

球等鞭金藻胞内和胞外多糖的分离纯化及其抑菌活性

孙颖颖, 周 豹, 徐深圳, 李文浩, 阎斌伦*

(淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘 要: 采用分级沉淀、Sephadex G-75 凝胶柱层析和 DEAE-52 离子交换柱层析对球等鞭金藻胞内粗多糖(IPS)进行分离; 对胞外粗多糖(IEPS)则进行 Sephadex G-100 凝胶柱层析分离。在此基础上, 分析所获多糖组分对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和变形杆菌等细菌的抑菌活性。同时, 通过紫外光谱和红外光谱测定, 比较 IPS 和 IEPS 结构的异同。结果表明: IPS 和 IEPS 均具有抑菌活性, 前者抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的生长, 后者抑制大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的生长; IPS 经 DEAE-52 纤维素柱层析分离, 获得 2 个多糖组分: IPS I 和 IPS II。IEPS 经 Sephadex G-100 凝胶柱层析分离, 获得 3 个多糖组分: IEPSA、IEPSB 和 IEPC。活性检测表明, IPS I 和 IPS II 抑制枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的生长; IEPSA、IEPSB 和 IEPC 抑制大肠杆菌的生长; 紫外光谱表明, IPS 和 IEPS 均不含核酸、游离或裸露的蛋白质和色素; IPS 和 IEPS 的红外光谱比较相似, 以半乳糖为构架, 均含有酰氨基取代基, 但不同之处在于, 后者不含硫酸取代基。

关键词: 球等鞭金藻; 胞内多糖; 胞外多糖; 分离纯化; 抑菌活性

Separation and Purification of Intracellular and Extracellular Polysaccharides from *Isochrysis galbana* and Their Antimicrobial Activity

SUN Ying-ying, ZHOU Bao, XU Shen-zhen, LI Wen-hao, YAN Bin-lun*

(Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: Two crude polysaccharides, intracellular polysaccharide (IPS) and extracellular polysaccharide (EPS), were isolated from the cells and culture supernatant of *Isochrysis galbana* through hot-water extraction. The separation and purification of IPS and EPS, and their antimicrobial activities against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus* sp. were investigate, respectively. IPS was separated by ethanol-precipitation and purified by Sephadex G-75 gel chromatography, or by DEAE-52 column chromatography, while EPS was fractionated by Sephadex G-100 gel filtration chromatography. Finally, IPS and EPS were analyzed by UV and IR spectroscopy. The results indicated that: 1) IPS could inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. EPS could inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. 2) IPS was separated into two fractions (IPS I and IPS II) by DEAE-52 column chromatography. Both fractions could inhibit the growth of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*; EPS was separated by Sephadex G-100 gel filtration chromatography into three fractions (EPSA, EPSB and EPSC) with inhibitory activity against the growth of *Escherichia coli*; 3) The IR and UV spectra of IPS and EPS showed no ester protein, nucleic acid or pigment. Typical absorption curves of IPS and EPS revealed galactose frame with pyranoglycoside linkage, while EPS did not exhibit sulfate radicals in the sugar linkage.

Key words: *Isochrysis galbana*; intracellular polysaccharide; extracellular polysaccharide separation and purification; antibacterial activity

中图分类号: Q949.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0137-05

收稿日期: 2011-05-12

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划重大项目(2006BAD09A01); 连云港市工业攻关科技计划项目(CG0803-1); 淮海工学院人才引进科研启动基金项目(KQ08001)

作者简介: 孙颖颖(1978 —), 女, 副教授, 博士, 研究方向为海洋生化工程。E-mail: syy-999@163.com

* 通信作者: 阎斌伦(1962 —), 男, 教授, 博士, 研究方向为虾蟹类增殖繁殖学。E-mail: yanbinlun@yahoo.com.cn

海洋微藻多糖具有抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射和降血糖等活性功效^[1-5]；且由于海洋微藻的生长条件和环境特点决定了其可能具有一些有别于陆生植物多糖的结构和功能，此类多糖在医药和医学领域中的应用潜力越来越引起人们对其的研究兴趣。球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)是水产养殖业中重要的饵料微藻，以往研究主要集中在脂肪酸上^[6-7]。Suknik^[6]、戴俊彪^[7]、王长海^[8]等实验发现，球等鞭金藻胞内多糖含量较高。然而，有关球等鞭金藻多糖的分离纯化研究较少，且目前尚未见此微藻多糖组分的抑菌活性报道。鉴于此，本实验从球等鞭金藻的藻细胞和培养液中分别提取胞内和胞外粗多糖。随后，采用分级沉淀、Sephadex G-75 凝胶柱层析、DEAE-52 离子交换柱层析以及 Sephadex G-100 凝胶柱层析等方法对胞内和胞外多糖进行分离。在此基础上，研究多糖组分的抑菌活性，并利用紫外光谱和红外光谱分析胞内和胞外粗多糖结构的异同，以期为进一步开展海洋微藻多糖的研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

球等鞭金藻由中国海洋大学提供，置于40L光照平板生物反应器中培养，通气量2.0L/min，温度(23±2)℃，光照强度3000lx，接种密度 $40 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ ，f/2培养基^[9]。培养10d后，离心，保存藻细胞和上清液，分别进行如下处理：藻细胞冷冻干燥，获得藻粉；上清液经0.45μm微孔滤膜过滤后，低温冷冻。冷冻干燥后，获得白色粉末状的胞外物。

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和变形杆菌由华中农业大学农业微生物种质及遗传资源保藏和利用中心提供。

Sephadex G-75、Sephadex G-100 和 DEAE-52 美国 Sigma 公司；乙醇、三氯乙酸(TCA)、盐酸、氢氧化钠、蒽酮、考马斯亮蓝均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-25 数显 pH 计 上海精密科学仪器有限公司；LXJ-IIB 低速大容量多管离心机 上海安亭科学仪器厂；UV-1800 紫外-可见分光光度计 北京瑞丽分析仪器有限公司；HH-S 恒温水浴锅 郑州长城科工贸有限公司；LG-5 真空冷冻干燥机 上海市离心机械研究所；Nicolet iS10 傅里叶红外光谱仪 赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 球等鞭金藻胞内和胞外粗多糖的制备

藻粉中按质量比1:20加入蒸馏水，混合均匀后，调pH值为9，70℃浸提3h。提取结束后，6000r/min离心10min。上清液加入3% TCA，4℃静置3h后，

6000r/min离心10min。上清液加入体积分数75%乙醇沉淀12h，经离心及冷冻干燥等处理后，得58g乳白色粉末，即球等鞭金藻胞内粗多糖(*Isochrysis galbana* polysaccharides, IPS)。

称取适量球等鞭金藻胞外物质干粉末，以料液比1:20加入蒸馏水溶解，调溶液pH值为10，于80℃提取6h。提取结束后，提取液经离心、过滤，乙醇沉淀后，制备到24.2g白色粉末，即球等鞭金藻胞外粗多糖(*Isochrysis galbana* extracellular polysaccharides, IEPS)。

1.3.2 IPS 的分离

1.3.2.1 分级沉淀及 Sephadex G-75 凝胶柱层析分离

称取5g IPS重新溶解后，依次用5%、50%和75%乙醇进行分级沉淀，获得3个组分，分别记为IPSA、IPSB和IPSC，质量依次为1.0、2.0、0.44g。所获组分重新溶解，配制质量浓度为0.05g/L后，将其加载于Sephadex G-75凝胶层析柱(2.3cm×50cm)用蒸馏水进行洗脱，每管收集3mL，流速2.5mL/min，馏分采用硫酸-蒽酮法检测^[10]。多糖组分合并收集后，进行抑菌活性检测。

1.3.2.2 DEAE-52 离子交换柱层析分离

将2.5g/L IPS溶液加载于DEAE-52离子交换层析柱(2.3cm×50cm)，依次用蒸馏水，0.1~0.5mol/L NaCl，0.1、0.5、1.0mol/L NaOH进行洗脱，每管收集3mL，流速为1.5mL/min，以硫酸-蒽酮法检测多糖，直至检测不出多糖组分，换用下一种洗脱液。多糖组分合并收集后，进行抑菌活性检测。其中，用NaCl和NaOH溶液进行洗脱所收集馏分经透析后，进行抑菌活性检测。

1.3.3 IEPS 的 Sephadex G-100 凝胶柱层析分离

将5g/L IEPS水溶液加入到Sephadex G-100层析柱(2.3cm×50cm)，采用蒸馏水洗脱，每管收集3mL，流速为1.5mL/min，馏分采用硫酸-蒽酮法检测。

1.3.4 IPS 和 IEPS 的抑菌活性

参照文献^[10]检测多糖组分对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和变形杆菌4种待测菌株生长的影响，多糖组分质量浓度均为0.05g/L。

1.3.5 多糖测定

用蒸馏水溶解粗多糖，取粗多糖水溶液，用Ultrospec 3300 pro紫外-可见分光光度计在200~800nm范围内进行光谱扫描。

取适量粗多糖样品粉末，采用压片法，用Nexus Euro型红外光谱仪测定其红外光谱。

2 结果与分析

2.1 IPS 的分离及抑菌活性

将 IPSA、IPSB 和 IPSC 这 3 个组分重新溶解后, 在 Sephadex G-75 凝胶柱层析上的洗脱曲线见图 1。IPSA 未得到明显的分离; IPSB 经分离, 在洗脱体积为 27~87mL 范围内出现 1 个峰; IPSC 在洗脱体积为 24~39mL 以及 42~87mL 范围内出现 2 个洗脱峰。

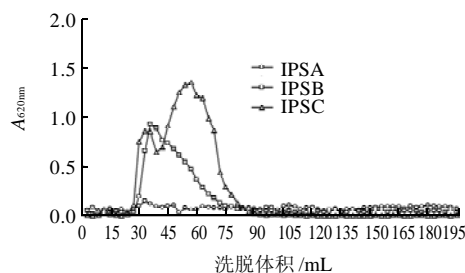


图 1 IPS 分级沉淀多糖组分经 Sephadex G-75 的洗脱曲线

Fig.1 Elution curves of IPSA, IPSB and IPSC on Sephadex G-75 column

IPS 经 DEAE-52 纤维素柱层析分离, 共得到 2 个组分, 即蒸馏水洗脱得到组分 IPS I, 1.0mol/L NaOH 洗脱得到组分 IPS II。0.1、0.2、0.3、0.4mol/L 和 0.5mol/L NaCl 以及 0.1mol/L 和 0.5mol/L NaOH 洗脱部分未检测到多糖(图 2)。

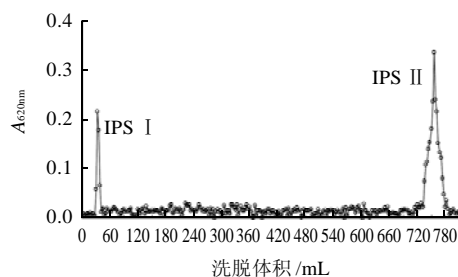


图 2 IPS 经 DEAE-52 洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of *Isochrysis galbana* polysaccharides on DEAE-52 column

图 1、2 表明, IPS 经乙醇分级沉淀和 Sephadex G-75 凝胶柱层析未获得很好的分离, 而采用 DEAE-52 纤维素柱层析获得较为理想的分离效果。关于 IPS 经 DEAE-52 纤维素柱层析分离获得的 IPS I 和 IPS II 是否为单一组分多糖, 还有待进一步实验研究。

洗脱液多次富集后, 将 IPS I 和 IPS II 浓缩(IPS II 还需透析), 配制为 0.05g/L 后进行抑菌活性检测, 结果见表 1。IPS 能抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的生长, 但对变形杆菌并无抑制作用。

IPSA、IPSB 和 IPSC 组分同样均能抑制枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的生长, 但对大肠杆菌并未表现出抑制作用; 胞内粗多糖经 DEAE-52 离子交换柱层析分离获得组分 IPS I 和 IPS II, 这 2 个组分能抑制枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌。

表 1 IPS 组分的抑菌作用

Table 1 Antibacterial activity of intracellular polysaccharides from *Isochrysis galbana*

IPS 组分	抑菌圈直径/cm			
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	变形杆菌	金黄色葡萄球菌
IPS	1.20 ± 0.07	1.10 ± 0.12	—	1.10 ± 0.13
IPSA	—	1.20 ± 0.05	—	1.20 ± 0.18
IPSB	—	1.20 ± 0.06	—	1.10 ± 0.09
IPSC	—	1.05 ± 0.10	—	1.20 ± 0.08
IPS I	—	1.20 ± 0.13	—	1.10 ± 0.07
IPS II	—	1.20 ± 0.11	—	1.10 ± 0.07

注: —, 不存在抑菌圈。下同。

2.2 IEPS 的分离及抑菌活性

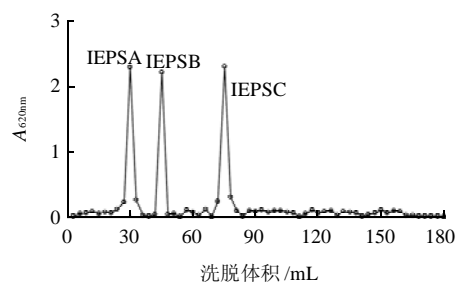


图 3 IEPS 经 Sephadex G-100 洗脱曲线

Fig. 3 Elution curve of *Isochrysis galbana* extracellular polysaccharides on Sephadex G-100 column

图 3 为 IEPS 在 Sephadex G-100 凝胶柱层析上的洗脱曲线, 获得 3 个组分, 即 IEPSA、IEPSB 和 IEPC。多次富集后, 将 IEPSA、IEPSB 和 IEPC 浓缩, 配制为 0.05g/L 后进行抑菌活性检测, 结果见表 2。对 IEPS 而言, 其对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌表现出抑制作用; 当 IEPS 经 Sephadex G-100 柱层析分离后, 所获的 IEPSA、IEPSB 和 IEPC 这 3 个多糖组分仅能抑制大肠杆菌的生长。

表 2 IEPS 组分的抑菌作用

Table 2 Antibacterial activity of crude extracellular polysaccharides from *Isochrysis galbana*

IEPS 组分	抑菌圈直径/cm			
	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	变形杆菌	金黄色葡萄球菌
IEPS	1.20 ± 0.08	1.10 ± 0.11	—	—
IEPSA	1.20 ± 0.07	—	—	—
IEPSB	1.20 ± 0.07	—	—	—
IEPC	1.05 ± 0.09	—	—	—

2.3 IPS 和 IEPS 的紫外光谱和红外光谱

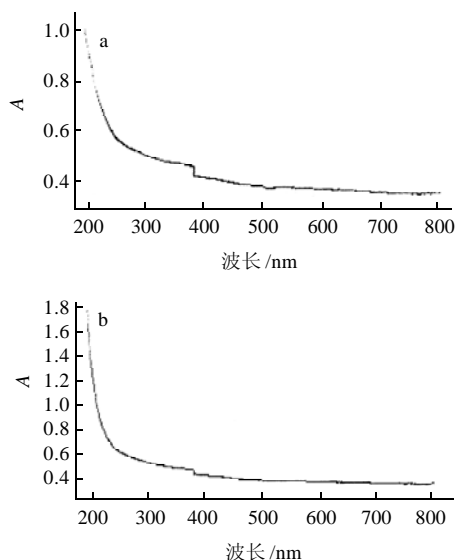


图4 IPS(a)和IEPS(b)的紫外光谱

Fig.4 UV spectra of intracellular and crude extracellular polysaccharides from *Isochrysis galbana*

由图4可知,无论是IPS,还是IEPS,在260nm(核酸特征吸收)、280nm(蛋白质特征吸收)和630nm(色素特征吸收)都没有吸收,说明IPS和IEPS均不含核酸、游离或裸露的蛋白质和色素。在螺旋藻多糖和糖蛋白提纯研究中,胡群宝等^[11]运用紫外光谱分析糖蛋白特征。孟庆勇等^[12]也采用紫外光谱扫描来分析江蓠多糖是否含有核酸和蛋白质。

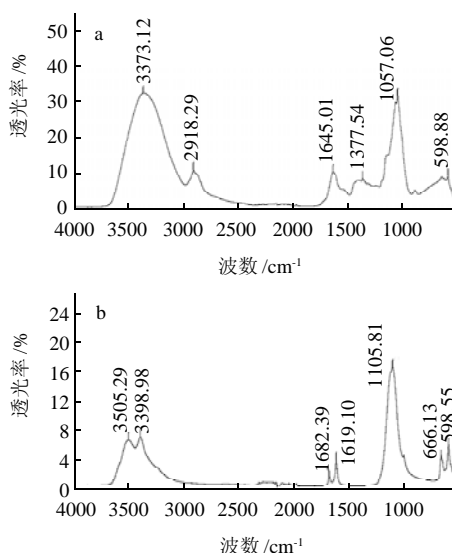


图5 IPS(a)和IEPS(b)的红外光谱图的比较

Fig.5 IR spectrum comparison between crude extracellular and intracellular polysaccharides from *Isochrysis galbana*

由图5可知,IPS和IEPS的红外光谱比较相似。3700~3100cm⁻¹和1075~1010cm⁻¹两处为糖类O—H和C—O特征吸收峰;在3000~2800cm⁻¹和1550~1200cm⁻¹的吸收峰为C—H伸缩振动和变角振动;1700~1500cm⁻¹附近的吸收峰为C=O伸缩振动,表明这两种多糖中均含有酰氨取代基,这与孟庆勇^[13]、张塞金^[14]等研究结果相符。两种粗多糖都在1057cm⁻¹附近有吸收峰,表明是一种以半乳糖为构架的分子模式。此外,在糖类环振动吸收区930~700cm⁻¹,两种糖在900cm⁻¹附近均有一个很微弱的吸收峰,是β-吡喃环C—H变角振动。IPS在1377cm⁻¹附近有较强吸收峰,IEPS红外光谱图未见吸收峰,这表明IPS含有硫酸取代基,IEPS不含硫酸取代基。

3 讨论

在微藻抗菌研究中,多数研究集中在微藻脂肪酸的抑菌活性方面^[15-20],而有关微藻多糖抑菌活性的研究则相对较少。目前,已经发现紫球藻和海水小球藻的多糖提取物对革兰氏阳性细菌有抑制作用^[21]。本研究发现IPS和IEPS也具有抑菌活性,前者抑制大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的生长,后者抑制大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的生长。

为了获悉球等鞭金藻粗多糖的抑菌机理,对IPS和IEPS进行了分离。IPS经DEAE-52纤维素柱层析分离,获得2个多糖组分:IPS I和IPS II;IPES经Sephadex G-100凝胶柱层析分离,获得3个多糖组分:IEPSA、IEPSB和IEPSC。活性检测表明,IPS I和IPS II抑制枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的生长;IEPSA、IEPSB和IEPSC抑制大肠杆菌的生长。通过一系列分离,发现多糖分离组分的抑菌活性有所改变(主要是抑菌活性的目标菌株有所减少),但仍具有抑菌活性,且抑菌活性与粗多糖相当,这个结果对于进行多糖的进一步纯化研究具有重要意义。

同时,比较发现IPS和IEPS的抑菌活性有所不同,笔者认为这与它们的结构有关。通过红外光谱测定,发现IPS和IEPS结构类似,以半乳糖为构架,均含有酰氨取代基,但不同之处在于,后者不含硫酸取代基,这很可能是二者抑菌活性差异的主要原因。张塞金等^[14]认为IPS不含硫酸取代基,与本结果不同。已有研究表明,微藻多糖的生物活性和生理功能主要来自于其所含的氨基和硫酸官能团^[22-23],因此,相比而言,IPS可能更具有应用价值。紫外光谱表明,IPS和IEPS均不含核酸、游离或裸露的蛋白质和色素,这就排除了由微藻蛋白质组分可能引起的抑菌作用。

参考文献:

- [1] HAYSAHI T, HAYSAHI K, MAEDA M, et al. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*[J]. Natural Product, 1996, 59(1): 83-87.
- [2] HAYSAHI K, HAYSAHI T, KOJIMA L. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolation from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *in vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities[J]. AIDS Res Hum Retr, 1996, 12(15): 1463-1471.
- [3] 顾宁琰, 刘宇峰. 紫球藻胞外多糖抗辐射的生物学活性研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(12): 53-56.
- [4] 刘艳, 杨海波, 赵莲华, 等. 扁藻多糖的分离分析及其生物活性的初步研究[J]. 生物技术, 2007(3): 53-56.
- [5] MINKOVA J. Antiviral activity of porphyridium cruentum polysaccharide [J]. Pharmazie, 1996, 51(3): 194-199.
- [6] SUKENIK A, WAHNON R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition(I): *Isochrysis galbana* [J]. Aquaculture, 1991, 97(1): 61-72.
- [7] 戴俊彪, 吴余庆. 室内外培养海洋单细胞微藻的生长及生化组分[J]. 海洋科学, 2000, 24(6): 29-32.
- [8] 王长海, 孙颖颖. 营养盐对球等鞭藻生长及多糖等生化成分含量的影响[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(11): 13-17.
- [9] ILLARD R R L, RYTHER J H. Studies of marine planktonic diatom. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun.[J]. Canada Journal of Microbio, 1962, 8: 229-238.
- [10] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 16-17.
- [11] 胡群宝, 郭宝江. 螺旋藻多糖和糖蛋白的提纯及其理特性研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(7): 41-44.
- [12] 孟庆勇, 王亚飞, 揭新明, 等. 粗江蓠多糖的提取及光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(10): 1903-1906.
- [13] 孟庆勇, 刘志辉, 徐美奕, 等. 半叶马尾藻多糖的提取和分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(12): 1560-1562.
- [14] 张赛金, 李文权, 邓永智, 等. 海洋微藻多糖的红外光谱分析初探[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, 44(B06): 212-214.
- [15] CANNELL R J P, MWSIANKA A, WALKER J M. Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from freshwater algae[J]. Br Phycol J, 1988, 23: 41-44.
- [16] KELLAM S J, WALKER J M. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture[J]. Br Phycol J, 1989, 24: 191-194.
- [17] 江红霞, 郑怡, 林雄平. 蛋白核小球藻脂溶性化合物的抑菌活性及成分分析[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(1): 1-5.
- [18] 李侠, 郑法新, 程璐. 6种海洋微藻提取物抑菌活性研究[J]. 德州学院学报, 2007, 23(6): 61-64.
- [19] 姚领. 海洋微藻抗菌活性菌株筛选及其活性物质分离纯化研究[D]. 天津: 天津商业大学, 2007.
- [20] 王芹. 微藻抗菌活性物质的分离纯化[D]. 大连: 大连理工大学, 2009.
- [21] 陈晓清, 郑怡, 林雄平. 二种微藻多糖与蛋白质提取物的抗菌活性[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2005, 21(2): 76-79.
- [22] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 193-198.
- [23] 刘艳, 杨海波, 于媛, 等. 两种微藻多糖的性质及结构特征的研究[J]. 水产科学, 2008, 27(3): 125-128.