

雨生红球藻多糖的提取分离及理化性质研究

冯以明^{1,2}, 李广生^{1,2}, 吴建东^{1,2}, 王培培^{1,2}, 赵 峡^{1,2}, 于广利^{1,2}

(1. 海洋药物(中国海洋大学)教育部重点实验室, 山东青岛 266003; 2. 山东省糖科学与糖工程重点实验室, 山东青岛 266003)

摘要: 将雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)经乙醇/乙酸乙酯(1:2, V/V)脱脂, 通过冷水、热水和 5%碳酸钠提取, 得到 3 种粗多糖(HPC、HPH 和 HPA), 通过 Q-Sepharose FF 阴离子交换柱进一步分级, 从 HPC 中得到 HPC1、HPC2 和 HPC3 共 3 种多糖组分。运用高效液相色谱法(HPLC)、红外光谱(IR)等方法对其单糖组成、相对分子质量和基本结构特征进行分析比较。结果表明, 各组分单糖组成复杂, 主要含有半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、阿拉伯糖(Ara)、葡萄糖(Glc)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、木糖(Xyl)、鼠李糖(Rha)、岩藻糖(Fuc)、葡萄糖胺(GlcN)和半乳糖胺(GalN), 其中, Gal 含量最高, 大于 20%。多糖 HPC1、HPC2 和 HPC3 的相对峰位分子质量分别为 502.6, 373.2, 577.5 和 300.5 ku。

关键词: 雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*); 多糖; 理化性质; 单糖组成

中图分类号: Q949.21+2; R282.77

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)01-0017-06

雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)是一种在淡水中生长的单细胞绿藻, 分类学上属于绿藻门、绿藻纲、团藻目、红球藻科、红球藻属。它在弱光和氮磷丰富的环境中以游动的绿色营养细胞存在, 而在不利生存的条件下, 则以厚壁的不动细胞存在, 同时在细胞内积累大量的虾青素而呈红色^[1]。目前, 对该藻成分的研究多集中于虾青素的研究应用, 而对其多糖的相关研究未见报道。

本文以雨生红球藻粉为原料, 将其脱脂后, 采用不同提取方法获得不同种类多糖, 并对其理化性质和单糖组成进行分析, 为其多糖资源的研究利用提供基础。

1 实验材料与方法

1.1 材料与仪器

雨生红球藻藻粉(*Haematococcus pluvialis*), 购于美国 Cyanotech 公司。葡聚糖标准品(11.8、47.3、112、212、788 ku)购于日本 Shodex 公司; 单糖标准品(Glc, Man, Gal, Fuc, Rha, GlcN, GalN, Xyl, Arb, GlcUA, GalUA)、标准牛血清白蛋白、1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP, 99%)购于美国 Sigma 公司; 氯仿, 甲醇等其他试剂均为国产分析纯。

强阴离子交换树脂(Q-Sepharose Fast Flow,

90 μm , 美国 GE Healthcare 公司); 高效凝胶色谱柱(PL aquagel-OH mixed, 30 $\text{cm} \times 7.5 \text{ mm} \times 8 \mu\text{m}$, 美国 Perkin Elmer 公司); Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 $\text{mm} \times 150 \text{ mm}$, 5 μm , 美国 Agilent 公司); 高效液相色谱仪(LC-20AD, 日本岛津公司); 红外光谱仪(Nicolet Nexus 470 型, Thermo Electron 公司); 紫外可见分光光度计(UV-2102 PCS, 尤尼柯(上海)仪器有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖的提取分离^[2]

雨生红球藻藻粉经乙醇/乙酸乙酯(1:2, V/V)脱脂 3 次^[3], 收集残渣并于 40 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用。取脱脂藻粉, 加入 30 倍体积蒸馏水, 室温搅拌提取 3 h 后离心收集上清液。重复提取 2 次合并上清液。将上清液旋转蒸发浓缩后, 加入 4 倍体积 95%乙醇, 离心取沉淀, 经丙酮脱水并 45 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 得冷水提粗多糖 HPC。冷水提取后的藻渣, 加入 30 倍体积蒸馏水, 85 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌提取 3 h 后离心收集上清液。重复提取 2 次。合并上

收稿日期: 2011-01-27; 修回日期: 2011-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070724; 30870506); 国家海洋局公益专项(201005024)项目; 长江学者和创新团队发展计划(IRT0944)项目资助

作者简介: 冯以明(1986-), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋糖药物; 于广利, 通信作者, 教授, 电话: 0532-82031609, E-mail: glyu@ouc.edu.cn

清液并浓缩, 加入 4 倍体积 95%乙醇。离心收集沉淀, 经脱水并干燥, 得热水提多糖 HPH。热水提取后的藻渣, 加入 20 倍体积 5%碳酸钠, 80 ℃ 搅拌提取 1.5 h 后离心收集上清液。重复提取 2 次。合并的上清液用 4 mol/L 盐酸调节 pH 至 7~8。浓缩上清液, 加入 4 倍体积 95%乙醇。离心收集沉淀, 经脱水和干燥, 得碱提多糖 HPA。将 3 种多糖样品用蒸馏水溶解后, 透析(MWCO 7kD)2 d, 至透析外液的电导与蒸馏水

相同。各组分溶液旋转蒸发浓缩, 干燥, 称重。提取流程见图 1。

得到的多糖组分 HPC 经 Q-Sepharose Fast Flow 强阴离子交换色谱柱(XK 3.5/10, V=150 mL)分离纯化^[4]。采用 0、0.2 和 0.4 mol/L NaCl 梯度洗脱 2 个柱体积(流速 3 mL/min, 15mL/管), 硫酸苯酚法^[5]检测, 合并各组分, 经透析脱盐干燥后, 得 HPC1、HPC2 和 HPC3 共 3 种多糖组分。

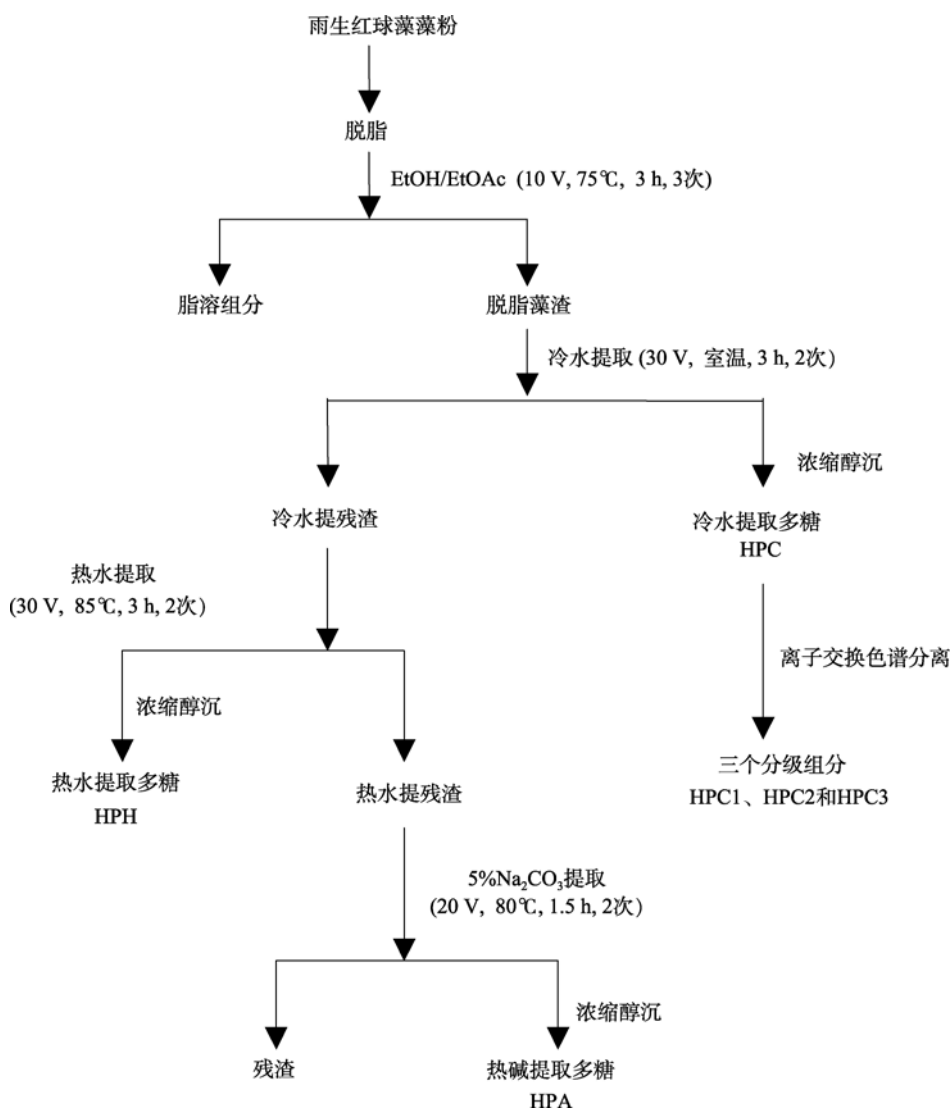


图 1 雨生红球藻多糖的提取分离流程图

Fig. 1 Extraction and separation flow chart of polysaccharides from *Haematococcus pluvialis*

1.2.2 理化性质分析

总糖含量以半乳糖为标准品采用硫酸苯酚法^[5]; 硫酸基含量采用硫酸钡-明胶比浊法^[6]; 粗蛋白含量采用 Folin-酚比色法^[7]; 糖醛酸含量采用改良的唑啉法^[8]。

1.2.3 分子质量测定及纯度测定^[9]

色谱条件: 色谱柱(PL aquagel-OH mixed, 8 μm, 30 cm × 7.5 mm); 流动相为 0.2 mol/L NaNO₃ 溶液(含 10 mol/L NaH₂PO₄, pH 7.0), 流速为 0.5 mL/min, 柱温为 30℃; 进样量 10 μL; 示差检测器。以标准多

糖分子量的对数($\lg M_w$)对保留时间(t_R)作图, 得标准曲线为 $\lg M_w = 30.401 - 3.0775t_R$, $R^2 = 0.996$ 。

1.2.4 单糖组成分析^[2, 10]

采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生高效液相色谱(PMP-HPLC)法测定单糖组成。样品的准备: 取多糖样品各 2 mg 于安瓿瓶, 加入 2 mol/L 三氟乙酸(TFA)1 mL, 封口, 105 °C 水解 6 h。水解液旋转蒸发至干, 得完全酸水解单糖样品。色谱条件: Eclipse XDB-C18 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为含磷酸盐缓冲液和乙腈的混合溶液(83:17, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 柱温 25 °C; 进样量 20 μL; 245 nm 检测。

1.2.5 醋酸纤维薄膜电泳

将醋酸纤维素薄膜放入 50%甲醇溶液浸泡过夜, 电泳前用滤纸吸去其表面的甲醇溶液, 置于电泳缓冲液中浸泡约 20 min。用滤纸吸去薄膜表面的电泳缓冲液, 分别吸取 10 μL 标准品和样品溶液于超级加样器孔中, 用加样器点样(0.5 μL), 将薄膜置于电泳槽中平衡 10 min。采用醋酸钡电泳缓冲液, 在如下条件进行电泳: 0.05 mol/L 醋酸钡(pH 5.0), 电流 7 mA, 电泳时间 45 min 电泳结束后用 0.5%(W/V)阿利新蓝染色约 20 min, 以 2%醋酸溶液脱色。

1.2.6 红外光谱分析

样品用 P₂O₅ 干燥 48 h, 取 1~2 mg 经 KBr 压片, 测定红外光谱, 扫描范围为 400~4000 cm⁻¹。

色粉末, 得率均不高, 分别为 2.74%、1.36%及 1.55%。HPC 的总糖含量最高(69.8%)而蛋白含量最低(10.9%); HPA 的总糖含量最低(33.2%)而蛋白含量最高(23.5%); 3 种粗多糖的硫酸基含量和糖醛酸含量均较低(4%左右), 该特点与海洋藻中多糖不同, 这与其生长环境盐度低有关。

由于 3 种粗多糖的单糖组成结果相近, 无明显区别, 故选取得率较高的粗多糖 HPC 过 QFF 强阴离子交换柱梯度洗脱分离, 见图 2。从图 2 中可知, 样品 HPC 经 0、0.2 和 0.4 mol/L NaCl 梯度洗脱后, 得到 3 个峰(分别命名为 HPC1、HPC2 和 HPC3)。HPC1 为淡黄色粉末, HPC2 和 HPC3 为淡褐色粉末。HPC1 的总糖含量最高(84.2%), HPC3 的糖醛酸含量较高(14.0%)。粗多糖和纯化后多糖的理化性质如表 1。

表 1 雨生红球藻中多糖的基本理化性质比较

Tab. 1 The physicochemical characters comparison of polysaccharides

样品	总糖(%)	粗蛋白(%)	硫酸基(%)	糖醛酸(%)
HPC	69.8	10.9	5.0	4.5
HPH	68.9	11.8	4.6	4.2
HPA	33.2	23.5	3.7	4.7
HPC1	84.2	6.1	1.0	1.7
HPC2	61.6	9.8	2.6	3.9
HPC3	48.1	8.5	4.5	14.0

2 结果与讨论

2.1 理化性质分析

雨生红球藻富含虾青素, 是一种非 V_A 源类胡萝卜素, 具有亲脂性, 易溶于有机溶剂。根据文献[3], 提取溶剂采用乙醇与乙酸乙酯的混合液(1:2, V/V), 该藻含脂类物质 30.7%。3 个粗多糖组分性状均为褐

2.2 单糖组成分析

根据文献[10], PMP 柱前衍生 HPLC 法适合于同时分离中性、酸性和碱性单糖, 该法反应条件温和且不产生立体异构, 各单糖衍生物在 245 nm 处有最大吸收, 故本实验采用 PMP-HPLC 法进行分析。各纯化组分的单糖组成分析谱图见图 3, 单糖摩尔百分比及相对分子质量见表 2。从图表中可以看出, 不同工

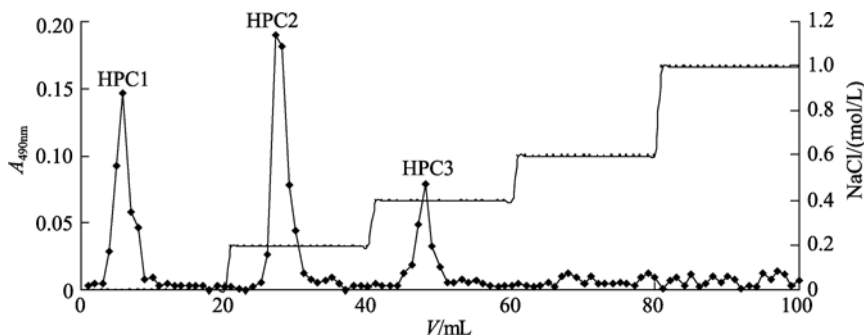


图 2 雨生红球藻多糖 Q-Sepharose FF 色谱分离图

Fig. 2 Segment elution graph of crude polysaccharide by Q-sepharose fast-flow column

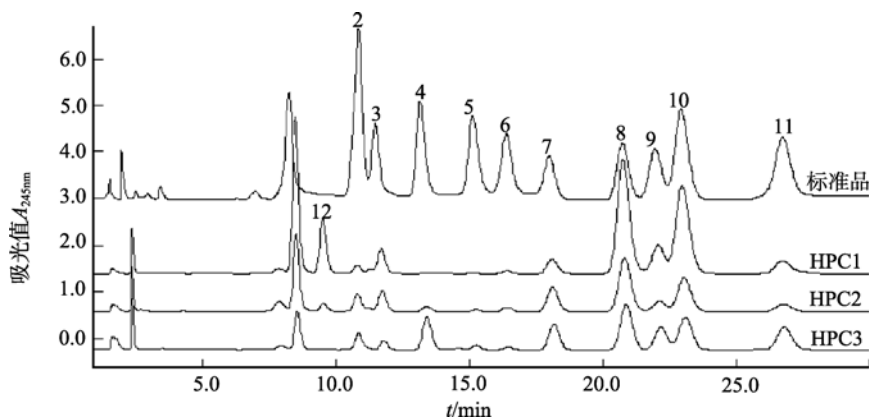


图3 雨生红球藻中3种多糖的单糖分析谱图

Fig. 3 The monosaccharides analysis of three kinds of polysaccharides

1. Man 2. GlcN 3. Rha 4. GlcUA 5. GalUA 6. GalN 7. Glc 8. Gal 9. Xyl 10. Ara 11. Fuc 12. unknown

表2 3种多糖的主要单糖组成及其相对摩尔比

Tab. 2 The monosaccharides composition and relative molar ratio analysis of three polysaccharides

样品	单糖组成及其摩尔比(%)											相对峰位分子质量 (ku)
	Gal	Man	Ara	Glc	GlcUA	GalUA	Xyl	Rha	Fuc	GlcN	GalN	
HPC1	32.6	18.9	19.2	6.8	0.12	0.12	10.5	5.6	4.8	0.5	1.0	502.6, 373.2
HPC2	26.4	16.3	12.7	19.0	1.3	0.6	6.7	8.5	3.8	2.7	2.3	577.5
HPC3	20.3	7.9	11.3	18.1	8.4	1.7	13.5	3.5	11.4	2.3	1.7	300.5

艺提取的多糖的单糖种类多, 不仅有中性糖六碳糖 Gal、Man、Glc 和五碳糖 Ara 和 Xyl, 而且有糖醛酸 GlcUA、GalUA, 及其甲基糖 Rha、Fuc, 还有氨基糖 GlcN 和 GalN。HPC1 的 Man 和 Ara 含量接近 20%, HPC2 和 HPC3 的 Glc 含量为 18% 左右。HPC3 的糖醛酸含量(GlcUA 为 8.4% 和 GalUA 为 1.7%) 和 Fuc 含量(11.4%) 相对较高, 这与其在 QFF 柱的洗脱顺序相符。HPC1 和 HPC2 在 Man 后出现了一个未知峰(峰 12), 此物质有待进一步研究。

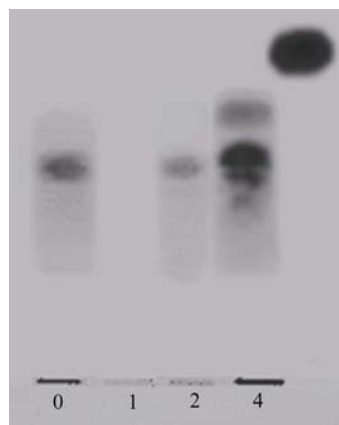
2.3 醋酸纤维素薄膜电泳纯度分析

采用醋酸纤维素薄膜电泳对粗多糖 HPC 以及纯化后多糖 HPC1、HPC2 和 HPC3 进行纯度分析(图 4)。HPC1 为水洗组分, 不被带正电荷的阿利新蓝染色, 表明其属于中性多糖, 该结果与单糖组成分析和 IR 分析一致; HPC2 同粗品 HPC 类似, 有一个主要多糖组分; 而 HPC3 至少有 3 个酸性多糖组分, 表明其分子结构高度不均一性。

2.4 红外光谱分析

从图 5 可以看出, 雨生红球藻多糖 HPC1、HPC2 和 HPC3 红外光谱有相似之处, 如均在 3600~

3200 cm^{-1} 、2925 cm^{-1} 附近处有糖环特征吸收峰; 虽然均在 1640 cm^{-1} 和 1410 cm^{-1} 附近有 C=O 非对称和对称伸缩振动峰, 但其相对强度各不相同, 说明样品存在糖醛酸的含量不同, HPC3 较高; 1240 cm^{-1} 区域的吸收峰表示 S=O 伸缩振动, HPC1 含极少量硫酸基, HPC2、HPC3 含有少量硫酸基, 该结果与表 1 结果相一致。



0. HPC 1. HPC1 2. HPC2 3. HPC3 4. CSA

图4 不同多糖的醋酸纤维素薄膜电泳图

Fig. 4 Cellulose acetate membrane electrophoresis graph of different polysaccharides

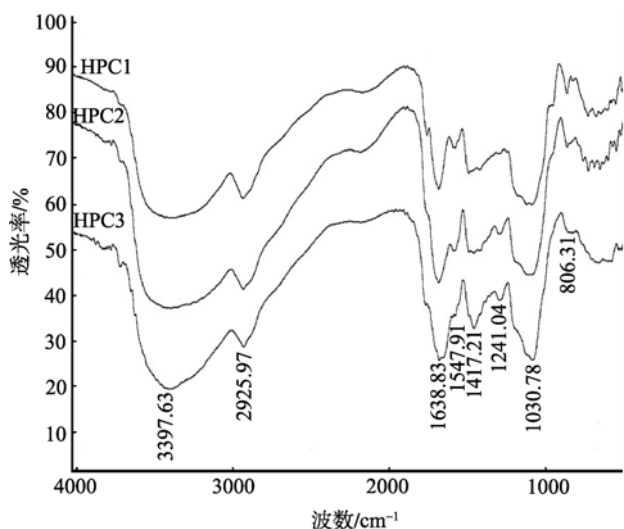


图 5 3 种多糖的红外光谱图比较

Fig. 5 The IR spectrum comparison of three kinds of polysaccharides

3 结论

以雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)为原料,首次通过冷水、热水和热碱提取得到 3 种粗多糖,并从冷水提取多糖 HPC 中进一步分离纯化出 3 个多糖组分。各个组分单糖组成均很复杂,单糖种类多达十余种,该结果和本课题组从另一种单细胞绿藻——盐藻中提取的多糖中单糖组成类似^[10]。雨生红球藻中单糖种类为何如此多样,其结构与活性关系如何等仍需要深入研究,也为该类特殊多糖资源的开发利用提供了有用数据。

参考文献:

[1] Margalith PZ. Production of ketocarotenoids by microalgae [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 1999,

51(4): 431-438.

[2] YU Guangli, YANG Bo, ZHAO Xia, et al. A comparative analysis of four kinds of polysaccharides purified from *Furcellaria lumbricalis* [J]. Journal of Ocean University of China, 2007, 6(1): 16-20.

[3] Yuan J P, Chen F. Chromatographic separation and purification of trans-astaxanthin from the extracts of *Haematococcus pluvialis* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(8): 3371-3375.

[4] 刘荣, 王向荣, 李佳梅, 等. 柳蒿芽多糖的分离纯化及结构初步分析 [J]. 食品科学, 2009. 20(13): 81-83

[5] DuBois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances [J]. Analytical Biochemistry, 1956, 28(3): 350-356.

[6] Therho T T, Hartiala K. Method for determination of the sulfate content of glycosamino glycans [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 41(2): 471-476.

[7] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin Phenol reaction [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.

[8] 纪明侯, 张燕霞. 褐藻酸 9-氮杂茆比色定量方法的研究 [J]. 海洋科学集刊, 1962, 1: 196-205.

[9] 杨海, 赵峡, 于广利, 等. 高效液相色谱法测定注射用灰树花倍他葡聚糖的含量及含量均匀度 [J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 81-83.

[10] 付海宁, 赵峡, 于广利, 等. 岩藻多糖单糖组成分析的四色谱方法比较 [J]. 中国海洋药物杂志, 2008, 27(4): 30-34.

Extraction and isolation of polysaccharides from *Haematococcus pluvialis* and their physicochemical characters study

FENG Yi-ming^{1,2}, LI Guang-sheng^{1,2}, WU Jian-dong^{1,2}, WANG Pei-pei^{1,2}, ZHAO Xia^{1,2}, YU Guang-li^{1,2}

(1. Key Laboratory of Marine Drugs (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China;
2. Shandong Provincial Key Laboratory of Glycoscience and Glycoengineering, Qingdao 266003, China)

Received: Jan., 27, 2011

Key words: *Haematococcus pluvialis*; polysaccharide; Extraction; isolation; monosaccharide composition

Abstract: Three kinds of crude polysaccharides HPC, HPH and HPA were obtained from aqueous extracts of the green alga *Haematococcus pluvialis* with cold water, hot water and 5% Na₂CO₃ water solution. The crude extracts were fractionated by ion-exchange chromatography of Q-Sepharose Fast Flow column. The purified extracts were named HPC1, HPC2 and HPC3. The monosaccharide composition, relative molecular mass (Mw) and structural feature of the polysaccharides were analyzed and compared by high-performance liquid chromatography (HPLC) and Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR), respectively. The results showed that the monosaccharide composition was complicated and the main components included Galactose, Mannose, Arabinose, Glucose, Glucuronic acid, Galacturonic acid, Xylose, Rhamnose, Fucose, Glucosamine and Galactosamine. In particular, the content of Galactose was the highest and it's higher than 20%. The relative molecular masses of polysaccharides HPC1, HPC2 and HPC3 were 502.6, 373.2, 577.5 and 300.5 ku, respectively.

(本文编辑: 康亦兼)

《海洋科学》2012年征订启事

《海洋科学》是由中国科学院海洋研究所主办、科学出版社出版的学术性期刊,是中国自然科学核心期刊、华东地区优秀期刊、山东省优秀期刊。本刊以密切联系生产实际、服务于我国现代化建设为宗旨,及时、快速报道海洋学及其分支学科的新成果、新理论、新观点、新工艺及新进展等,对重大科研和应用性研究成果特别予以优先报道。主要刊载内容有:海洋生物、海洋水产生产、海洋活性物质提取、海洋环境保护、海洋物理、物理海洋、海洋地质、海洋化学、海洋工程、海洋仪器研制等方面的学术论文、研究报告、研究简报、专题综述、学术讨论和争鸣、学术动态以及新产品介绍(有偿刊登)等。

本刊为月刊,每月15日出版,大16开本,96页,每期定价30元,全年定价360元。本刊国内外公开发行(国际刊号:ISSN1000-3096;国内刊号:CN37-1151/P;国内邮发代码:2-655;国外发行代号:M6666)。全国各地邮局均可订阅。欢迎各科研机构、高等院校、生产厂家和从事该领域研究的科技人员踊跃订阅。邮局订阅不便者可直接向本刊编辑部订购。本刊发行量在同类期刊中名列前茅,订户遍及全国20多个省、市、自治区,影响面广,宣传力大,欢迎广大的广告客户在本刊刊登广告,价格优惠。

欢迎订阅《海洋科学》 欢迎广告惠顾

《海洋科学》编辑部地址:山东省青岛市南海路7号,266071

电话及传真:0532-82898755

E-mail: pxzhang@qdio.ac.cn