取的微囊藻多糖的中性单糖组成种类相同,都是由鼠李糖、阿拉

伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖和一个未知糖(待定)组成的杂多糖,但是不同条件下所提多糖的中性单糖组成的比例不同. 去离子水 80℃ 所提多糖的气相色谱(图 1),其它多糖样品的气相色谱图略. 气-质联用分析的结果证明气相色谱分析的单糖组成种类是正确的(质谱图略). 因为 pH5 缓冲液所提多糖的得率较低,没有作单糖组成分析.

表 3 不同提取液所提“水华”微囊藻多糖的中性单糖组成(%)

Tab. 3 Neutral monosaccharide composition of the polysaccharides extracted with various solutions from the water-bloom cyanobacterium *Microcystis* spp.

提取液	鼠李糖	阿拉伯糖	未知糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
pH 9.2 缓冲液(4℃)	13.09	9.03	7.13	18.60	18.65	36.51
pH 9.2 缓冲液(80℃)	7.73	9.30	8.08	17.53	39.09	18.26
去离子水(4℃)	16.10	13.35	9.10	22.82	22.84	15.78
去离子水(80℃)	14.94	10.67	5.31	21.18	38.19	9.72

经测定不同条件下所提多糖中糖醛酸含量分别为:去离子水 4℃ 是 6.07%, 去离子水 80℃ 是 6.62%, pH9.2 缓冲液 4℃ 是 7.02%, pH9.2 缓冲液 80℃ 是 7.26%。因此,滇池“水华”微囊藻多糖为酸性杂多糖。

2.5 电感耦合等离子光谱分析

等离子光谱分析结果显示,去离子水在 4℃ 条件下所提多糖中含有很高的钙和镁。选取去离子水在 4℃ 条件下所提多糖进行金属离子含量分析是考虑到该提取条件温和,对多糖整合的离子没有任何影响(表 4)。

表 4 去离子水 4℃ 条件下所提多糖中的金属离子含量*

Tab. 4 Metal content of the polysaccharide extracted with deionized water at 4℃

金属离子	Al	Ba	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Na	Sr	Zn
离子含量	338	26	2.15	30.4	266	0.4	4.4	466	109	173

* 离子含量除 Ca、Mg 为%外,其余均为 $\mu\text{g/g}$ 。

3 讨论

一般来说酸性多糖物质易溶于碱性溶剂中,而碱性多糖易于在酸性条件下提取^[14],因为单糖组成分析的结果显示滇池微囊藻多糖为酸性杂多糖,这就可以解释本实验中碱性缓冲液提取的多糖得率高的原因。而董宏平等研究巢湖微囊藻多糖的提取时发现,水提比碱提的得率高^[10],这与本实验的结果不一致,可能是因为巢湖微囊藻多糖与滇池微囊藻多糖的性质不一样导致的,因为巢湖微囊藻多糖的单糖组成未做分析,在此只能作简单推测。本实验结果显示 pH9.2 缓冲液在 4℃ 冷水中就能溶解大量的微囊藻多糖(表 1),藻类的光合作用可以导致周围水体 pH 值升高至 10 以上^[15],因此在自然界中当微囊藻光合作用旺盛导致 pH 值升高时会使得微囊藻胶鞘多糖易于溶解在水中。

溶解度实验显示,微囊藻多糖在所试验的溶剂中都不能全部溶解,这与铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* K-3A)胶鞘多糖难以溶解的特性相似^[7],这显示微囊藻多糖在自然水体中的溶解性不会太高,容易形成多糖颗粒^[16]。

从单糖组成看,滇池微囊藻多糖是酸性杂多糖,这与室内培养的微囊藻胶鞘多糖是一致的,但它们的单糖组成种类不完全一样^[2,7-9]。等离子光谱结果显示,滇池微囊藻多糖含有较高含量的金属元素,特别是钙和镁,微囊藻多糖会影响到这些金属元素在滇池中的溶解、沉积、生物利用和循环。

4 参考文献

- [1] 雷腊梅,宋立荣. 微囊藻及其毒素分子生物学研究进展. 自然科学进展,2002,12(4):350-355.
- [2] Plude J L, Parker D L, Schommer O J *et al.* Chemical characterization of polysaccharide from the slime layer of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(6): 1696-1700.
- [3] Parker D L, Schram B R, Plude J L *et al.* Effect of metal cations on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(4): 1208-1213.
- [4] Grossart H P, Simon M. Formation of macroscopic organic aggregates (lake snow) in a large lake: The significance of transparent exopolymer particles, phytoplankton and zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 1997, 42(8): 1651-1659.
- [5] 张成武,吴洁. 蓝藻细胞外多糖的研究概况. 中国海洋药物,1997,63(3):20-25.
- [6] Li P F, Harding S E, Liu Z L. Cyanobacterial exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2001, 18: 375-404.
- [7] Nakagawa M, Takamura Y, Yagi O. Isolation and characterization of the slime from a cyanobacterium. *Microcystis aeruginosa* K-3A. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, 51(2): 329-337.
- [8] 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.

- [9] 梅秋红, 缪月秋, 张成武等. 铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* var. *major*) 胞外酸性多糖的分离、纯化及其理化特性研究. 湖泊科学, 2005, 17(4): 322 - 326.
- [10] 董宏平, 李建宏, 范海红. 水华微囊藻多糖复合物的提取. 南京师大学报(自然科学版), 1999, 22(3): 91 - 94.
- [11] Mehta V B, Vaidya B S. Cellular and extracellular polysaccharides of the blue-green algae *Nostoc*. *Journal of Experimental Botany*, 1978, 29(113): 1423 - 1430.
- [12] 李铁林, 吴昌贤, 张燕霞. 糖和糖醇的气相色谱分析研究(II): 糖腈乙酰酯衍生物气相色谱分析的改进. 分析化学, 1982, 10(5): 272 - 276.
- [13] John T, Galambos. The reaction of carbazole with carbohydrates, 1. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. *Analytical Biochemistry*, 1967, 19: 119 - 132.
- [14] 郭勇. 现代生化技术. 广州: 华南理工大学, 1996: 3 - 4.
- [15] 刘志礼, 李朋富. 螺旋藻富集铜锰的两个试验. 南京大学学报(自然科学版), 1999, 35(2): 244 - 251.
- [16] Worm J, Sondergaard M. Alcian Blue-stained particles in a eutrophic lake. *Journal of Plankton Research*, 1998, 20(2): 179 - 186.