

螺旋藻多糖和糖蛋白的提纯及其理化特性研究^{*}

胡群宝 郭宝江

(华南师范大学生物技术研究所 广州 510631)

提要 采用改进的方法从螺旋藻中提取多糖和糖蛋白。经恒温加热去蛋白后,用 DEAE-52 柱层析后得到一种多糖和两种糖蛋白,经 Sephadex G100 和凝胶电泳证实所得的多糖和糖蛋白为均一组分。采用凝胶过滤法测定的多糖近似分子量为 19 500。由 SDS-PAGE 测定分子量糖蛋白 GS-1 的分子量为 14 900,GS-2 的分子量为 18 400。红外光谱呈现出典型的多糖吸收峰,含有 α - 型糖苷键。 β - 消去反应初步证明所提取的两种糖蛋白可能是 O- 连接的糖蛋白。

关键词 钝顶螺旋藻,多糖,糖蛋白,提纯,理化特性

 螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 含有丰富的营养和多种维生素、微量元素和活性物质,很多科学家对其进

^{*} 广东省科委课题。

收稿日期:2000-03-07;修回日期:2000-05-30

行了深入研究。有资料表明,螺旋藻中主要生物活性物质之一是水提取物中的多糖成分,具有抗肿瘤等活性。在生物体内,多糖常与蛋白结合,构成糖蛋白。最近的研究认为,糖蛋白也有医疗保健功能。对糖蛋白的提取方法目前报道很少。

多糖的提取方法不同,所提取的种类也有差异。目前所报道的方法大多较为复杂费时,使用的有机溶剂量大,而获得率低,成本高,不利于商品化生产。本文对螺旋藻中多糖和糖蛋白的提取方法进行了改进,以便寻找一种简便易行并且效率高的提取方法。

1 材料和方法

1.1 材料

钝顶螺旋藻来自本所保种。螺旋藻藻粉由本实验自己培养。所用试剂皆为分析纯。DEAE 52、Sephadex G100 均为 Sigma 产品。

1.2 螺旋藻多糖和糖蛋白的提取

参考王辉^[1]、周志刚^[2]、殷钢^[5]和吴洁等^[3]的方法进行:取 100 g 干藻粉,先用 95% 的乙醇脱脂,再加入 1 000 ml 蒸馏水,80 °C 恒温加热 4 h,离心(2 000 r/min, 20 min)收集上清液,沉淀再加水 80 °C 恒温 4 h,抽提两次,合并上清液。上清液浓缩至 200 ml,用 80% 的丙酮脱色,再用 95% 的乙醇沉淀,离心,干燥,合并两次所得干燥沉淀,得褐色胶质状螺旋藻粗多糖提取物。

加热浓缩去蛋白:将螺旋藻粗多糖置于 80 °C 恒温处理,反复除去水溶液表面的薄膜状蛋白类物质,浓缩至 100 ml 后层析分离。

螺旋藻粗多糖的精制:将粗多糖溶于水,制成饱和溶液,在 30 × 3.5 cm 的 DEAE 52 柱上分离纯化,用 0.1 mol/L 和 3.9 mol/L NaCl 进行梯度洗脱,用 0.2% 硫酸蒽酮跟踪检测(测 620 nm 处的 A 值),依洗脱曲线合并洗脱液,收集含糖部分,加入无水乙醇沉淀。再进一步用 Sephadex G100 柱层析(60 × 2.1 cm)纯化,用去离子水洗脱,检测方法同上。收集含糖部分,依洗脱曲线合并洗脱液,加无水乙醇沉淀后得螺旋藻多糖纯品。

1.3 螺旋藻多糖含量的测定

多糖测定参考李建武等^[4]的方法进行。即用硫酸蒽酮与存在于多糖中的己糖、戊醛糖、己糖醛酸反应,生成蓝绿色物质,在 620 nm 处呈现最大光吸收。

1.4 螺旋藻多糖分子量的测定

多糖的近似分子量采用方积年 1984 年报道的凝胶过滤法测定,所用 4 种右旋糖苷(Dextran)标准品分子量分别为 10 000,40 000,70 000,90 000。

1.5 螺旋藻糖蛋白分子量的测定

以 SDS-PAGE 电泳法^[4]进行分子量测定,凝胶浓度为 5%。采用兔磷酸化酶 R(97 400)、兔肌动蛋白(43 000)、碳酸酐酶(31 000)、胰蛋白酶抑制剂(20 100)、鸡蛋清溶菌酶(14 400)原作标准分子量,溴酚蓝为指示剂,以各蛋白迁移率对分子量对数作标准曲线,根据螺旋藻糖蛋白的迁移率从标准曲线上读取分子量值。

1.6 螺旋藻糖蛋白红外光谱测定

取螺旋藻糖蛋白样品用 KBr 压片,在 400 ~ 4 300 cm⁻¹ 区间用红外光谱仪扫描。

1.7 螺旋藻糖蛋白糖苷键鉴定

参考戈苏国等 1983 年的方法,将螺旋藻糖蛋白置于 0.2 mol/L NaOH 水溶液中,于 45 °C 保温 3 h,测定其紫外吸收光谱,同时测定未用碱处理的相同浓度糖蛋白的紫外吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 螺旋藻多糖与糖蛋白的分离

螺旋藻干粉经过水提后,加热浓缩,并脱去大部分蛋白,得到的多糖与糖蛋白混合物,经 DEAE 52 柱(3.5 × 30 cm)离子交换层析,用 0.1 mol/L NaCl 对 3.9 mol/L NaCl 梯度洗脱时,用 0.2% 硫酸蒽酮跟踪检测糖浓度(测 620 nm 处的光吸收值),出现 3 个峰,洗脱曲线如图 1 所示。分别收集得到 3 个组分:PS-1、PS-2 和 PS-3。

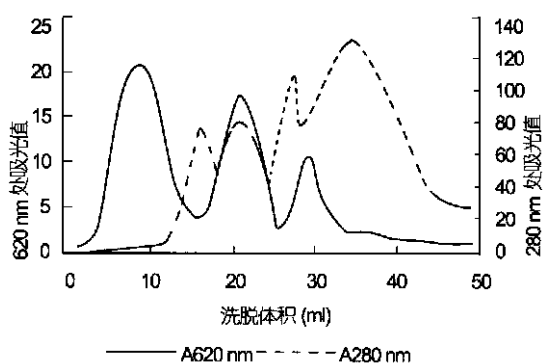


图 1 多糖与糖蛋白经 DEAE52 洗脱曲线

Fig. 1 Chromatography of crude polysaccharide and glycoprotein on DEAE52 column

从图 1 可以看出,第 1 个多糖峰出现时没有同时出现蛋白峰值,即 PS-1 不含蛋白,是天然存在的多糖;第 2 和第 3 个峰出现时蛋白的浓度也很高,PS-2 和 PS-3 含有蛋白,可能是糖蛋白,但还需要进一步鉴定。

2.2 螺旋藻多糖与糖蛋白的纯化

在 DEAE-52 层析柱上分离得到的 3 个组分,经过透析脱盐后,分别经 Sephadex G-100 柱 (2.5×40 cm) 纯化鉴定,用蒸馏水洗脱,得到如图 2~4 所示的洗脱曲线,螺旋藻多糖与糖蛋白为单一峰,且峰型对称。经脱盐、浓缩、干燥后得螺旋藻多糖纯品 PS-1,糖蛋白纯品 PS-2、PS-3。

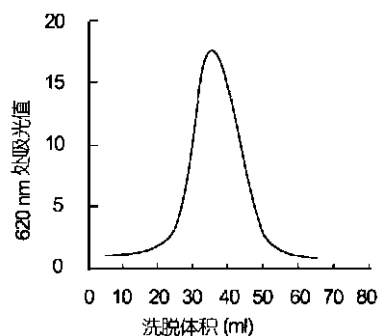


图 2 PS-1 经 Sephadex G-100 的洗脱曲线
Fig. 2 Gel chromatography of PS-1 on Sephadex G-100 column

2.3 螺旋藻多糖的分子量测定

多糖的近似分子量采用凝胶过滤法测定,所用 4 种右旋糖苷 (Dextran) 标准品分子量分别为 10 000, 40 000, 70 000, 90 000。所测得的多糖近似分子量为 19 500。

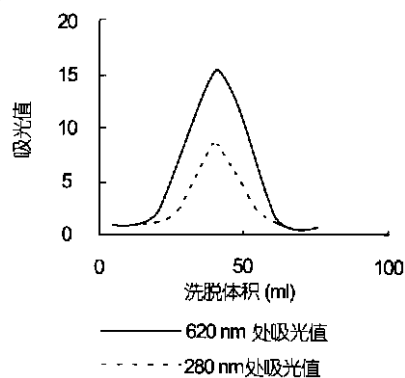


图 3 GS-1 的洗脱曲线
Fig. 3 Chromatography of GS-1 on Sephadex G-100

2.4 螺旋藻糖蛋白的分子量测定

两种螺旋藻糖蛋白经 SDS-PAGE 电泳均为一条带谱 (图略), 根据公式 $\lg M = a - bR_f$ (M 为分子量, R_f 为相对迁移率, $a = 5.265$, $b = 1.614$) 画出的蛋白质分子量的对数值与相对迁移率的标准曲线如图 5 所示,并计算出糖蛋白 GS-1 的分子量为 14 900,

GS-2 的分子量为 18 400。

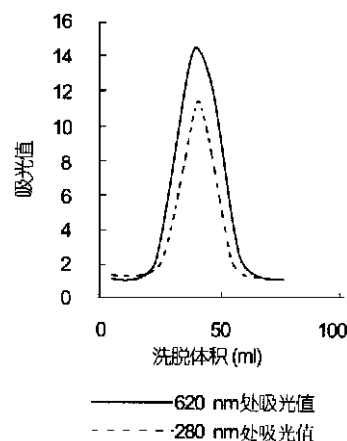


图 4 GS-2 的洗脱曲线
Fig. 4 Chromatography of GS-2 on Sephadex G-100

2.5 螺旋藻多糖与糖蛋白中单糖组成分析

SP-1 经完全水解,薄层层析鉴定含有 D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖和葡萄糖醛酸,其 R_f 值与标准品一致。

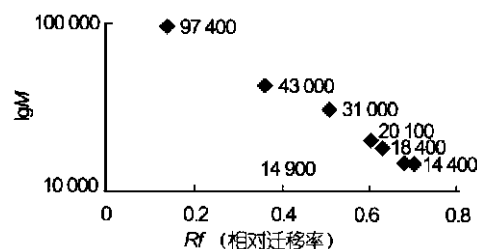


图 5 5 种标准蛋白和待测糖蛋白的标准曲线
Fig. 5 Calibration curve of proteins

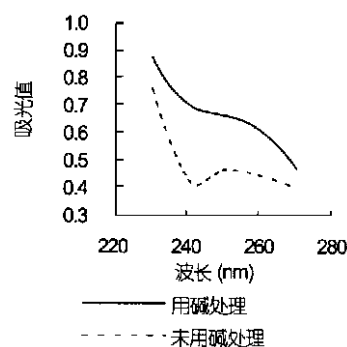


图 6 螺旋藻糖蛋白的紫外吸收光谱
Fig. 6 UV spectra of spirulina glycoprotein after alkali treatment

2.6 红外光谱测定

红外光谱测定结果表明,所提取的一种多糖和两种糖蛋白在 $846 \cdot \text{cm}^{-1}$ 处有特征吸收峰,而在 $890 \cdot \text{cm}^{-1}$ 处附近没有吸收峰,由此推测这些多糖和糖蛋白分子中可能存在 α 糖苷键。

2.7 螺旋藻糖蛋白的糖肽键特性

在螺旋藻糖蛋白在稀碱溶液中, O 型糖肽键可以发生 β 消去反应,与糖链连接的丝氨酸转化成 α -氨基丙烯酸,苏氨酸转化为 α -氨基丁烯酸,形成的不饱和和氨基酸在 240 nm 处有明显的吸收峰。图 6 为糖蛋白用碱处理前后的紫外吸收光谱,用碱处理的糖蛋白在 240 nm 处的紫外吸收比没有处理的大,表明有 β 消去反应,由此可以推测,所提取的两种糖蛋白 GS1 和 GS2 中可能存在 O 型糖肽键。

3 结语

本文所采取的螺旋藻多糖与糖蛋白分离纯化方法与其他文献所报道的不同。过去在提取螺旋藻多糖

时多采用 *Sevage* 法去蛋白,即用氯仿:正丁醇 = 4:1 试剂多次去蛋白,直到其水溶液中检测不到蛋白质为止。而本文采用加热法去除大部分蛋白就层析分离,可以分离出多糖和两种糖蛋白组分。所测得的多糖分子量比过去文献所报道的略大,两种糖蛋白的分子量也比文献所报道的略大^[5]。而红外光谱及糖肽键特征与文献所报道的相同。

参考文献

- 1 王辉,曾和平,杨世柱等.华南师范大学学报(自然科学版),1998,4: 59 ~ 62
- 2 周志刚,李朋富等.海洋与湖沼,1997,28(4): 363 ~ 369
- 3 吴洁,张成武,刘义峰.药物生物技术,1999,6(2): 99 ~ 102
- 4 李建武等.生物化学实验原理和方法.北京:北京大学出版社,1994. 216
- 5 殷钢,刘铮,李琛等.高等学校化学学报,1999,20(4): 565 ~ 568

ISOLATION AND PURIFICATION OF POLYSACCHARIDE AND GLYCOPROTEIN FROM *Spirulina platensis*

HU Qun-bao GUO Bao-jiang

(Biotechnology Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Received: Mar. 7, 2000

Key Words: *Spirulina platensis*, Polysaccharide, Glycoprotein.

Abstract

In this study a rapid extracting strategy is developed, by which one kind of polysaccharide and two kinds of glycoproteins from *Spirulina platensis* are isolated and purified. The molecular weight of polysaccharide and two glycoproteins are 19 500, 14 900 and 18 400, respectively. IR analysis shows the α -glycoside linkage existence in polysaccharide. β -elimination reaction demonstrates that saccharide and protein is linked by O-glycosidic band in these two glycoproteins.

(本文编辑:张培新)