

# 发状念珠藻胞外多糖的纯化与性质分析

于海峰<sup>1,2</sup>, 贾士儒<sup>1</sup>

1 天津科技大学 天津市工业微生物重点实验室, 天津 300457

2 山东轻工业学院 食品与生物工程学院, 济南 250353

**摘要:** 采用 DEAE 阴离子交换层析和 Sephadex G100 凝胶层析对液体悬浮培养发状念珠藻胞外多糖进行纯化, 得到两个组分 NFPS1 和 NFPS2。对组分 NFPS2 进行理化性质分析, 并与野生发状念珠藻多糖 NFPS0 的性质进行对比。结果表明二者具有相似的单糖组成, 均为葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖; 表观分子量分别为  $2.79 \times 10^5$ 、 $2.26 \times 10^5$ ; 均不含核酸、蛋白质等物质, 是非硫酸化多糖; 具有较高的热稳定性, 其降解温度在  $245^\circ\text{C}$  左右。但在微观结构上, 两者存在一定差别。

**关键词:** 发状念珠藻, 胞外多糖, 纯化, 理化性质

## Purification and Characterization of Extracellular Polysaccharides from *Nostoc flagelliforme*

Haifeng Yu<sup>1,2</sup>, and Shiru Jia<sup>1</sup>

1 Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 College of Food and Bioengineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250353, China

**Abstract:** The extracellular polysaccharides (EPS) of *N. flagelliforme* were purified by DEAE anion exchange chromatography and Sephadex G100 gel filtration chromatography. And two main components named NFPS1 and NFPS2 were obtained respectively. The physico-chemical characteristics of NFPS2 were analyzed and compared with NFPS0, which was obtained from field colony of *N. flagelliforme*. These results showed that both of NFPS2 and NFPS0 were composed of four monosaccharides: glucose, xylose, galactose and mannose. The apparent molecular weight of NFPS2 and NFPS0 was estimated to be  $2.79 \times 10^5$ ,  $2.26 \times 10^5$  respectively. They are non-sulfated polysaccharides, free of protein and nuclear acid. The thermal analysis indicated that there was a decomposition peak at  $245^\circ\text{C}$  in thermogravimetric (TG) curves. However, the microstructure analysis showed that they had different porous structures.

**Keywords:** *Nostoc flagelliforme*, extracellular polysaccharides, purification, physico-chemical characterization

蓝细菌多糖具有抗肿瘤、抗病毒和抗衰老等多种生物学活性<sup>[1]</sup>, 因此, 成为近年生物学领域研究的重点。发状念珠藻(*Nostoc flagelliforme*), 俗称“发菜”, 是一种生活在干旱半干旱地区的陆生性蓝细

菌。从野生发状念珠藻中分离得到的多糖 nostoflan 对单纯疱疹病毒(HSV-1)、人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus)、流感病毒(Influenza A virus)等多种具有封套的病毒(Enveloped viruses)有很强的抗病毒

**Received:** December 30, 2007; **Accepted:** March 12, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (Nos. 20376061, 20776112), the National Eleventh Five Supported Program of China (No. 2006BAD27B06).

**Corresponding author:** Shiru Jia. Tel: +86-22-60601598; E-mail: jiashiru@tust.edu.cn

国家自然科学基金项目 (Nos. 20376061, 20776112)和国家“十一五”支撑计划项目 (No. 2006BAD27B06)资助。

活性,是一种新型的生物活性多糖<sup>[2]</sup>。关于野生发状念珠藻多糖的提取和性质分析已有少量报道<sup>[2-4]</sup>。为提高发状念珠藻细胞的生长速度,我们研究了不同营养模式对发状念珠藻细胞的生长和多糖生物合成的影响<sup>[5]</sup>,并对液体悬浮培养发状念珠藻胞外多糖的部分理化性质进行分析<sup>[6]</sup>。但是,在液体悬浮培养过程中发状念珠藻细胞合成的胞外多糖,由于生长方式和环境的变化,与野生发状念珠藻多糖是否产生差异,未见报道。为此,我们进行了液体悬浮培养发状念珠藻胞外多糖和野生发状念珠藻多糖的纯化,进行了相关理化性质的比较分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

发状念珠藻细胞由天津市工业微生物重点实验室保存。野生发状念珠藻由宁夏大学提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 发状念珠藻细胞液体悬浮培养及胞外多糖的提取

按照我们先前报道的方法进行<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.2 野生发状念珠藻多糖的提取

称取干燥的天然发状念珠藻 2 g,剪成 0.5 cm 左右的小段,加入 200 mL 水,80°C 恒温水浴中浸提 2 h,抽滤,收集滤液。然后,采取与液体悬浮培养发状念珠藻胞外多糖相同的方法提取多糖。

#### 1.2.3 离子交换柱层析

液体悬浮培养和野生发状念珠藻粗多糖样品(0.5 mg/mL)分别上离子交换柱 Toyopearl DEAE 650 mol/L(日本 TOSOH 公司),先以 150 mL 蒸馏水进行洗脱,再采用 800 mL 0~1 mol/L 的 NaCl 溶液进行线性梯度洗脱,流速 1.0 mL/min。多糖活性由苯酚-硫酸法<sup>[7]</sup>逐管检测,合并有活性部分,蒸馏水透析 48 h,冻干后分别得到组分 NFPS 和 NFPS0。

#### 1.2.4 凝胶柱层析

Sephadex G100(瑞典 Pharmacia 公司)(Φ1.6×55 cm),用蒸馏水预先平衡。用蒸馏水溶解冻干多糖样品上柱,以 300 mL 蒸馏水进行洗脱,流速 0.5 mL/min。苯酚-硫酸法逐管检测,收集有活性部分。

#### 1.2.5 多糖的微观形貌分析

采用环境扫描电镜(QUANTA 200,荷兰 FEI 公

司)进行扫描,观察其不同放大倍数下的微观形态。

#### 1.2.6 多糖的表观形貌分析

采用原子力显微镜 AFM(JSMP-5200 型)扫描,将发状念珠藻多糖用去离子水溶解(0.2 μg/mL)。吸取 5 μL 于新鲜剥离的云母片上,室温干燥后,在常温常压下进行扫描。

#### 1.2.7 发状念珠藻多糖的单糖组成、紫外光谱、红外光谱等其他理化性质

按照 Jia 等<sup>[6]</sup>报道的方法进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 发状念珠藻多糖的纯化

#### 2.1.1 离子交换柱层析

发状念珠藻胞外多糖和野生发状念珠藻提取的粗多糖样品进行离子交换层析,洗脱曲线见图 1。

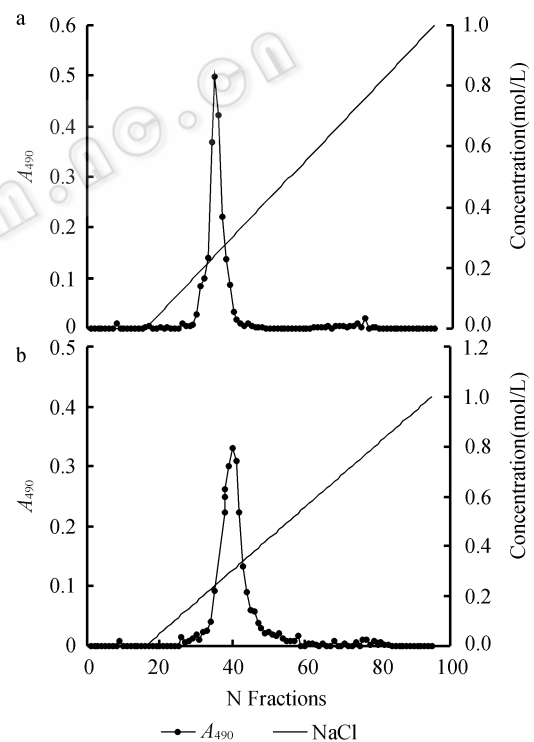


图 1 发状念珠藻多糖的离子交换柱层析洗脱曲线  
Fig. 1 Elution profiles of polysaccharides from *Nostoc flagelliforme* after DEAE anion exchange chromatography  
a: liquid suspension culture sample; b: field sample

发状念珠藻胞外多糖与野生发状念珠藻多糖的洗脱曲线均呈现单一的对称峰,出峰范围分别在第 26~44 和 26~55 管之间,表明二者均为酸性多糖,出峰位置比较接近,说明二者电荷性质基本相同。

### 2.1.2 凝胶柱层析

将离子交换层析后得到的多糖 NFPS 和 NFPS0 分别进行凝胶柱层析纯化, 洗脱曲线如图 2。

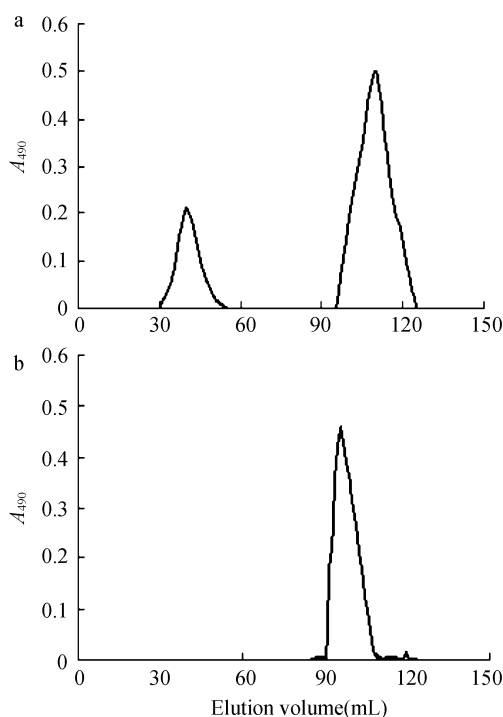


图 2 发状念珠藻多糖的凝胶层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution profiles of polysaccharide of NFPS and NFPS0 after Sephadex G100 gel filtration chromatography  
a: NFPS; b: NFPS<sub>0</sub>

多糖 NFPS 经凝胶柱层析后得到两个峰, 分别命名为 NFPS1 和 NFPS2, 二者峰形对称, 没有脱尾现象, 判断两种多糖分子量的分布均较为集中。而野生发状念珠藻多糖 NFPS0 经凝胶柱层析后得到一个峰, 而且与 NFPS2 的出峰洗脱液体积接近, 推测二者具有相似的分子量分布。

采用高效液相色谱法测定其表观分子量分别为 NFPS0( $2.26 \times 10^5$ ), NFPS2( $2.79 \times 10^5$ ); 与 Kenji Kanekiyo 等<sup>[2]</sup>报道的野生发状念珠藻多糖 nostoflan 分子量 ( $2.11 \times 10^5$ ) 在相同数量级范围内。

## 2.2 发状念珠藻多糖的理化性质分析

### 2.2.1 紫外光谱分析

对 NFPS0 和 NFPS2 进行紫外光谱分析(图 3)。两种多糖溶液在 260 nm 和 280 nm 处没有吸收峰, 说明二者均不含有游离或裸露的核酸和蛋白质。

### 2.2.2 红外光谱分析

从两种多糖的红外光谱(图 4)中可以看出, 在  $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$  区间, 样品具有多糖类物质的一般特

征: 表现在  $3600 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$  出现强宽谱带对应于 OH 的伸缩振动, 表明多糖存在分子内和分子间的氢键。  $3000 \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$  的吸收峰为糖类物质的特征吸收峰。  $1440 \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$  的吸收峰为羧基的吸收峰。  $\beta$ -糖苷键在  $895 \text{ cm}^{-1}$  左右有特征性的弱吸收峰,  $\alpha$ -糖苷键则在  $835 \text{ cm}^{-1}$  处有特征吸收峰, 在  $897 \text{ cm}^{-1}$  的吸收峰表明两种多糖的单糖的连接方式是  $\beta$ -糖苷键。红外扫描图谱在  $1250 \text{ cm}^{-1}$ , 以及  $1140 \text{ cm}^{-1}$  处没有发现 S=O 基团和 S-O-S 基团的吸收峰, 说明发状念珠藻胞外多糖与野生发状念珠藻多糖一样, 均是非硫酸化多糖, 这与已有的文献报道结果一致<sup>[2,6]</sup>。

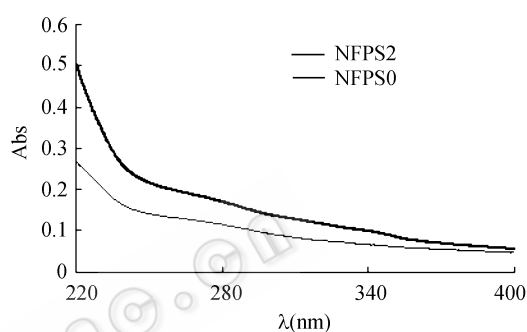


图 3 多糖的紫外光谱分析

Fig. 3 Ultraviolet spectra of polysaccharide of NFPS2 and NFPS0

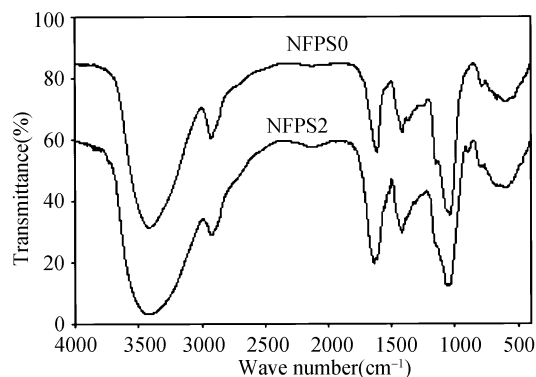


图 4 多糖的红外光谱分析

Fig. 4 IR spectra of polysaccharide of NFPS2 and NFPS0

### 2.2.3 发状念珠藻多糖的热重分析

除了化学性质, 多糖的应用还受其热稳定性的影响<sup>[10]</sup>。图 5 为两种多糖的热降解过程。

两种多糖的降解温度均在  $245^\circ\text{C}$  左右。热降解曲线均分为明显的 3 个阶段。从  $25^\circ\text{C} \sim 190^\circ\text{C}$  是降解的第一阶段, 此时主要是失去了多糖中吸附的水

分<sup>[11]</sup>。高于 190°C 的质量减少是由于多糖样品出现降解,从 230°C 开始降解速率加快,直到 580°C。第三阶段多糖的降解趋于缓和,直到温度为 1000°C 为止,最终多糖残渣的质量为 25%。从多糖的热重分析结果可以看出,NFPS2 与 NFPS0 的热稳定性非常形似。

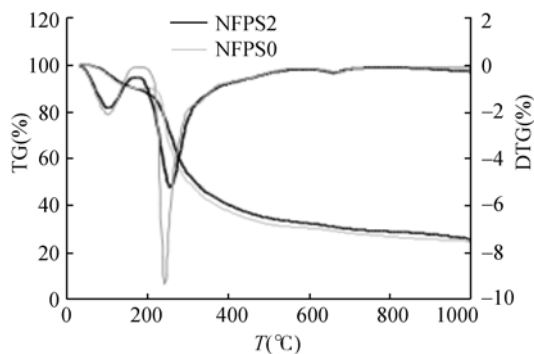


图 5 两种多糖的 TG/DTG 曲线

Fig. 5 TG/DTG curves of polysaccharide of NFPS2 and NFPS0

#### 2.2.4 发状念珠藻多糖的单糖分析

我们在前期研究中已经报道了液体悬浮培养发状念珠藻胞外多糖的单糖组成<sup>[6]</sup>。将纯化后的 NFPS0 和 NFPS2 经三氟乙酸(2 mol/L)水解后,糖腓乙酸酯化后进行气相色谱分析,结果如表 1。

表 1 发状念珠藻多糖 NFPS2 和 NFPS0 的单糖组成  
Table 1 Monosaccharides compositions of NFPS2 and NFPS0

	Glucose /%	Xylose /%	Galactose /%	Mannose /%
NFPS2	43.2	20.6	29.9	6.3
NFPS0	46.3	19.6	21.9	8.6
Field <sup>[12]</sup>	45.7	23.2	21.0	7.3
Field <sup>[12]</sup>	46.4	20.2	21.7	8.3
Nostocflan <sup>[2]</sup>	42.8	29.9	20.7	6.6

两种多糖具有相似的单糖组成,只是比例稍有区别。其单糖组成主要包括木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖。与文献报道不同的是没有糖醛酸的检出,这是因为样品中糖醛酸不能衍生,没有被气相色谱检出。

发状念珠藻多糖的单糖组成与性质研究已有报道<sup>[2,5,11]</sup>,但由于各研究者使用的藻株和研究方法不同,研究结果稍有差异(表 1)。与其他微生物来源多糖相比,发状念珠藻多糖的单糖种类较多,而单糖

组成和结构是多糖的生物学效应的物质基础。而且较多的单糖种类赋予发状念珠藻多糖更复杂的结构,可能具有与其他微生物来源多糖不同的性质,值得进一步深入研究。

#### 2.2.5 发状念珠藻多糖的微观形貌分析

发状念珠藻多糖 SEM 照片如图 6 所示。在低倍镜下观察,发状念珠藻多糖表面呈松散的片状卷曲聚集态;高倍镜下的电镜照片显示片状结构上有一些规则的“鱼鳞”状纹理,说明在发状念珠藻细胞培养过程中产生的多糖在相互聚集时具有一定的方向性。野生发状念珠藻多糖在低倍镜下的表面形态与细胞培养多糖不同,呈现出疏松的多孔结构。高倍镜下可以发现多糖分子聚集呈块状。两种多糖集中规整性不强,直观地说明其为无定形结构。

#### 2.2.6 发状念珠藻多糖的分子形貌分析

原子力显微镜给多糖的分子表面形貌观察提供了极大方便<sup>[13]</sup>。图 7 是两种多糖地原子力显微镜图像。由图可以看出细胞发状念珠藻多糖分子互相缠绕,形成大大小小地无规则线团和半球状,紧密地平铺在云母片上。多糖的球面厚度为约 1~2 nm,宽度在 20~50 nm。一般说来多糖分子链地一般宽度为 0.1~1.0 nm<sup>[14]</sup>,本文图像显示的多糖宽度为 20~50 nm,说明观测的多糖为多个多糖分子的聚集体。而野生发状念珠藻多糖在云母片上可以看到单个分子链和其多个侧枝,聚合物链分子间互相缠绕成股,链间通过糖单元间不同的连接方式衍生出许多聚集体,尺寸在 150~300 nm 范围内,从而直接证实了多糖大分子具有高度分枝的化学结构。

### 3 结论

虽然发状念珠藻多糖具有重要的生物学功能,但是,由于野生发状念珠藻生长速率极为缓慢,限制了其应用。而液体悬浮培养可以有效提高其生长速率和胞外多糖产量<sup>[5]</sup>。研究表明液体悬浮培养的发状念珠藻多糖和野生发状念珠藻多糖除微观形态稍有差异外,在理化性质、单糖组成和热分解行为等方面具有高度相似性,展现出液体悬浮培养发状念珠藻胞外多糖可以代替野生发状念珠藻多糖的可贵前景。

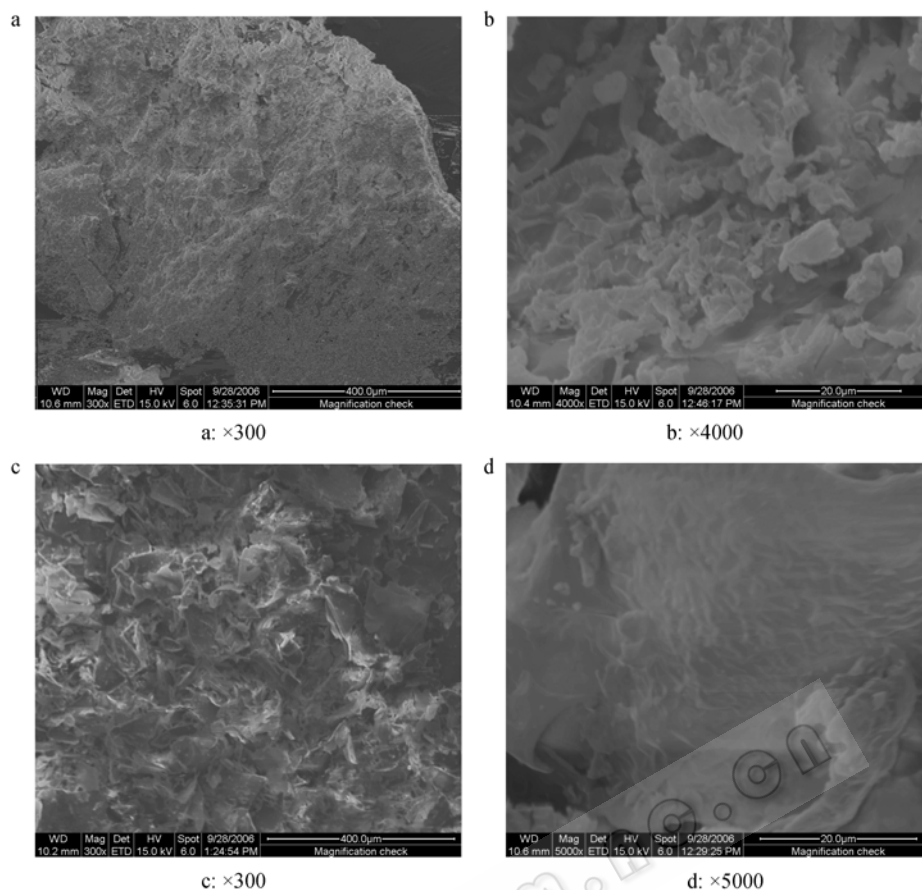


图 6 发状念珠藻多糖的电镜照片

Fig. 6 SEM image of polysaccharide from *N. flagelliform* cells  
a, b: EPS from field colony; c, d: EPS from liquid suspension culture

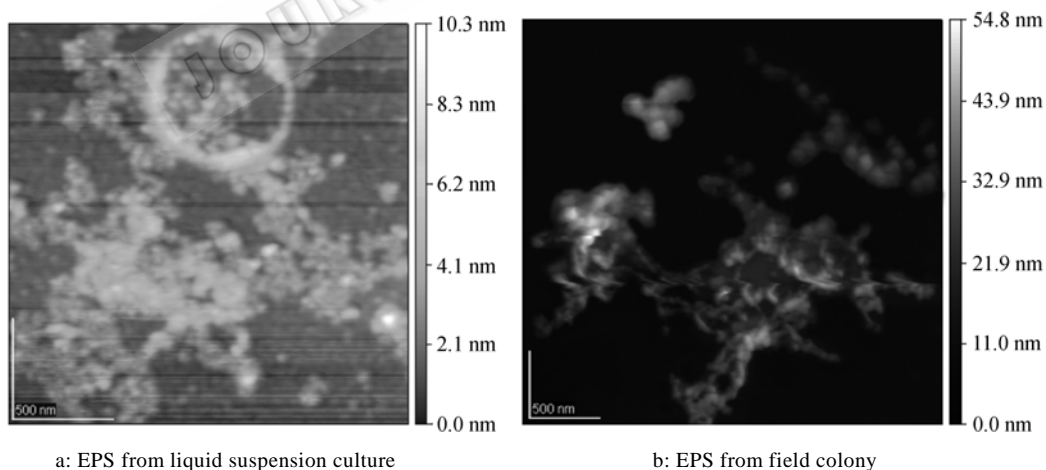


图 7 发状念珠藻多糖的原子力显微镜照片

Fig. 7 AFM photos of polysaccharide from cultured and field colony of *N. flagelliform*

活性多糖的生物活性与其初级结构特别是构象密切相关, 而且还和分子量、溶解度等物理化学性质相关。通过比较液体悬浮培养发状念珠藻胞外多

糖与野生发状念珠藻多糖的理化性质, 所获得的技术参数对于推动发状念珠藻多糖的工业化生产具有一定的实用价值。

## REFERENCES

- [1] De Philippis R, Sili C, Paperi R, Vincenzini M. Exopolysaccharide producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology*, 2001, **13**(4): 293–299.
- [2] Kanekiyo K, Lee JB, Hayashi K, Takenaka H, Hayakawa Y, Endo S, Hayashi T. Isolation of an antiviral polysaccharide nostoflan from a terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Journal of Natural Products*, 2005, **68**(7): 1037–1041.
- [3] Dai ZJ. Review of *Nostoc flagelliforme* research. *J Ningxia Univ (Nat Sci Edi)*, 1992, **13**(1): 71–77.  
戴治稼. 发菜研究的回顾. 宁夏大学学报(自然科学版), 1992, **13**(1): 71–77.
- [4] Lin YX, Yu HF, Xu P, Dong YS, Jia SR. Extraction and physicochemical properties of *Nostoc flagelliforme* polysaccharide. *Modern Food Science & Technology*, 2007 **12**(5): 34–36.  
林永贤, 于海峰, 许鹏, 董永胜, 贾士儒. 发菜多糖的提取及性质研究. 现代食品科技, 2007, **12**(5): 34–36.
- [5] Yu HF. Study on the high cell density culture of *Nostoc flagelliforme* cells. Tianjin University of Science and Technology: Ph. D thesis, 2007.  
于海峰. 发状念珠藻细胞高密度培养的研究. 天津科技大学: 博士论文, 2007.
- [6] Jia SR, Yu HF, Lin YX, Dai YJ. Characterization of extracellular polysaccharides from *Nostoc flagelliforme* cells in liquid suspension culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2007, **12**(3): 271–275.
- [7] Bai XJ, Su JY, Zhao SX, Jia SR. Research on the method of determined nostoc flagelliform polysaccharide. *Science and Technology of Food Industry*, 2004, **25**(11): 146–150.  
白雪娟, 苏建宇, 赵树欣, 贾士儒. 发菜细胞培养液中多糖含量测定方法的比较研究. 食品工业科技, 2004, **25**(11): 146–150.
- [8] Maria Cristina Magheri, Riccardo Materassi, Massimo Vincenzini. Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers. *Applied and Environment Microbiology*, 1998, **64**(3): 1130–1136.
- [9] Chen JR, Hu TJ. Progress on antiviral activities of sulfated polysaccharides. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005, **26**(4): 54–57.  
陈灵然, 胡庭俊. 硫酸多糖抗病毒作用研究进展. 动物医学进展, 2005, **26**(4): 54–57.
- [10] Amit Parkh, Datta Madamwar. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresourse Technology*, 2006, **97**(15): 1822–1827.
- [11] Maria Cristina Magheri, Riccardo Materassi, Massimo Vincenzini. Potential of unicellular *Cyanobacteria* from saline environments as exopolysaccharide producers. *Applied and Environment Microbiology*, 1998, **64**(3): 1130–1132.
- [12] Huang, Z, Liu YD, Paulsen BS, Klaveness D. Studies on polysaccharides from three edible species of *Nostoc (Cyanobacteria)* with different colony morphologies: Comparison of monosaccharide compositions and viscosities of polysaccharides from field colonies and suspension cultures. *J Phycol*, 1998, **34**(6): 962–968.
- [13] Li B. Advance in application of atomic force microscope on polysaccharides researches. *Food Sci*, 2005, **26**(4): 264–270.  
李斌. 原子力显微镜在多糖研究中的应用进展. 食品科学, 2005, **26**(4): 264–270.
- [14] Wang XY, Dong LS. Advances in study on the structure of polysaccharide by atomic force microscopy. *Chinese Polymer Bulletin*, 2004, (1): 50–57.  
王秀艳, 董丽松. 原子力显微镜在多糖结构研究中的进展. 高分子通报, 2004, (1): 50–57.