

紫球藻的培养及其硫酸多糖的分离纯化

夏海锋, 姚善泾*

(浙江大学化学工程与生物工程学系, 浙江 杭州 310027)

摘要: 利用优化了的海水培养基和简易光生物反应器对紫球藻进行培养, 建立了一套从培养液中直接分离纯化紫球藻多糖(PSP)的工艺, 并对纯化后的PSP进行了初步分析。实验表明, 本方法培养的紫球藻生物量达到了干重2.1g/L, 分离后粗PSP产量为0.378g/L, 离子交换得率约为78%。经气相色谱分析PSP主要由木糖、葡萄糖和半乳糖组成, 质量比约为13.68:7.83:5.23。红外光谱显示该多糖具有一般多糖的特征吸收峰, 其中六碳糖为吡喃型。PSP为硫酸酯化多糖, 硫酸基团含量约为4%。

关键词: 紫球藻; 紫球藻多糖; 培养; 分离纯化; 气相色谱; 红外光谱

Cultivation of *Porphyridium* spp. and Separation of Its Sulfated Polysaccharide

XIA Hai-feng, YAO Shan-jing*

(Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Culturing *Porphyridium* spp. with optimized culture medium and simple photobioreactor was investigated. A practical technical process on direct separation of Polysaccharide of *Porphyridium*(PSP) from broth was established, and PSP was primarily analyzed. The results showed that the biomass of cultured *Porphyridium* reached 2.1g dry weight per litre, yield of primary PSP 0.378g/L and efficiency of ion exchange about 78%. PSP was basically composed of xylose, glucose and galactose, with a mass ratio 13.68:7.83:5.23 respectively. The result by IR analysis indicates that PSP has its characteristic absorption peak, and its hexose is of pyranoid form while PSP is sulfated polysaccharide, and its content of $-SO_3^-$ is about 4%.

Key words *Porphyridium* spp. PSP; cultivation; separation of sulfated polysaccharides

中图分类号: Q539

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)03-0075-04

紫球藻(*Porphyridium* spp.)是目前唯一已培养利用的单细胞红藻, 广泛分布于海水、淡水、咸水及潮湿的土地中, 具有较强的抗盐能力, 可在含盐高达3.5%~4.6%的环境中正常生长^[1]。紫球藻胞外粘鞘层和胞内富含大量可溶性多糖, 即紫球藻多糖(polysaccharide of *Porphyridium*, PSP), 含量可达其生物量的20%~50%^[2], 并有一部分分泌到培养基中。紫球藻多糖可用作食品、医药、化妆品、纺织、印染、冶金、石油等行业的粘合剂和乳化剂, 也可用于食品行业及从沙质形成物中回收石油的增稠剂^[3]。Minkova等还报道了紫球藻多糖具有降血脂、抗凝血、抗病毒、抗细菌和抗辐射的作用, 因此医用前景十分广阔^[4]。

由于目前国内外紫球藻多糖分离纯化相关的文献十分有限, 方法也有局限, 因此本文主要参照了其他海藻多糖及植物类、真菌类多糖的分离制备方法, 提出了一条简单可行的工艺流程, 并对纯化得到的多糖进行

了初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

紫球藻藻种 中科院海洋种质库; 培养基优化了的海水培养基(g/L)^[5,6]: KH_2PO_4 0.03, $NaHCO_3$ 1, $NaNO_3$ 1.5, VB_{12} 3 μg , TES(微量元素混和溶液)1ml, 正三十烷醇1mg, 吡啶丁酸0.1mg, 海水晶30~35, 灭菌水配制; 其他试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 仪器和设备

发酵罐 江苏镇江东方生物工程设备技术公司; Ultrospec 3300pro分光光度计、AKTA explore 100层析系统 A. Pharmacia公司; 冷冻干燥器(Savant Modulyo-D230) 美国Thermo公司; Agilent GC 6820色谱分析仪 HP公司; 红外分析系统(Nexus 670) Nicolet公司。

1.3 方法

收稿日期: 2005-03-28

*通讯作者

作者简介: 夏海锋(1979-), 男, 博士, 研究方向为生物分离。

1.3.1 紫球藻培养

光反应器为7L气升式机械搅拌发酵罐,以4只40W环形日光灯均匀环绕为光照系统,外围光强约7200lx。配制2L的培养液,接种稳定期的紫球藻藻种液(相同培养条件培养时间为7d),接种量20%,培养温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,通气量2L/min,搅拌速度60r/min,每天补充一定量的 CO_2 和不含海水晶的培养基,培养时间为11d左右。

紫球藻生物量采用687nm比色法测定,对光照吸收值-生物量标准曲线得到对应的量。

1.3.2 紫球藻粗多糖的分离

取培养后的藻液,直接沸水浴30min,8层纱布过滤,旋转蒸发,浓缩至原来的一半左右,加入适量的无水乙醇醇沉,静置过夜。挑取絮状沉淀,用95%的乙醇洗涤3次,沉淀于原培养液体积的水中搅拌溶解,1000r/min离心去除不溶物,再旋转蒸发浓缩,得均一清液。

采用3种方法去蛋白:

(1) 三氯乙酸法 加入3%(体积比)2mol/L三氯乙酸,匀速摇匀,4℃下静置3h,14000r/min离心去沉淀,得清液。

(2) CTAB法 加入20%体积比的5% CTAB,匀速摇匀3h,14000r/min离心,沉淀溶于2mol/L NaCl中,离心去不溶物,得上清液。

(3) Sevage法 加入1/3体积的sevage试剂(氯仿:正丁醇 4:1),剧烈震荡,静置20min,14000r/min离心取上清液,重复几次。

得到的清液加入30%的 H_2O_2 配成浓度为2%,4℃静置过夜,醇沉,冷冻干燥得粗多糖。

1.3.3 PSP的离子交换层析

粗PSP溶于水配成溶液,经Sephacrose DEAE FF离子交换色谱分离,得一连续分布峰,收集峰部分,醇沉,洗涤,得到纯化后的PSP。所用系统为Pharmacia ÅKTA explore 100。缓冲液为pH8.5 Tris-HCl,洗脱液为1mol/L NaCl的pH8.5 Tris-HCl缓冲液。

1.3.4 糖含量、蛋白含量以及多糖中硫酸基团含量的测定

多糖溶液的糖含量采用苯酚硫酸法测定^[7],标准品为葡萄糖,OD_{490nm}对照标准曲线得到糖浓;紫球藻多糖在215nm处有特征吸收峰,紫外检测直接以OD_{215nm}表示多糖的含量;蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定,OD_{595nm}对照标准曲线得到蛋白含量^[8]。

Dodgson法测定PSP硫酸基含量^[9]:配制600μg/ml(SO_4^{2-} 含量)的 K_2SO_4 标准硫酸基溶液,溶剂为1mol/L HCl。精确吸取0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16、0.18、0.2ml标准硫酸基溶液于试管

中,补加1mol/L HCl溶液至0.2ml。另加入3.8ml 3%三氯乙酸和1ml氯化钡(1%)-明胶(0.5%)溶液,混合,室温静置15min,于分光光度计上测定360nm处光密度值,以0管作对照得 A_1 。另用同样标准溶液系列以明胶试液代替氯化钡-明胶溶液,以0管作对照得 A_2 。以 A_1-A_2 对硫酸基作标准曲线。

配制2mg/ml SP产品溶液,溶剂为1mol/L HCl,110℃加热8h后按上法测光密度值,对照标准曲线计算硫酸基含量。

1.3.5 GC分析PSP单糖组成^[7]

多糖水解:取多糖样品粉末20mg,加入2ml 1mol/L HCl,封瓶,110℃水解8h,50℃下减压烘干。

衍生物制备:快速称取10mg水解后的多糖,加入10mg盐酸羟胺,7mg肌醇,0.5ml吡啶,置90℃水浴中加热并震荡30min,取出后冷至室温,加入0.5ml乙酸酐,90℃水浴下继续反应30min进行乙酰化,反应产物经0.45μm油膜过滤直接作气相色谱分析。

1.3.6 PSP的红外结构图谱

KBr压片法测多糖的红外谱图,样品与KBr的比例约为1:20,所用仪器为美国Nicolet公司Nexus 670。

2 结果与讨论

2.1 紫球藻的生长

紫球藻种子液是在4℃下保藏的,接种后经过了一天的适应期,进入对数生长期,第7d到达第一个稳定期,此时收集种子液备用。紫球藻的生长情况如图1所示。从图中发现有一个二次生长的现象,发生在8d之后,紫球藻在经历了缓慢生长以后,又得到进一步生长,最后的生物量可以达到约干重2.1g/L。

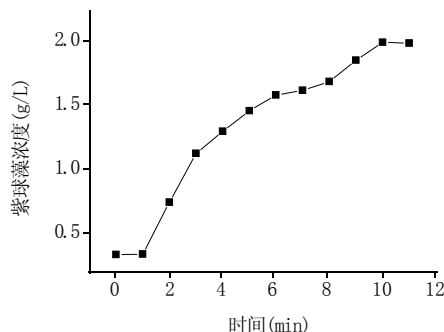


图1 紫球藻生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Porphyridium* spp.

2.2 不同乙醇用量对醇沉效果的影响

每一步醇沉时乙醇的用量对醇沉效果是有一定影响的,考察了不同乙醇用量对多糖中成分结构的影响,以多糖与所含蛋白之比为参数,结果示于图2中。由图可

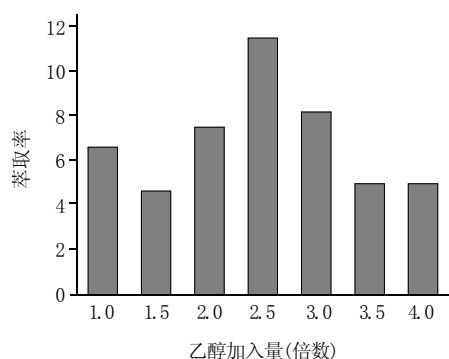


图2 醇沉效果的比较

Fig.2 Comparison of results in alcohol precipitation with different ethanol concentration

知, 在乙醇加入量为溶液的 2.5 倍时效果最好, 也就是说乙醇的浓度为 71% 左右时, 醇沉效果最好。

2.3 不同除蛋白方法的比较

三种去蛋白的方法均是常用方法, 同样以多糖与所含蛋白之比表示多糖有效成分的含量, 结果示于图 3 中。从图 3 中可以看出采用传统的 Sevage 法, 多糖对蛋白的比例明显偏高, 而且从图 4 中看出, 经过 5 次脱蛋白, 多糖中的蛋白基本被除去。

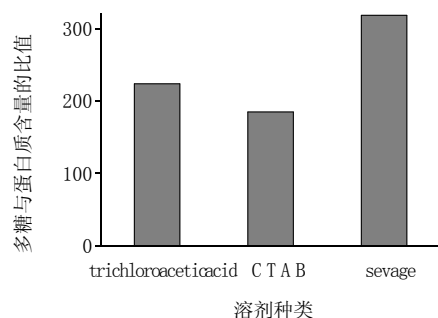


图3 不同除蛋白方法的比较

Fig.3 Comparison of results among different methods in protein removal

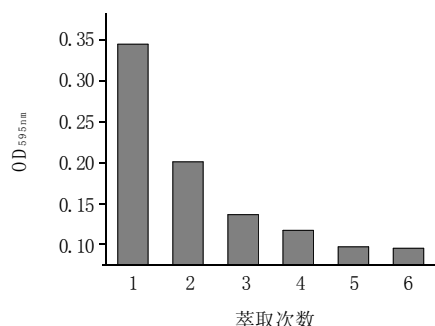


图4 Sevage 法除蛋白的效果

Fig.4 Results of protein removal with Sevage method

2.4 Sepharose DEAE-FF 离子交换

因为 PSP 分子量很大, 所以溶液的粘度比较大, 呈

现出胶体性质。经用旋转式粘度计测量, 2g/L 粗多糖溶液粘度约 9.8cp, 1g/L 约为 3.2cp, 0.75g/L 约为 1.8cp。较高浓度的溶液容易使层析系统柱压突然升高, 所以我们选择了 1g/L 的浓度作为合适的上柱浓度, 上样量为 5ml, 柱体积为 23ml, 流速为 2ml/min, 洗脱梯度为 6 个柱体积, 3ml/tube 分部收集。层析分离的结果如图 5 所示。

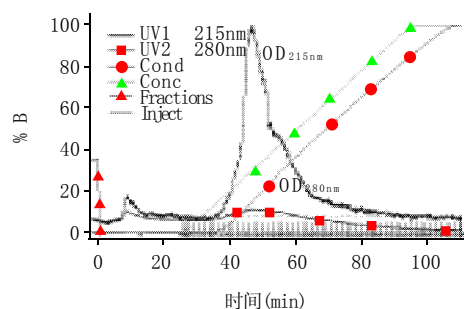


图5 PSP 的离子交换图谱

Fig.5 Ion exchange chromatographic chart of PSP separation

从图 5 中可以看到, 在 10min 时 OD_{215nm} 和 OD_{280nm} 均有一个峰, 显示有一定的洗脱成份, 推测为一部分未吸附的多糖和大部分蛋白; 在 100min 时, 即洗脱液的梯度浓度达到 30% 时, 洗脱出现峰值。收集洗脱峰中的多糖, 得到进一步纯化的 PSP。

2.5 气相色谱分析结果

标准单糖和纯化后的紫藻多糖经气相色谱分析, 结果示于图 6 和图 7 中。由图可知, 纯化后的 PSP 主要由木糖、半乳糖和葡萄糖组成, 这与文献报道的结果相同^[10], 但是各个单糖含量略有差别, 面积归一化得到质量比依次为 13.68:7.83:5.23 (木糖:葡萄糖:半乳糖), 葡萄糖含量超过半乳糖, 这与文献报道略有差别。

2.6 红外图谱的观察

图 8 是纯化后 PSP 的红外光谱图, 显示一般多糖类物质的特征吸收峰, 其中, 3419cm⁻¹ 处为 -OH 吸收峰;

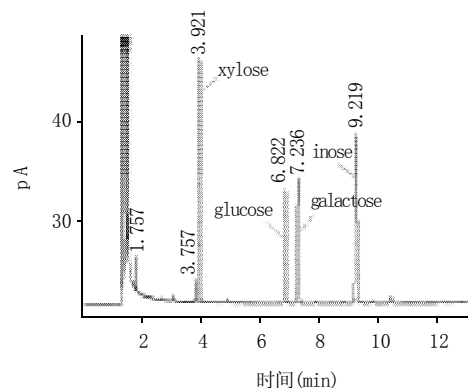


图6 标准单糖的 GC 图

Fig.6 Gas chromatographic chart of sugar marker

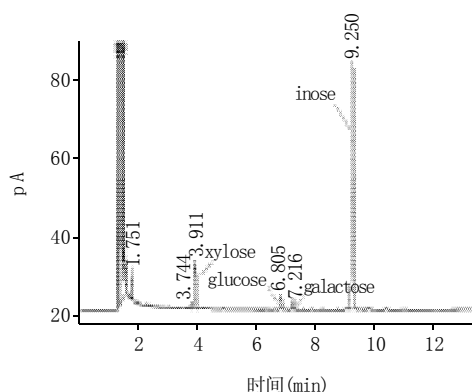


图7 PSP单糖组成GC图

Fig.7 Gas chromatographic chart of PSP samples

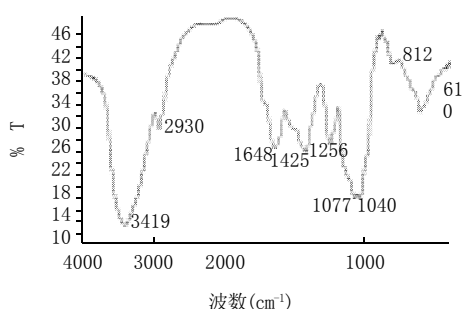


图8 PSP的红外光谱图

Fig.8 Infrared chart of PSP

2930 cm^{-1} 处为C-H的伸缩振动的吸收峰; 1648 cm^{-1} 处的吸收峰为C=O的振动峰, 说明PSS中存在游离羰基结构; 1425 cm^{-1} 处为C-O伸缩振动和C-H的弯曲振动吸收峰; 1256 cm^{-1} 处也有强吸收, 证明有 $-\text{OSO}_3^-$ 基团的S=O伸缩振动。1077和1040 cm^{-1} 处为吡喃环结构的C-O的吸收峰, 该吸收峰的存在说明紫球藻多糖中的六碳糖为吡喃型; 812处为 $-\text{OSO}_3^-$ 基团的C-O-S伸缩振动。

3 结论

紫球藻在简易光反应器下生长得到了很好的调节和控制, 最后得到的生物量为干重2.1g/L, 大于一般的户外培养。PSP的分离纯化大致经过了30min沸水提、2.5倍醇沉、Sevage除蛋白、2% H_2O_2 脱色和Sephacrose DEAE FF离子交换, 得到纯化后的PSP。粗PSP的得率为0.378g/L, 约占生物干重量的18%。离子交换的效率约为78%。Dodgson法显示PSP硫酸基含量约为4%, 证明紫球藻多糖为硫酸酯化多糖。

参考文献:

- [1] 华汝成. 单细胞藻类的培养与利用[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [2] Arad SM. The potential of production of sulfated polysaccharides from *Porphyridium*[J]. Plant and soil, 1985, 89(1): 117-127.
- [3] 王长海, 温少红, 鞠宝. 紫球藻多糖的提取和测定[J]. 中国海洋药物杂志, 1999, 69(1): 22-25.
- [4] Minkova K, ichailov Y, Toncheva-Panova T, et al. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide[J]. Pharmazie, 1996, 51(3): 194-199.
- [5] 王长海, 温少红, 欧阳藩. 紫球藻培养条件优化[J]. 化工冶金, 1999, 20(3): 272-277.
- [6] 萧华山, 林和, 范子男, 等. 红外线和植物生长物质对紫球藻生长及代谢的影响[J]. 热带海洋, 2000, 19(2): 64-68.
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [9] Dodgson K S, Price R G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides[J]. Biochem J, 1962, 84: 106-110.
- [10] Geresh S, Lupescu N, Arad SM. Fractionation and partial characterization of the sulphated polysaccharide of *Porphyridium*[J]. Phytochemistry, 1992, 31(12): 4181-4186.