

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)多糖的 分离纯化及其组成研究*

卢佳芳 杨文鸽 颜伟华 周星宇

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

提要 以龙须菜粗多糖为原料,利用离子交换层析分离纯化,紫外光谱、醋酸纤维薄膜电泳和凝胶过滤层析法鉴定多糖的纯度及其分子量,同时进一步采用气相色谱分析龙须菜多糖的单糖组成。结果表明,利用蒸馏水、0.3mol/L NaCl 和 1.2mol/L NaCl 溶液分步洗脱,DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析纯化得到龙须菜多糖的三个组分 G1、G2 和 G3,得率分别为 3.61%、69.26%、18.70%;G1、G2 和 G3 均显示为单一电泳谱带和单一洗脱峰,无蛋白、核酸杂质,分子量依次为 21993、48460、61031U;G2 和 G3 的单糖组成主要为半乳糖、3,6-内醚半乳糖及少量葡萄糖;G2 糖链通过 1→2 键与 1→6 键方式连接,存在非还原末端基及连三羟基,G3 糖链则通过 1→3 键与 1→2 键方式连接。

关键词 龙须菜多糖,纯化,气相色谱,单糖组成

中图分类号 S985.4

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)属于红藻门、江蓠科,具有软坚化痰、清热利水的功效。研究表明,龙须菜对无机氮和无机磷吸收效果明显,能大量吸收海水中的氮、磷和二氧化碳(彭长连等, 2007; Yu *et al.*, 2008),释放氧气,净化海区环境,减缓赤潮发生,加上龙须菜具有藻体大、适应性强、生长快等特点,是我国继海带、紫菜和裙带菜之后的第四种人工栽培海藻。近年来有关海藻及海藻多糖的研究很多,从海藻中提取的多糖具有多种生物学功能,龙须菜富含多糖,含量可达藻体干重的 30%左右,已有研究报道龙须菜多糖具有抗突变、抗肿瘤、抗氧化等生理活性(王璐等, 2001; 陈美珍等, 2005)。目前龙须菜的研究报道多限于形态学(李文红等, 2005; Ye *et al.*, 2006)、生物修复作用(汤坤贤等, 2005)、琼胶化学(赵谋明等, 1996; Marinho-Soriano, 2001; Li *et al.*, 2008)、光谱特性(Sui *et al.*, 2002)及藻胆蛋白的基因表达(隋正红等, 2001)等方面,对龙须菜多糖的分离纯化和组成的研究报道较少。

本文作者利用 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱分离纯化龙须菜多糖组分,紫外光谱、醋酸纤维薄膜电泳、凝胶过滤色谱等进行纯度鉴定和分子量测定,气相色谱分析龙须菜多糖的单糖组成,同时采用高碘酸氧化及 Smith 降解对龙须菜多糖的一级结构特征进行初步判断,以期分离纯化龙须菜多糖、研究龙须菜多糖的构效关系提供理论依据。

1 材料与仪器

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)于 2007 年 7 月采自浙江象山港某网箱养殖基地,清洗、去除泥沙等杂物,干燥粉碎,经热水浸提,上清液浓缩后加乙醇沉淀,干燥得到龙须菜粗多糖。利用间苯二酚比色法(张惟杰, 2003)测得龙须菜粗多糖的 3,6-内醚半乳糖含量为 37.98%。

DEAE-Sephadex A-25、Sephacryl S-300 High Resolution 和 Sephadex G-200 凝胶购于 Amersham Pharmacia biotech AB 公司,蓝色葡聚糖、葡聚糖

* 国家 863 计划项目, 2003AA625030 号;宁波市科技局科研攻关项目, 2004C100034 号。卢佳芳, 硕士, E-mail: lujiafang1985@163.com

通讯作者: 杨文鸽, 教授, E-mail: yangwenge@nbu.edu.cn

收稿日期: 2008-02-17, 收修改稿日期: 2008-04-29

T-10、T-40、T-70 及 T-500 购于 Pharmacia 公司, 其余试剂均为分析纯。

Suprafuge-22 型冷冻离心机, 德国 Heraeus 公司; TH-500A 梯度混合器, 上海沪西分析仪器厂; BSZ-100 自动部分收集器, 上海沪西分析仪器厂; T6-新锐可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Cary100 紫外分光光度计, 美国 Varian 公司; 2010 型气相色谱仪, 日本岛津公司。

2 实验方法

2.1 DEAE-Sephadex A-25 柱层析分离龙须菜粗多糖

龙须菜粗多糖复溶于水, 取 3ml 样品过离子交换柱(DEAE-Sephadex A-25), 用蒸馏水和 3mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱, 流速 0.5ml/min, 每管 5ml 收集, 蒽酮-硫酸法检测多糖浓度(张惟杰, 2003), 画出洗脱曲线。在此基础上, 改用蒸馏水、0.3mol/L NaCl 和 1.2mol/L NaCl 溶液分步洗脱, 流速 0.5ml/min, 每管 5ml 收集, 将含糖量较高的洗脱液减压浓缩, 透析(截留分子量为 3000U)去盐, 真空干燥得到各多糖组分。

2.2 龙须菜多糖组分的纯度鉴定

2.2.1 紫外光谱法 将上述纯化后得到的各多糖组分溶解于水中, 利用紫外分光光度计 190—440nm 波长扫描。

2.2.2 醋酸纤维薄膜电泳 取醋酸纤维薄膜(20mm×80mm), 放入 pH 10.0 的硼砂缓冲溶液中浸泡后取出。在离膜条一端 2cm 处点上各多糖样品溶液, 电泳, 甲苯胺蓝溶液染色, 90%乙醇漂洗至无糖区底色脱净为止(张惟杰, 2003)。

2.2.3 Sephacryl S-300 High Resolution 凝胶过滤层析 用 Sephacryl S-300 High Resolution 凝胶, 柱型为 16mm×600mm, 各多糖组分的上样量控制在 5ml 左右, 生理盐水洗脱, 流速 0.5ml/min, 每 8min 收集一管, 蒽酮-硫酸法测多糖含量, 绘制洗脱曲线。

2.3 龙须菜多糖分子量的测定

采用凝胶过滤层析法测定分子量(Andrews, 1965; Wei *et al.*, 2007)。Sephadex G-200 层析柱(16mm×400mm), 生理盐水洗脱, 流速 10ml/h, 每管 2ml, 用蓝色葡聚糖测得外水体积 V_0 。相同条件下测定已知分子量的标准葡聚糖 T-500、T-70、T-40、T-10 的洗脱体积 V_e 。根据 V_e/V_0 与分子量的对数值制作标准曲线。

取各多糖样品 10mg 配成溶液, 按上述洗脱条件进行分离, 测定洗脱体积 V_e , 根据标准曲线求出各多糖组分的分子量。

2.4 龙须菜多糖的单糖组成分析

龙须菜多糖样品经硫酸水解为单糖, 各种单糖与硼氢化钠反应, 生成相应的糖醇。糖醇在吡啶中与醋酸酐加热反应, 生成糖醇乙酸酯衍生物, 进行气相色谱分析(张惟杰, 2003)。

气相色谱条件: 进样口温度 280 , 进样量 1 μ l, 载气为高纯 He, 流速 1ml/min, 初柱温度 100 , 毛细管柱 SPB(30m×0.25mm×0.25 μ m), 气化室温度由 210 先以 5 /min 程序升温保持 20min, 后由 250 以 10 /min 升温到 280 , 检测器温度 290 。以半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、岩藻糖为标准单糖, 同样处理后生成相应的糖醇乙酸酯衍生物, 分析得到标准单糖的气相色谱图。

2.5 龙须菜多糖相邻单糖连接方式的分析

2.5.1 高碘酸氧化 取样品溶于 50ml 的 0.015mol/L 高碘酸钠中, 4 下间或振摇, 间隔 2h 取样, 每次 0.1ml, 用水定容于 25ml 容量瓶, 测定吸光值 A_{223nm} , 直至吸光度稳定。比较样品溶液与原高碘酸钠溶液的吸光值, 推算出平均每个糖基消耗的高碘酸钠。同时取样 4ml, 加 2 滴乙二醇, 放置 20min, 以酚酞为指示剂, 用 0.01mol/L 的 NaOH 溶液滴定甲酸生成量(张惟杰, 2003; Aspinall *et al.*, 1957)。

2.5.2 Smith 降解 上述经高碘酸钠氧化的剩余样品溶液, 加 2ml 乙二醇, 搅拌 30min, 透析, 浓缩, 加入 40mg 的 KBH₄, 室温暗处搅拌还原 24h, 用 0.1mol/L 的醋酸调 pH 至 5.5, 透析, 减压蒸干得多糖醇。加入 2mol/L 三氟乙酸 3ml, 封管 100 水解 8h, 减压蒸干, 加入 3ml 甲醇, 减压蒸干以除尽三氟乙酸。分别加入 1ml 吡啶, 1ml 醋酸酐, 100 反应 1h, 气相色谱分析反应产物。同时取各种标准单糖、赤糖醇、丙三醇各 3mg 作为标准品, 同样处理后进行气相色谱分析。色谱条件同 2.4(张惟杰, 2003; Aspinall *et al.*, 1957)。

3 结果与讨论

3.1 龙须菜粗多糖的分离纯化

3.1.1 龙须菜粗多糖的梯度洗脱曲线 用蒸馏水和 3mol/L NaCl 溶液进行梯度洗脱, 蒽酮-硫酸法测定洗脱液的多糖浓度, 洗脱曲线见图 1。

由图 1 可见, 用水洗脱时出现一个洗脱峰; 用 NaCl 溶液洗脱时出现两个明显的洗脱峰, 确定两个组分可分别用 0.3mol/L 和 1.2mol/L 的 NaCl 溶液洗脱得到, 其中 0.3mol/L NaCl 溶液洗脱峰多糖含量较高。

3.1.2 龙须菜粗多糖的分步洗脱曲线 在上述梯

度洗脱实验的基础上,用蒸馏水、0.3 和 1.2mol/L 的 NaCl 溶液分步洗脱,结果如图 2。

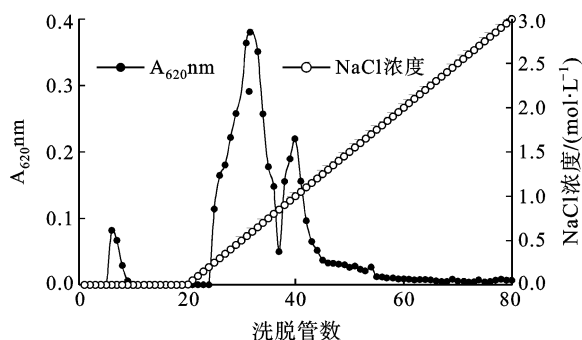


图 1 龙须菜粗多糖的 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析梯度洗脱曲线

Fig.1 Gradient elution profile of crude polysaccharides from *G. lemaneiformis* after DEAE-Sephadex A-25 anion exchange chromatograph

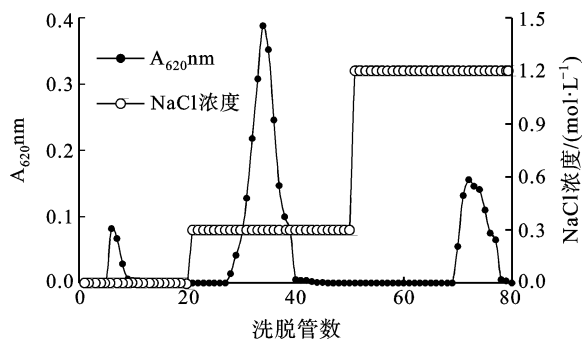


图 2 龙须菜粗多糖的 DEAE-Sephadex A-25 离子交换层析分步洗脱曲线

Fig.2 Stepwise elution profile of crude polysaccharides from *G. lemaneiformis* after DEAE-Sephadex A-25 anion exchange chromatograph

由图 2 可见, DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱分步洗脱层析能较好的分离龙须菜多糖, 得到 3 个明显的吸收峰, 表明龙须菜多糖至少含有 3 种级分。收集 3 种级分, 依次命名为 G1、G2、G3, 其中水洗脱级分 G1 占上样量的比例最少, 只有 3.61%; 0.3mol/L NaCl 洗脱级分 G2 得率最高, 达到 69.26%; 而 1.2mol/L NaCl 洗脱级分 G3 得率为 18.70%, 三个多糖组分的总级分得率为 91.57%。邓志峰等(1995)曾利用 DEAE-Sephadex A-50 对龙须菜粗多糖进行分离, 总级分得率为 76%。本实验利用 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱对龙须菜粗多糖进行分离, 蒸馏水、0.3mol/L NaCl 和 1.2mol/L NaCl 溶液分步洗脱, 总级分得率为 91.57%, 分离效果理想。

3.2 龙须菜多糖组分的纯度鉴定

利用紫外分光光度计对 G1、G2、G3 组分在 190—440nm 波长间扫描, 三组分显示相同的扫描结果, 如图 3 所示。从图 3 中可以看出, G1、G2、G3 组分在 260nm 和 280nm 未见有核酸和蛋白质的特征吸收峰。

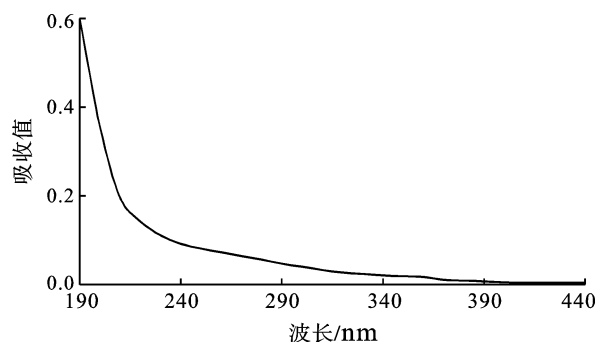


图 3 龙须菜多糖组分的紫外吸收光谱

Fig.3 UV spectra of polysaccharide from *G. lemaneiformis*

G1、G2、G3 分别采用醋酸纤维薄膜电泳和 Sephacryl S-300 High Resolution 凝胶层析, 结果均显示单一电泳谱带和单一狭窄的洗脱峰。可见, 利用离子交换层析分离到的三种龙须菜多糖样品均由单一多糖组成, 无蛋白、核酸杂质。

3.3 龙须菜多糖的分子量和组成、结构分析

3.3.1 龙须菜多糖的分子量测定和单糖组成分析

采用 Sephadex G-200 凝胶过滤法测定已知分子质量的标准葡聚糖 T-500、T-70、T-40、T-10 的洗脱体积 V_e , 得到方程 $\lg M = -0.7513V_e/V_0 + 5.7372$ ($R^2 = 0.995$) (M 代表分子量)。在同样条件下利用凝胶过滤法得到 G1、G2、G3 的洗脱体积, 计算得到 G1、G2、G3 的分子量依次为 21993U、48460U、61031U。

以半乳糖、葡萄糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、岩藻糖为标准单糖, 龙须菜多糖 G2、G3 样品经硫酸水解为单糖, 糖醇乙酸酯衍生物进行气相色谱分析, 得到各种标准单糖和 G2、G3 水解液各单糖组分的保留时间, 结果如表 1 所示。比较标准单糖和样品水解液单糖组分的保留时间, 得出龙须菜多糖样品单糖组成, 再根据峰面积计算出样品中单糖的摩尔比。G2 的单糖组成为半乳糖、葡萄糖与一种未知单糖, 摩尔比为 21.25 : 1 : 1; G3 单糖包括半乳糖和葡萄糖, 摩尔比为 32.78 : 1。

考虑到纯化前的龙须菜粗多糖含 37.98% 的 3,6-内醚半乳糖, 而在酸性条件下, 3,6-内醚半乳糖水解为半乳糖, 因此气相色谱分析时只能检测到半乳糖

的峰, 认为龙须菜多糖的主要单糖成分为半乳糖和 3,6-内醚半乳糖。余杰等(2006)采用纸层析结合化学分析研究龙须菜多糖的单糖组成, 表明主要由半乳糖与 3,6-内醚半乳糖组成, 这与本文得到的结果基本一致。

表 1 标准单糖及龙须菜多糖单糖组分的气相色谱数据
Tab.1 Gas chromatography data of the standard monosaccharides and monosaccharide compositions of polysaccharide from *G. lemaneiformis*

样品	保留时间(min)		
	标准单糖	G2 水解液 单糖组分	G3 水解液 单糖组分
鼠李糖	2.51		
岩藻糖	9.70		
阿拉伯糖	10.12		
木糖	10.50		
甘露糖	14.92		
葡萄糖	15.16	15.06	15.06
半乳糖	15.44	15.40	15.40
未知单糖		12.86	

3.3.2 龙须菜多糖相邻单糖连接方式的分析 在多糖中, 以 1→2, 1→4 位置键结合的糖基经高碘酸氧化, 平均每个糖基消耗一分子高碘酸, 无甲酸释放; 以 1→3 位置键结合不被高碘酸氧化; 以 1→6 位结合, 平均每个糖基消耗二分子高碘酸, 释放一分子甲酸。

龙须菜多糖组分 G2 消耗 0.75mmol 高碘酸, 有甲酸释放。高碘酸与甲酸的摩尔比例为 169:1, 说明 G2 糖基存在 1→2、1→4、1→6 位键、非还原末端基。多糖组分 G3 消耗 0.75mmol 高碘酸, 并且无甲酸释放, G3 中由 1→2、1→4 或者 1→3 位键组成。

G2 高碘酸氧化产物经 Smith 降解, 产物水解衍生, 经 GC 分析发现存在甘油、葡萄糖、半乳糖及未知糖组成, 说明 G2 存在 1→2 键、1→6 键、非还原末端基与连三羟基。G3 高碘酸氧化产物经 Smith 降解, 经 GC 分析发现存在甘油、葡萄糖与半乳糖。由此可知, G3 由 1→3 与 1→2 位键组成。

4 小结

利用 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱分离纯化龙须菜多糖, 在梯度洗脱的基础上确定多糖组分的洗脱液分别为: 蒸馏水、0.3mol/L NaCl 和 1.2mol/L NaCl 溶液。通过上述 3 种溶液的分步洗脱得到龙须菜多糖的 G1、G2 和 G3 三个组分, 得率分别为 3.61%、

69.26%、18.70%, 3 个组分的总级分得率为 91.57%。

采用紫外光谱、电泳和凝胶色谱法对 G1、G2 和 G3 进行分析, 结果显示它们均由一种多糖组成, 分子量依次为 21993、48460、61031U; G2 和 G3 的单糖组成主要包括半乳糖与 3,6-内醚半乳糖; G2 糖基通过 1→2 与 1→6 键、非还原末端基与连三羟基连接方式, G3 则通过 1→3 与 1→2 位键方式连接。

参 考 文 献

- 王 璐, 刘 力, 王艳梅等, 2001. 几种红藻琼脂的组分结构及理化性质的比较. 海洋与湖沼, 32(6): 654—664
- 邓志峰, 纪明侯, 1995. 龙须菜和扁江蓼多糖的组成及其抗肿瘤效果. 海洋与湖沼, 26(6): 575—580
- 汤坤贤, 游秀萍, 林亚森等, 2005. 龙须菜对富营养化海水的生物修复. 生态学报, 25(11): 3044—3051
- 李文红, 姚建亭, 王继成等, 2005. 龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 选育品系及其野生型的 ISSR 指纹分析. 海洋与湖沼, 36(3): 241—247
- 余 杰, 王 欣, 陈美珍等, 2006. 潮汕沿海龙须菜的营养成分和多糖组成分析. 食品科学, 27(1): 93—97
- 张惟杰, 2003. 糖复合物生化研究技术(第二版). 杭州: 浙江大学出版社, 12—141
- 陈美珍, 余 杰, 龙梓洁等, 2005. 龙须菜多糖抗突变和清除自由基作用的研究. 食品科学, 26(7): 219—222
- 赵谋明, 吴 晖, 刘通讯等, 1996. 江蓼琼胶加工过程中碱处理及最佳工艺条件的研究. 食品与发酵工业, 22(4): 33—37
- 隋正红, 张学成, 2001. 龙须菜藻胆蛋白亚基基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 高技术通讯, (7): 14—19
- 彭长连, 温 学, 林植芳等, 2007. 龙须菜对海水氮磷富营养化的响应. 植物生态学报, 31(3): 505—512
- Andrews P, 1965. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem J, 96: 595
- Aspinall G O, Ferrier R J, 1957. A spectrophotometric method for the determination of periodate consumed during the oxidation of carbohydrate. Chem Ind (London), 7: 1216—1221
- Li H Y, Yu X J, Jin Y *et al*, 2008. Development of an eco-friendly agar extraction technique from the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis*. Bioresource Technology, 99(8): 3301—3305
- Marinho-Soriano E, 2001. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). Journal of Biotechnology, 89: 81—84
- Sui Z H, Xue C, Cheng X J, 2002. Comparison of phycobiliproteins from *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyceae) and its pigment mutants in spectral and molecular respects. Acta Botanica Sinica, 44(5): 557—561
- Wei W X, Zhou W, Zang N *et al*, 2007. Structural analysis of a polysaccharide from *Fructus mori albae*. Carbohydrate Polymers, 70(3): 341—344

Ye N H, Wang H X, Wang G C, 2006. Formation and early development of tetraspores of *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilaria, Gracilariaceae) under laboratory conditions. *Aquaculture*, 254: 219—226

Yu J, Yang Y F, 2008. Physiological and biochemical response of seaweed *Gracilaria lemaneiformis* to concentration changes of N and P. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367: 142—148

PURIFICATION AND COMPOSITION OF POLYSACCHARIDE FROM *GRACILARIA LEMANEIFORMIS*

LU Jia-Fang, YANG Wen-Ge, YAN Wei-Hua, ZHOU Xing-Yu

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract The polysaccharides from marine algae *Gracilaria lemaneiformis* were purified, and the containing monosaccharide composition was studied. The crude polysaccharide was loaded on a DEAE-Sephadex A-25 column and eluted with H₂O, 0.3mol/L NaCl and 1.2mol/L NaCl in turn. Three polysaccharides marked G1, G2 and G3 were separated with the yield of 3.61%, 69.26% and 18.70%, respectively. G1, G2, and G3 components showed single polysaccharide component on ultraviolet (UV) spectrum, cellulose acetate membrane electrophoresis, and gel filtration chromatography. UV spectra measurements confirmed that the three polysaccharide components have no protein and nucleic acid. Their purity was up to be single electrophoresis band and single elution peak. The average molecular weight of G1, G2, and G3 were 21993, 48460, and 61031 U, respectively. The monosaccharide component in G2 and G3 were identified as mainly galactose and 3,6-anhydrogalactose. The sugar-chain of G2 is composed of 1→2 bond, 1→6 bond and includes non-reducing end group and three hydroxies, while G3 is composed of 1→3 bond and 1→2 bond.

Key words *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharides, Purification, Gas chromatography, Monosaccharide composition