

doi: 10.7541/2016.79

爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物提取方法及其化学组成研究

黄世玉

(集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 集美 361021)

摘要: 优化了爪哇曲壳藻亚缢变种(*Achnanthes javanica* var. *subconstricta*)胞外多聚物提取方法并分析了其化学组成。结果表明, 使用0.3 mol/L的碳酸氢钠提取时间为2.5—3h可充分提取非水溶性胞外多聚物而不会破碎细胞, 是最优的提取方法。爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物多糖占80%以上, 蛋白质占16%—19%, 不含脂类。水溶性多糖的单糖组分摩尔比为: 岩藻糖: 半乳糖: 葡萄糖: 甘露糖: 木糖: 鼠李糖=2.47: 2.13: 1: 0.69: 0.57: 0.46, 而非水溶性多糖的单糖组分摩尔比为: 半乳糖: 岩藻糖: 木糖: 葡萄糖: 甘露糖: 鼠李糖=3.56: 2.73: 1.30: 1: 0.67: 0.57。

关键词: 爪哇曲壳藻亚缢变种; 胞外多聚物; 提取方法; 化学组成

中图分类号: Q942

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2016)03-0589-05

硅藻胞外多聚物(Extracellular Polymeric Substances, EPSs)是硅藻细胞分泌到胞外的一类黏性物质。这些胞外多聚物在硅藻运动、附着、栖息地的稳定、集群和抗干燥等方面都起着非常重要的作用, 是硅藻生命活动过程中不可或缺的一部分^[1]。此外, 硅藻胞外多聚物在海洋生态系统的物质循环和能量传递中也起着极其重要的作用^[2]。目前, 在胞外多聚物的形态及细微结构、合成分泌机制、功能及生态作用等方面都取得了丰硕的成果^[1, 3]。

胞外多聚物的有效提取方法和化学成分分析是理解其生态作用的基础^[4]。但附着硅藻胞外多聚物提取方法及其化学组成方面的报道较少, 迄今尚未发现提取胞外多聚物通用的提取方法^[5]。目前文献报道的提取方法可以分为化学方法和物理方法两类。有些报道将两者结合起来, 使用戊二醛或甲醛作为固定剂来保护细胞, 防止提取过程对细胞的损伤^[6—8]。但是固定剂影响EPSs的测定, 并且会与EPSs发生反应改变其理化性质^[9]。

爪哇曲壳藻亚缢变种(*A. javanica* var. *subconstricta*)是我国海域常见的一种底栖硅藻^[9]。本文建立了爪哇曲壳藻亚缢变种(*A. javanica* var. *subconstricta*)胞外多聚物的提取方法, 研究了其胞外多聚

物的化学组成, 以期对硅藻胞外多聚物的提取和化学组成研究提供借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 藻种及培养条件

实验用藻种爪哇曲壳藻亚缢变种筛选自厦门附近海域的大型海藻上。经3—5次纯化后, 并经抗生素处理, 得到无菌纯藻种用于实验。爪哇曲壳藻亚缢变种的大量培养采用20 L的方形玻璃缸, 所用培养基为f/2培养基。培养体积5 L, 温度23℃, 光照强度为5000 lx。

1.2 提取时间对非水溶性胞外多聚物提取的影响

爪哇曲壳藻亚缢变种培养5d后, 倒去上层培养液, 附着藻细胞用消毒海水清洗2—3次, 用毛笔轻轻将藻类刮下并用离心的方法收集藻细胞(转速, 8000 r/m, 5min, 下同), 将藻细胞用蒸馏水清洗, 离心收集沉淀物(重复3次)。在沉淀物中加入90%的乙醇抽提10min, 离心收集沉淀物(反复5次), 将所得沉淀物用蒸馏水再冲洗, 离心后收集沉淀物(反复3次)。在所得沉淀物中加入40 mL蒸馏水在90℃下水浴1h, 离心, 所得上清液即为WS (水溶性胞外多聚物)。

离心后的沉淀物中加入0.3 mol/L碳酸氢钠溶

收稿日期: 2015-10-19; 修订日期: 2016-02-17

基金项目: 国家自然科学基金(39900020)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (39900020)]

通信作者: 黄世玉(1964—), 男, 福建南平人; 副教授, 学士; 主要从事水产养殖与微藻生理生态研究。E-mail: hsy@jmu.edu.cn

液40 mL置于95°C水浴提取非水溶性胞外多聚物(WI)。在水浴0.5h、1.0h、1.5h、2.0h、2.5h、3.0h、3.5h、4.0h和4.5h时分别从提取液中吸出1 mL均匀混合液,离心所得上清液即为WI用于DNA、总碳水化合物以及蛋白质含量的测定。同时另取0.1 mL在ZEISS Axioskop型表面荧光显微镜下观察提取过程中细胞及胞外多聚物形态的变化。

1.3 碳酸氢钠浓度对WI提取的影响

用0.1、0.3、0.5、0.8、1、1.2 mol/L浓度的碳酸氢钠溶液提取WI,提取时间2.5h,测定各浓度组的DNA、总碳水化合物和蛋白质含量。

1.4 参数的测定:

DNA的测定:将待测物在分光光度计下测量其在260和280nm下的光密度值,采用下列公式计算DNA的浓度:

$$\text{DNA浓度} = A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50 (\mu\text{g/mL})$$

A_{260} 相当于50 $\mu\text{g/mL}$ DNA或40 $\mu\text{g/mL}$ RNA

糖类测定采用硫酸-苯酚法^[10],蛋白质的测定采用Lowry等^[11]的方法。

1.5 胞外多聚物组分的测定

胞外多聚物组分的测定采用高效液相色谱法,用蒸发光散射检测器检测。具体方法如下:将两种组分(WS、WI)用旋转蒸发器浓缩至4 mL左右后放入蒸馏水中透析。透析时将样品装入透析袋,将两端扎紧密封,吊置于装有蒸馏水的大烧杯中(蒸馏水淹没透析袋),置于4°C冰箱透析24h,期间换水一次。透析完毕后继续浓缩至近干。将浓缩后的WS与WI消化,用氮气吹干后加入1 mL三氟乙酸(4 mol/L),充氮气加盖密封,100°C分解5h,用氮气吹干后加蒸馏水1 mL,最后用高效液相色谱仪测定WS与WI的糖类组分。

2 结果

2.1 提取时间对胞外多聚物的影响

图1为提取时间对胞外多聚物提取的影响。结果表明,在0—2.5h提取时间内,糖类和蛋白质的含量逐渐增加,而DNA含量比较稳定。当提取时间为2.5—3h时,提取液中糖类和蛋白质含量增加的趋势已不明显,但当提取时间超过3h时,蛋白质含量明显增加,DNA含量也有较大增加,但多糖含量则几乎没有变化。光镜下观察结果也表明(图2),随着提取时间的推移,胞外多聚物的形状逐渐变得模糊,轮廓也逐渐消失,当达到3h时,胞外多聚物基本观察不到,随著提取时间的进一步增加,部分藻细胞破碎。因而为了尽可能减少藻细胞的破碎程度,选

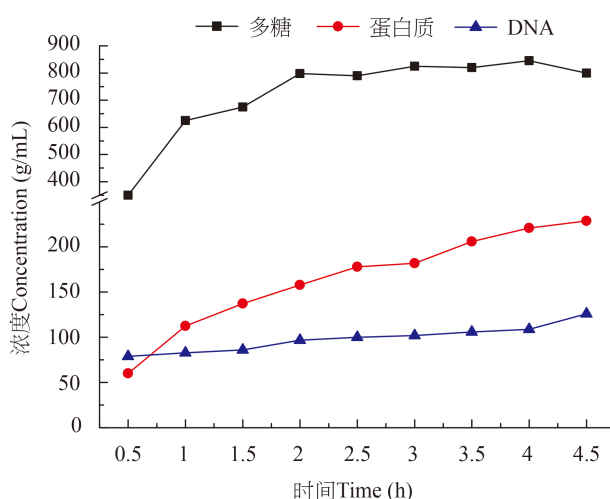


图1 不同提取时间提取液中DNA、蛋白质和多糖的变化

Fig. 1 Variation of DNA, protein and polysaccharides in EPSs extraction with time course

择碳酸氢钠提取时间为2.5—3h。

2.2 碳酸氢钠浓度对胞外多聚物提取的影响

图3为碳酸氢钠浓度对硅藻胞外多聚物提取的影响。结果表明,在0.1—0.3 mol/L浓度范围内,糖类和蛋白质含量都有显著增加,但DNA的含量则变化不大。随着碳酸氢钠浓度的进一步增加,达0.5—0.8 mol/L时,提取液中糖类和蛋白质含量增加的趋势已不明显,而DNA含量则有明显增加,表明细胞发生了破碎。因而为了尽可能减少细胞破碎,选择碳酸氢钠提取浓度为0.3 mol/L。

2.3 胞外多聚物的化学组成

爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物水溶性和水不溶性组分的主要成分为多糖类,达总量的80%以上,此外还含有一定量的蛋白质(16%—19%左右),但不含脂类。图4为爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物水溶性(A)和非水溶性(B)组分的高效液相色谱图。对照单糖标准品色谱图可知,爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物的单糖组分主要为岩藻糖、半乳糖,此外还含有少量的木糖、葡萄糖、甘露糖和鼠李糖等。经引入相对校正因子并采用面积归一法计算其摩尔比表明,水溶性(WS)组分中岩藻糖的含量最高,单糖的摩尔比为:岩藻糖:半乳糖:葡萄糖:甘露糖:木糖:鼠李糖=2.47:2.13:1:0.69:0.57:0.46;而非水溶性(WI)组分中半乳糖的含量最高,单糖的摩尔比为:半乳糖:岩藻糖:木糖:葡萄糖:甘露糖:鼠李糖=3.56:2.73:1.30:1:0.67:0.57。

3 讨论

EPSs在底栖硅藻和细菌的相互作用中具有重

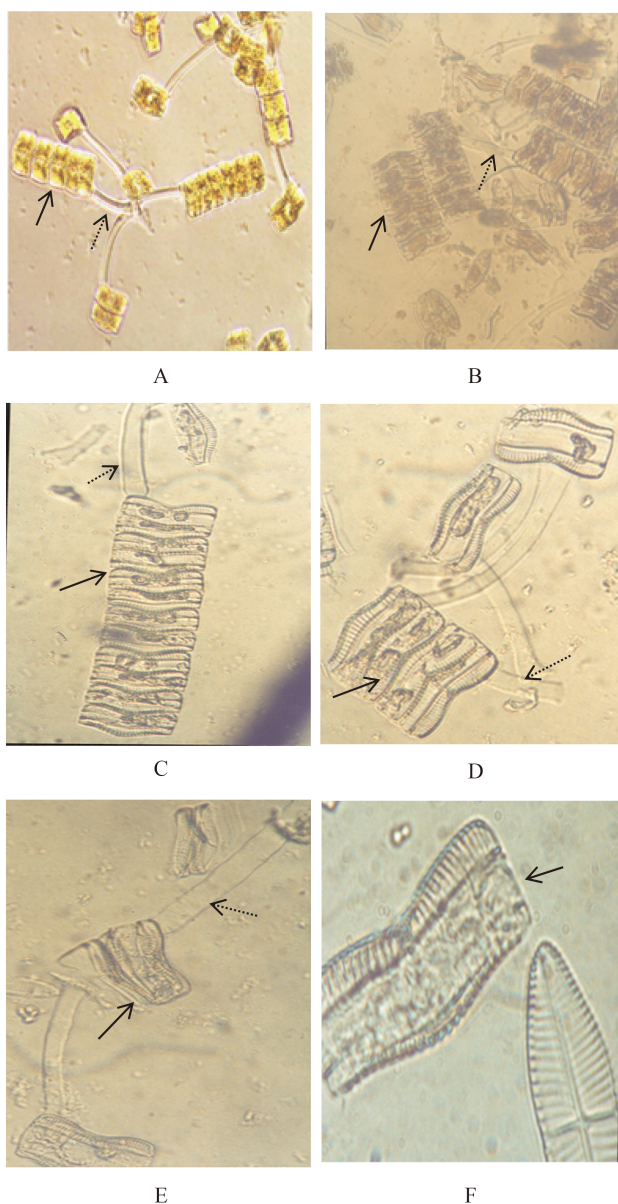


图2 不同提取时间藻细胞和胞外多聚物形态的变化

Fig. 2 Variation of algal cells and EPSs with time course

A. 未提取细胞及柄状胞外多聚物; B. 90%乙醇脱脂后的藻类及柄状物; C和D. 0.3 mol/L碳酸氢钠提取1h后的细胞及柄状物; E. 0.3 mol/L碳酸氢钠提取2.5h后的细胞及柄状多聚物; F. 0.3 mol/L碳酸氢钠提取3.5h后的细胞。实箭头表示藻细胞, 虚箭头表示多聚物

要意义, 并且在维持潮间带泥滩附着生物稳定性发挥了关键作用^[12]。目前开发的EPSs提取方法虽然简单方便, 但是一般效率都很低, 缺少对提取方法的优化。

盐溶液可以有效地提取EPSs。0.5 mol/L碳酸氢钠可以有效提取长柄曲壳藻(*Achnathes longipes*)和咖啡形双眉藻(*Amphora coffeaeformis*)的EPSs而不破坏细胞^[13]。磷酸二氢钾也可以用来提取EPSs^[14]。甚至人工海水也具有良好的提取EPSs效

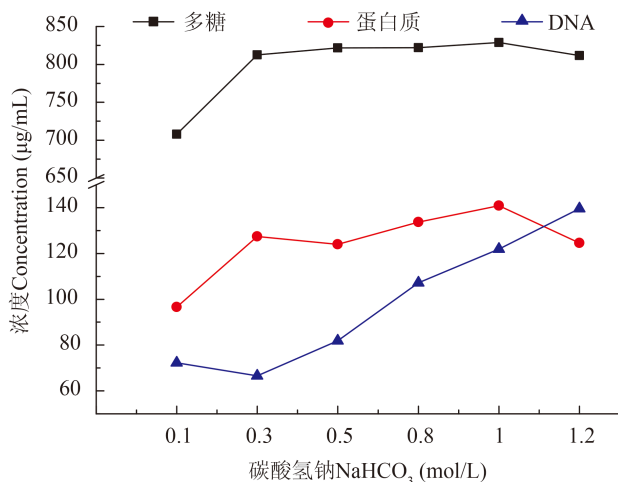


图3 不同浓度碳酸氢钠提取液中DNA、蛋白质和多糖的变化

Fig. 3 Variation of DNA, protein and polysaccharides in EPSs extraction under different NaHCO₃ concentration

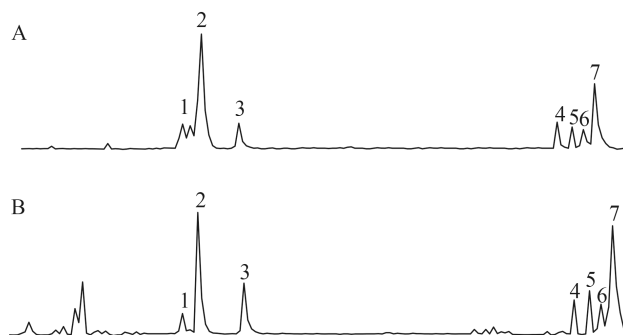


图4 爪哇曲壳藻亚缢变种水溶性(A)和非水溶性(B)胞外多聚物高效液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of water soluble and water insoluble fractions of EPSs from *A. javanica* var. *subconstricta*

1. 鼠李糖; 2. 岩藻糖; 3. 木糖; 4. 肌醇; 5. 甘露糖; 6. 葡萄糖; 7. 半乳糖
1. rhamnose; 2. fucose; 3. xylose; 4. inositol; 5. mannose; 6. glucose; 7. galactose

果。其效果甚至媲美离子交换树脂, 对细胞的损伤极低^[5]。盐溶液提取法的效果依赖其浓度和处理时间^[14]。经过优化后可以作为一种提取EPSs的最优方法。Takahashi^[5]比较了6种提取EPSs的方法, 认为用50%的人工海水处理1h是一种有效提取EPSs的方法。该方法处理后, 硅藻细胞皱缩程度与对照类似, 内部损伤很低; 并且碳水化合物和蛋白的得率与离子交换树脂类似。本研究中, 碳酸氢钠法提取胞外多聚物的最优浓度是0.3 mol/L, 最佳时间为2.5—3h。在这种条件下, 细胞能够保持完整的形态, 其EPSs能够被有效提取。

多糖的生理活性与其结构有密切关系, 但其分离纯化和鉴定存在一定的困难, 藻类多糖分离纯化

的方法不同则得到的组分可能不一样^[15]。国外大多用核磁共振技术来解决多糖的问题, 尽管可以减少多糖样品的破坏, 但由于多糖分子量、黏度都很大, 用核磁共振检测多糖样品并不理想。本研究用90%乙醇多次抽提, 能够有效降低甘油等脂溶性成分, 从而有利于核磁共振检测。

色谱法是分析海洋生物多糖基本结构的重要方法, 一般是加酸将多糖分解后进行单糖分析^[16]。硅藻胞外多聚物主要由多糖类组成^[1, 17], 此外还包括一些含硫大分子及少量蛋白质^[15], 目前在胞外多聚物中尚未发现脂类物质。Wustman等^[13]的研究则表明, 硅藻EPSs主要由酸性多糖组成, 此外还有少量的蛋白质及酚类物质。Suresh等^[15]的研究表明, 硅藻胞外多糖主要由葡萄糖, 半乳聚糖, 古洛糖, 木酮糖, 阿拉伯糖, 岩藻糖和鼠李糖等8种单糖组成, 这些组成在不同种类中有所差异。本研究结果表明, 爪哇曲壳藻亚缢变种岩藻糖和半乳糖的摩尔数是最高的, 而鼠李糖最低。而并基角毛藻(*Chaetoceros decipiens*), 则是鼠李糖和岩藻糖最高, 葡萄糖最低, 并且在生长的不同阶段其胞外多糖的单糖组成也不同^[18]。这表明胞外多糖的组成不仅具有种属差异性, 而且与细胞具体状态密切相关^[1]。

尽管EPSs中的主要成分是多糖, 但是蛋白也具有重要作用。其赋予了EPSs特殊性能, 例如能够形成胶状结构、保留间隙水、调节黏附表面和保护细胞免受环境有毒影响等^[4]。EPSs中蛋白和多糖的比例在正常情况下一般保持稳定。但是硅藻细胞面临环境胁迫时其蛋白的分泌量会发生相应变化。而在提取过程中, 蛋白质比例升高主要原因是提取导致细胞裂解内部蛋白质释放。

EPSs中出现DNA一般认为是细胞裂解所致, 或是细胞膜的通透性增大的原因。本研究的结果也表明DNA含量与细胞裂解存在正相关关系。DNA是指示细胞裂解程度的好指标。

本研究结果表明, 爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物的最佳提取条件为: 碳酸氢钠浓度为0.3 mol/L, 提取时间为2.5—3h时, 在此条件下可充分提取胞外多聚物而不会破坏细胞。爪哇曲壳藻亚缢变种胞外多聚物多糖组分主要为岩藻糖和半乳糖, 此外还含有少量的木糖、葡萄糖、甘露糖等。

参考文献:

[1] Steele D J, Franklin D J, Underwood G J C. Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms [J]. *Biofouling*, 2014, **30**(8): 987—998

[2] Taylor J D, McKew B A, Kuhl A, *et al.* Microphyto-benthic extracellular polymeric substances (EPS) in intertidal sediments fuel both generalist and specialist EPS-degrading bacteria [J]. *Limnology and Oceanography*, 2013, **58**(4): 1463—1480

[3] Lin H, Zhang M, Wang F, *et al.* A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: characteristics, roles in membrane fouling and control strategies [J]. *Journal of Membrane Science*, 2014, **460**: 110—125

[4] Salama Y, Chennaoui M, Sylla A, *et al.* Characterization, structure, and function of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial biofilm in biological wastewater treatment systems: a review [J]. *Desalination & Water Treatment*, 2015: 1—18

[5] Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, *et al.* Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods [J]. *Marine and Freshwater Research*, 2009, **60**: 1201—1210

[6] Subramanian S B, Yan S, Tyagi R D, *et al.* Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering [J]. *Water Research*, 2010, **44**(44): 2253—2266

[7] Lin H, Zhang M, Wang F, *et al.* A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies [J]. *Journal of Membrane Science*, 2014, **460**(9): 110—125

[8] Leiyan Z, Hongqiang R, Lili D. Comparison of extracellular polymeric substances (EPS) extraction from two different activated sludges [J]. *Water Science & Technology*, 2012, **66**(7): 1558—1564

[9] Yang J L, Wang C, Gu Z Q, *et al.* A review on the role of marine biofilms on larval settlement and metamorphosis of marine invertebrates [J]. *Marine Sciences*, 2012, **36**(8): 116—121 [杨金龙, 王冲, 顾志旗, 等. 微生物膜对海洋无脊椎动物幼体附着变态的影响研究. 海洋科学, 2012, **36**(8): 116—121]

[10] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, **28**: 350—356

[11] Lowry O H, Rosebrotlgh N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, **193**: 265—275

[12] Montanié H, Crignis M G D, Lavaud J. Viral impact on prokaryotic and microalgal activities in the microphyto-benthic biofilm of an intertidal mudflat (French Atlantic Coast) [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, (6): 1—15

[13] Wustman B A, Gretz M R, Hoagland K D. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). I. A

- model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms [J]. *Plant Physiology*, 1997, **113**: 1059—1069
- [14] Dong D M, Kang C L, Li Z H, *et al.* Extraxction of extracellular polymers from bioiflms in natural water by potassium Bi-phosphate solution [J]. *Science Technology and Engineering*, 2002, **2**(5): 51—53 [董得明, 康春莉, 李忠华, 等. 磷酸氢二钾法分离自然水体中的生物膜胞外聚合物. 科学技术与工程, 2002, **2**(5): 51—53]
- [15] Suresh V, Senthilkumar N, Thangam R, *et al.* Separation, purification and preliminary characterization of sulfated polysaccharides from *Sargassum plagiophyllum* and its in vitro anticancer and antioxidant activity [J]. *Process Biochemistry*, 2013, **48**(2): 364—373
- [16] Urbani R, Pletikapić G, Sist P, *et al.* Diatom Polysaccharides: Extracellular Production, Isolation and Molecular Characterization [M]. INTECH Open Access Publisher. 2012, 345—370
- [17] Xu L L, Zhan X R, Zeng Z W, *et al.* Study on preparation and chemical characterization of iron (III) - Polygonatum odoratum polysaccharides complex [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2012, **47**(5): 331—334
- [18] Nicolas V O, Moerdijk-Poortvliet T C W, Boschker H T S, *et al.* Release of dissolved carbohydrates by *Emiliania huxleyi* and formation of transparent exopolymer particles depend on algal life cycle and bacterial activity [J]. *Environmental Microbiology*, 2013, **15**(5): 1514—1531

EXTRACTION METHOD AND CHEMICAL COMPOSITION OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES FROM DIATOM *ACHNANTHES JAVANICA* VAR. *SUBCONSTRICATA*

HUANG Shi-Yu

(Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, College of Auaculture, Jimei University, Jimei 361021, China)

Abstract: The current study reported the method to extract extracellular polymeric substances (EPSs) from *Achnanthes javanica* var. *subconstricta* and analyzed compositions of the EPSs. The results showed that the optimal extraction condition was 0.3 mol/L NaHCO₃ with 2.5—3h extraction time, which produced little lysis. Polysaccharide is the main component of EPSs that contributed more than 80% of EPSs, while protein contributed 16%—19% of EPSs. There is no lipid in the EPSs. The monosaccharide composition of flucose, galactose, glucose, mannose, xylose, and rhamnose in water-soluble polysaccharide is 2.47 : 2.13 : 1 : 0.69 : 0.57 : 0.46 (molar ratio). The monosaccharide composition of galactose, flucose, xylose, glucose, mannose, and rhamnose in non-water-soluble polysaccharide is 3.56 : 2.73 : 1.30 : 1 : 0.67 : 0.57.

Key words: *Achnanthes javanica* var. *subconstricta*; Extracellular polymeric substances; Extraction method; Chemical compositions