

普通念珠藻中多糖的分离纯化研究

郭晓强^{1,2}, 何 钢^{1,2}, 姚 倩^{1,2}, 刘 崑², 黎红艳¹, 苟小军^{2*}

1. 成都大学 生物产业学院, 四川 成都 610106

2. 成都大学 药食同源植物资源开发四川省高校重点实验室, 四川 成都 610106

摘 要: **目的** 研究普通念珠藻多糖分离纯化方法, 并测定其相对分子质量。**方法** 采用水提醇沉法制备粗多糖, Molish反应和硫酸苯酚法对其进行定性和定量检测, 二乙胺基纤维素离子交换柱色谱法进行分离纯化, 高效凝胶渗透色谱法测定其相对分子质量。**结果** 普通念珠藻粗多糖的提取率为 8.6%, 分离获得一个组成均一的酸性多糖组分 NSP, 其重均相对分子质量为 402 717。**结论** NSP 为首次从普通念珠藻中分离得到一个酸性多糖组分。

关键词: 普通念珠藻; 多糖; 纯化; 相对分子质量

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2013)03-0328-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.016

Separation and purification of polysaccharides in *Nostoc commune*

GUO Xiao-qiang^{1,2}, HE Gang^{1,2}, YAO Qian^{1,2}, LIU Wei², LI Hong-yan¹, GOU Xiao-jun²

1. Faculty of Biotechnology Industry, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. The Key Laboratory of Medicinal and Edible Plants Resources Exploitation (Chengdu University), Sichuan Province Education Department, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective To separate and purify *Nostoc commune* polysaccharides, and determine their molecular weight. **Methods** *Nostoc commune* polysaccharides were obtained by water extraction and alcohol precipitation. After the qualitative and quantitative tests of these crude products by Molish reaction and phenol sulfuric acid method, diethylaminoethyl cellulose (DEAE) ion exchange column chromatography was utilized for their separation and purification. And their molecular weights were determined by high performance gel filtration chromatography (HPGFC). **Results** The extraction rate of *Nostoc commune* polysaccharides was 8.6%. After the separation and purification, one homogeneous fraction of NSP was obtained, which was identified as acidic polysaccharides and its average molecular weight was determined to be 402 717. **Conclusion** NSP is separated from *N. commune* as acidic polysaccharides for the first time.

Key words: *Nostoc commune*; polysaccharides; purification; molecular weight

普通念珠藻 *Nostoc commune* Vauch. 属于藻类中的单细胞固氮蓝藻类, 为念珠藻科的念珠藻属, 又称地木耳、地皮菜、地耳、地踏菜、地软、地衣、地捡皮。普通念珠藻含有多种人体所需的营养物质^[1], 其中普通念珠藻多糖可以很好地清除超氧阴离子和羟基自由基^[2]。普通念珠藻多糖复合物还具有抗菌和植物生长调节作用^[3-4]。目前国内外对普通念珠藻的化学成分、生物活性和开发利用等研究处于起步阶段, 有关化学成分的分离纯化、分析鉴定、活性测定等研究还不够深入^[5]。多糖性质与其相对分子

质量有密切关系, 并且相对分子质量的测定是研究多糖性质的一项重要工作, 因此本实验对二乙胺基纤维素离子交换柱色谱法 (DEAE) 分离纯化的普通念珠藻多糖采用高效凝胶渗透色谱 (HPGFC) 法测定其重均相对分子质量, 为普通念珠藻多糖进行结构鉴定和生物活性研究提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

普通念珠藻采自四川省阆中市山区, 由成都大学生物产业学院陈封政教授鉴定为藻类蓝藻纲念珠

收稿日期: 2013-02-02

基金项目: 四川省应用基础研究项目 (2009JY0113)

作者简介: 郭晓强 (1972—), 副教授, 博士, 主要从事糖类药物的研究与开发。E-mail: guokedian@yahoo.cn

*通信作者 苟小军 (1974—), 教授, 博士。Tel: (028)84616301 E-mail: gmee@cdu.edu.cn

藻科念珠藻属植物念珠藻 *Nostoc commune* Vauch. 的藻体。

石油醚(沸程 60~90 °C)、乙醇、丙酮、乙醚、浓硫酸、 α -萘酚、正丁醇、三氯甲烷、葡萄糖、苯酚、氯化钠、氢氧化钠、磷酸二氢钾等均为分析纯(成都市科龙化工试剂厂)。透析袋(M_r 8 000, 美国联合碳化)、DEAE-650C(Tosoh 公司)、Dextran(葡聚糖) T-10、T-40、T-70、T-500、T-2000(百灵威科技有限公司)。

1.2 仪器

FZ102 型微型植物试样粉碎机(北京中兴伟业), UV—1800 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), UV—2802PC 型紫外扫描仪(尤尼柯上海仪器有限公司), FD—1C-55 型真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司), CT15RT 型台式高速冷冻离心机(上海天美科学仪器有限公司), DEAE 纤维素柱色谱系统(GE 公司), 高效液相色谱仪、PDA—100 二极管阵列检测器(戴安中国有限公司)。

2 方法与结果

2.1 水提醇沉法制备粗多糖^[6]

普通念珠藻干燥后粉碎 100.0 g, 加入 0.5 L 石油醚回流 3 h, 滤过得滤饼, 真空干燥得 99.1 g。50 倍蒸馏水煮沸 3 h, 冷却, 离心取上清液。重复提取 3 次, 合并上清液, 减压浓缩至小体积, 向残余物中加入乙醇至终体积分数为 80%进行醇沉, 搅拌过夜, 离心, 收集沉淀, 依次用无水乙醇、丙酮、乙醚充分洗涤, 真空冷冻干燥, 得普通念珠藻粗多糖 8.6 g, 粗多糖得率为 8.6%。

2.2 Molish 反应定性分析

采用 Molish 反应对粗多糖进行定性分析。取粗多糖样品溶液 1 mL 加入试管中, 滴加 α -萘酚试剂 2 滴, 混匀, 然后沿试管壁缓慢加入浓硫酸约 2 mL, 样品溶液出现紫色环, 表明提取物中含有多糖组分。

2.3 Sevage 法对粗多糖的纯化

采用 Sevage 法除去普通念珠藻多糖中的蛋白类杂质。向多糖水溶液中加入适量的 Sevage 试剂[三氯甲烷-正丁醇(4:1)], 剧烈振荡 30 min, 离心去除沉淀, 取上清液, 重复上述操作 3 次, 念珠藻多糖溶液在 260、280 nm 处无明显吸收, 表明其中的蛋白类杂质已除尽。Sevage 试剂对多糖溶液处理前后的紫外扫描图谱见图 1。

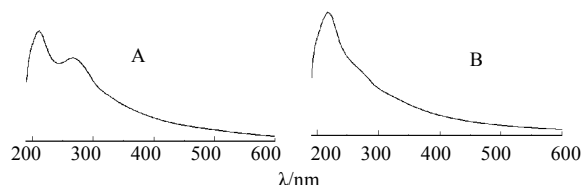


图1 普通念珠藻多糖纯化前(A)、后(B)紫外扫描图谱
Fig. 1 UV spectra of *Nostoc commune* polysaccharides solution before (A) and after (B) purification

2.4 多糖的硫酸苯酚法测定^[7]

2.4.1 对照品溶液的制备 葡萄糖对照品在 105 °C 条件下干燥至恒质量, 精确称取 200.0 mg, 蒸馏水溶解并定容至 100 mL, 得 2 mg/mL 溶液。分别取葡萄糖对照溶液 2.0、2.5、3.0、3.5、4、4.5、5.0 mL 于 50 mL 量瓶中, 并定容至刻度, 得 0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20 mg/mL 溶液。

2.4.2 标准曲线的制备 将 50 mL 浓硫酸缓缓加入 10 mL 水中, 冷却至室温, 加入 0.6 g 苯酚晶体搅拌使其溶解配成显色液。取 1.00 mL 葡萄糖对照溶液或待测试样溶液于试管中, 加入 5.00 mL 显色液, 震荡混匀。置于沸水浴中保温 30 min, 取出, 放在冷水浴中, 冷却至室温, 于 490 nm 处测定其吸光度值。根据葡萄糖对照品溶液的质量浓度和吸光度值绘制葡萄糖标准曲线, 得线性回归方程 $Y=3.0911X-0.009$ ($R^2=0.9975$), 表明葡萄糖在 0.08~0.20 mg/mL 时线性关系良好。

2.4.3 粗多糖的测定 按照以上方法计算出普通念珠藻粗多糖的质量分数为 66.0%。

2.5 DEAE-650C 柱色谱法分离

采用 DEAE-650C 柱色谱对普通念珠藻多糖进行分离。取 0.20 g 多糖溶解于 10 mL 蒸馏水中, 先以蒸馏水洗脱 60 min, 再以 0~3 mol/L 氯化钠溶液梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 同时以每管 2 mL 分部收集, 硫酸苯酚法检测, 绘制洗脱曲线, 见图 2。

在洗脱曲线的 3 个洗脱峰中, 峰 1、3 的峰型对称性较差, 未得到有效地分离, 应为非均一组分; 峰 2 的对称性较好, 可视为均一组分, 收集洗脱峰 2 的相关试管溶液, 透析处理, 减压浓缩, 真空冷冻干燥, 得多糖组分 0.025 g, 命名为 NSP, 该组分以氯化钠水溶液进行洗脱, 可初步判断为酸性多糖, 硫酸苯酚法测定其质量分数为 94.0%。

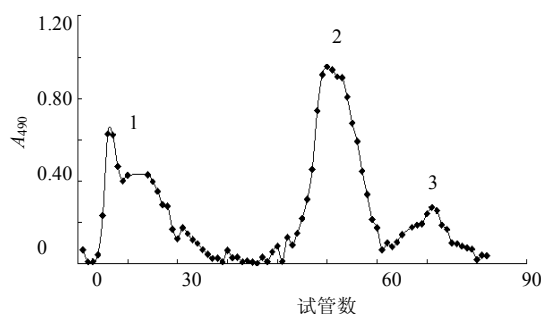


图 2 普通念珠藻多糖 DEAE-650C 洗脱曲线

Fig. 2 DEAE-650C elution curve of *Nostoc commune* polysaccharides

2.6 高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 法测定相对分子质量^[8]

2.6.1 色谱条件: 色谱柱为 YMC Pack-Diol 200(300 mm×8.0 mm, S-5 μm, 20 nm); 流动相为蒸馏水; 体积流量 0.8 mL/min, 柱温 35 ℃; 检测器为示差折光检测器; 进样量 20 μL。

2.6.2 测定结果 葡萄糖和标准葡聚糖 T-10、T-40、T-70、T-500、T-2000 分别用流动相溶解配制成 2 mg/mL 溶液进样, 记录洗脱峰的保留时间。相对分子质量 (M_r) 与其在色谱柱上的洗脱体积 (V)、分配系数 (K_{av}) 符合以下关系:

$$K_{av}=K_1-K_2\lg M_r, K_{av}=(V_e-V_0)/(V_t-V_0)$$

其中 K_1 、 K_2 为常数, V_0 为色谱柱的空体积, 即葡聚糖 T-2000 的流出体积; V_t 为色谱柱的总体积, 即葡萄糖的流出体积; V_e 为样品和其他标准品的洗脱体积。以上洗脱体积均以洗脱峰的保留时间代替。

结果见表 1, 以 K_{av} 对 $\lg M_r$ 进行线性回归处理, 得回归方程 $Y=-3.9434X+6.1149$ ($R^2=0.9989$), 计算得多糖组分 NSP 的重均相对分子质量为 402 717。

3 讨论

水提醇沉是制备水溶性多糖的常用方法, 对干燥的普通念珠藻使用石油醚进行脱脂处理有助于后续的纯化操作。Sevage 试剂处理 3 次多糖溶液就得到较好的纯化效果, 本实验条件下普通念珠藻粗多糖的提取率为 8.6%, 与文献报道的接近^[9]。

表 1 葡聚糖及普通念珠藻多糖相对分子质量

Table 1 Relative molecular weight of dextran and *Nostoc commune* polysaccharides

样 品	t/ min	K_{av}	M_r	$\lg M_r$
葡萄糖	14.220	1.000 0	198	2.297
T-10	10.101	0.541 8	10 000	4.000
T-40	8.611	0.376 0	40 000	4.602
T-70	8.112	0.320 5	70 000	4.845
T-500	6.213	0.109 2	500 000	5.699
T-2000	5.231	0	2 000 000	6.301
NSP	6.393	0.129 3	402 717	5.605

DEAE-650C 柱色谱分离普通念珠藻多糖得到一个组成均一的酸性多糖组分 NSP, 系首次从普通念珠藻中分离得到。同时多糖质量分数由 66.0% 提高到 94.0%, 高效凝胶渗透色谱 (HPGPC) 法测定其重均相对分子质量为 402 717。相关化学结构和生物活性还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 贺宝珍, 李义先. 地木耳营养价值及利用潜能研究 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 1991, 14(1): 93-96.
- [2] 汤 俊, 胡征宇. 3 种念珠藻多糖对自由基的清除作用 [J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(1): 63-66.
- [3] 盛家荣, 盛 凯, 邓丽瑛, 等. 普通念珠藻多糖复合物对植物生长的促进作用 [J]. 湖北农业科学, 2005(6): 46-48.
- [4] 钱森和, 厉荣玉, 魏 明, 等. 普通念珠藻多糖提取及其体外抑菌活性研究 [J]. 食品科学, 2012, 33(6): 96-99.
- [5] 范群艳, 吴向阳, 仰榴青. 地木耳的研究进展 [J]. 常熟理工学院学报: 自然科学版, 2007, 21(4): 55-59.
- [6] 范群艳, 吴向阳, 仰榴青. 响应面分析法优化地木耳多糖提取工艺的研究 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2007, 17(3): 236-240.
- [7] 徐光域, 颜 军, 郭晓强, 等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用 [J]. 食品科学, 2005, 26(8): 342-346.
- [8] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 第 2 版. 杭州: 浙江大学出版社, 2006: 117-120.
- [9] 盛家荣, 覃志英, 陈超球. 普通念珠藻中水提、碱提多糖的分离、分析及活性研究 [J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2001, 17(2): 80-84.