

# 絮凝剂 BP25 的化学组成及结构研究\*

刘紫鹃 徐桂云<sup>1</sup> 刘志培 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所 北京 100080) (<sup>1</sup>中国科学院化学研究所 北京 100080)

**摘 要:**从活性污泥里筛选到一株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) A25, 它能分泌胞外絮凝剂。用乙醇沉淀及 Sephadex S-500 分子筛层析得到絮凝剂纯品 BP25。通过 Bradford 反应、琼脂糖凝胶电泳及硫酸-酚法测定糖, 证明 BP25 是一类多糖类物质。应用核磁共振技术证明其不含有糖醛酸。经三甲基硅醚和甲基化的气相色谱-质谱分析, 证明多糖 BP25 含有葡萄糖和甘露糖两种单糖, 其摩尔比为 4:1。其连接键型包括  $\alpha$ -1,6 糖苷键和  $\alpha$ -1,3 糖苷键。由此推导出 BP25 可能的单元结构。

**关键词:**絮凝剂, 多糖, 甲基化分析, 色谱-质谱联用

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 03-0348-05

絮凝剂(flocculant)是一类可使液体中不易沉降的固体悬浮颗粒(粒径  $10^{-3} \sim 10^{-7}$  cm)凝聚沉淀的物质。生物絮凝剂是从动、植物中提取的或微生物分泌的天然高分子絮凝剂, 与无机絮凝剂和人工合成的有机絮凝剂相比, 前者具有高效、无毒无害、无二次污染等特点, 在污水处理、管道疏浚、发酵液的菌液分离及食品工业中有良好的应用前景。

不同微生物产生的絮凝剂其组成及结构各不相同。现已报道的有多糖<sup>[1-3]</sup>、糖蛋白、核酸、蛋白质等不同性质的絮凝剂。目前已纯化到的微生物合成的多糖类絮凝剂已达近十种, 它们的组成各不相同。但目前尚无关于絮凝剂多糖结构的报道。

絮凝剂的化学组成及结构与其功能是相一致的。现在较流行的絮凝模型是多聚物架桥模型(polymer bridging model)<sup>[4]</sup>, 这种学说认为在许多生物体系中, 细胞表面的性质和多电荷的构象有利于多聚物的附着, 而后在相邻细胞间形成架桥, 从而使之脱稳而凝集。因此研究絮凝剂的化学组成及结构对进一步阐述絮凝机理从而为改造絮凝剂及提高絮凝效率提供理论依据。本文报道一种由巨大芽孢杆菌 A25 分泌的新型多糖类絮凝剂 BP25 的化学性质及化学组成, 并推导出其可能的单元结构。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及培养条件

巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) A25 为本实验筛选, 培养基组成(g/L)及培养条件分别为: 麦芽糖 20, 酵母提取物 3(预先用 DNA 酶及 RNA 酶 37℃ 处理 4h),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, pH 7.0。30℃ 摇床培养 10h。

### 1.2 絮凝剂 BP25 的纯化<sup>[1-3]</sup>

将发酵液在 12 000g 离心 10min, 上清液中加入 1.5 倍体积无水乙醇, 混匀, 可见丝状

\* 国家“九五”攻关项目(96-909-01-03)

作者简介: 刘紫鹃(1972-), 女, 山东烟台人, 中国科学院微生物所博士研究生, 主要从事环境微生物学研究。

收稿日期: 2000-04-21, 修回日期: 2000-07-10

物结合成团状物出现,将团体取出,在 75% 的乙醇里洗涤。溶于 0.15mol/L 的 NaCl 中。再用 1.5 倍体积乙醇搅丝,得到白色粘稠物。将其溶于 0.15mol/L 的 NaCl 中,配成 3mg/mL 的悬浊液,取 1.5mL 上 Sephadex S-500(Pharmacia)柱(100cm × 1.6cm),流速 0.35mL/min 进行洗脱。用硫酸-酚法<sup>[5]</sup>测定各洗脱管。同时以分子量不同的葡聚糖做参考。收集到的活性峰经过透析除盐,冷冻干燥得到纯品 BP25。

### 1.3 絮凝剂 BP25 化学性质测定

采用 Bradford 微量测蛋白法<sup>[6]</sup>测定样品中有无蛋白质的存在。用琼脂糖凝胶电泳方法经 EB 染色检测有无核酸类物质的存在。用硫酸-酚法测定样品中多糖的含量。对 BP25 的 C、H、N 和 O 元素进行分析(Heraeus CHN-Rapid, Germany 元素分析仪, ST-02 型元素分析仪, 中国)。KBr 压片进行傅立叶红外光谱分析。<sup>13</sup>C 核磁共振(Bruck Avance 500, Swiss)的条件是:谱宽, 26985.973Hz;脉冲宽度, 6.00μs, 温度为室温;溶剂为 D<sub>2</sub>O。

### 1.4 BP25 的组成及结构分析

**1.4.1 薄层色谱分析:**将样品使用 2mol/L 的 HCl 在 121℃ 水解 2h, 对水解物进行纤维素薄板层析, 展开体系为乙酸乙酯:吡啶:水:乙酸 = 5:5:3:1(体积比), 染色剂为苯胺-邻苯二甲酸试剂。

**1.4.2 气相色谱分析<sup>[7]</sup>** 1mg 彻底干燥的样品在 1mL 1mol/L HCl 甲醇中 100℃ 水解 4h, 氮气吹干并在 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 中彻底干燥。加入 N,O-双三甲基硅烷基-三氟乙酰胺(BSTEA)100μL, 吡啶 20μL。加盖密封后置 90℃ 反应 1h。即进行气相色谱分析。使用 Varian 600 型毛细管气相色谱仪, 配有氢火焰离子化检测器。色谱条件:SE-54 石英毛细管柱(25m × 0.32mm), 柱温 150℃ ~ 220℃ 程序升温(5℃/min), 载气为氢气, 线速度为 48cm/s。

**1.4.3 BP25 中单糖的连接点分析<sup>[8]</sup>:**(1)多糖的甲基化反应:称取 600μg 干燥样品移至带螺口的微量反应管中, 加入 1mL 二甲基亚砷氮气封管溶解过夜, 加入刚刚研磨好的氢氧化钠粉 1 ~ 3mg, 充氮气后密封, 并在超声波作用下溶解 5 ~ 10min, 再加入 1mL 的碘甲烷, 避光室温放置 4h 后加入 2mL 的水中止反应, 然后用三氯甲烷萃取三次, 每次 1mL。合并萃取相, 氮气吹干。(2)甲基化多糖的水解:将甲基化多糖溶解在 4mol/L 的三氟乙酸中, 100℃ 水解 4h, 氮气吹干。(3)甲基化单糖的还原:上述水解物溶解在 0.05mol/L 的 0.1mol 氢氧化钠溶液中, 加入 1 ~ 2mg 的硼氢化钠, 室温还原 1h, 再加入 1 ~ 2 滴醋酸中和。用氮气吹干后, 反复加 1mL 甲醇 3 次, 氮气吹干, 残渣在 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 存在下干燥 4h。(4)糖醇的乙酰化:将 0.1mL 吡啶和 0.1mL 乙酸酐加入到上述干燥过的盛有糖残渣的小反应瓶中, 100℃ 反应 30min 后, 室温下氮气吹干, 加入适量的二氯甲烷溶解, 即可进行气相色谱/质谱(GC/MS)分析。(5)GC/MS 分析:采用 GP5050A 型气相色谱质谱联用仪。GC 条件:OV-17 石英毛细管柱(25m × 0.32mm), 柱温 170℃, 载气为氢气, 线速度为 48cm/s。GC-MS 条件:除了用氮气替代氢气为载气外, 其余同上。MS 条件:EI 源, 离子化电势 70eV, 离子源温度 160℃。

## 2 结果分析

### 2.1 絮凝剂 BP25 的纯化

乙醇沉淀得到的粗絮凝剂为浅黄色球状物, 纯化后的 BP25 略显灰白色。以不同分子

量标准的球型多糖在 Sephadex S-500 柱洗脱,得出标准洗脱曲线。BP25 的洗脱体积不在该曲线的范围内,证明其结构不是球型多糖。它与线型的蓝色葡聚糖洗脱体积相近,证明其为线型多糖,平均分子量为  $10^3$  kD。

## 2.2 絮凝剂 BP25 的性质确定

Bradford 法未测出蛋白,电泳后 EB 染色未发现核酸类物质。硫酸-酚法检测到大量糖类物质的存在,证明 BP25 是一类多糖类物质。定量分析的结果(以葡萄糖为标准)表明其总糖含量为 90%。紫外光谱分析的结果表明 BP25 在 201nm 处有唯一吸收峰,未见蛋白和核酸的典型吸收峰(图略)。元素分析的结果是 36.97% 的 O, 6.28% 的 H, 47.00% 的 C, 0% 的 N, 进一步证明了 BP25 是多糖物质。 $^{13}\text{C}$  核磁共振的结果见图 1,从图中可以看出, BP25 在  $\delta = 170$  (化学位移)左右无共振,所以它不含有糖醛酸,1 位碳上的信号堆积在  $\delta = 105 \sim 95$  的范围内,共有 9 个峰,证明其为杂多糖,1 位碳至少有 9 个不同的化学位置。

## 2.3 BP25 的单糖组成及连接点分析

BP25 经酸性水解,薄层色谱分离后,与标准单糖比较证明其含有葡萄糖和甘露糖(图 2)。且葡萄糖含量明显高于甘露糖。BP25 经 HCl 甲醇水解,三甲基硅烷化衍生的气相色谱分析(图 3),证明葡萄糖与甘露糖的摩尔比为 4:1。这里以同时衍生的已知浓度的葡萄糖与甘露糖为对照。从红外光谱分析(图略)的结果中可以看出,其  $846\text{cm}^{-1}$  处为  $\alpha$  型糖苷键的典型吸收,证明糖苷键均为  $\alpha$  型结构。

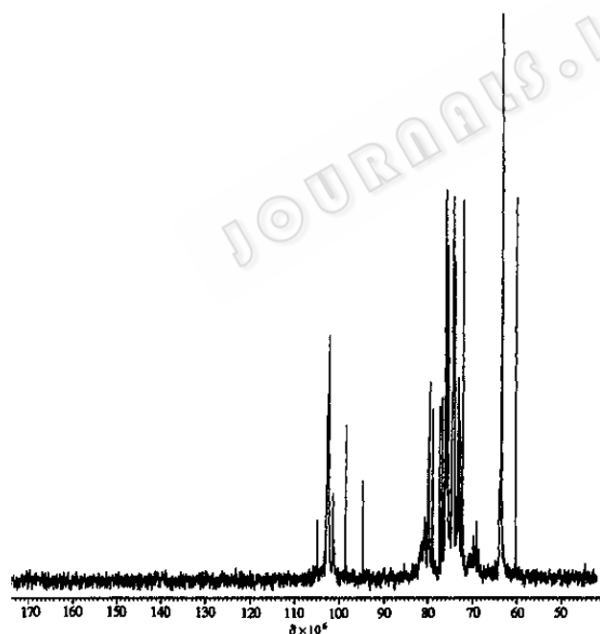


图 1 BP25 的  $^{13}\text{C}$  核磁共振图谱

Fig.1  $^{13}\text{C}$  NMR result of BP25 dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$

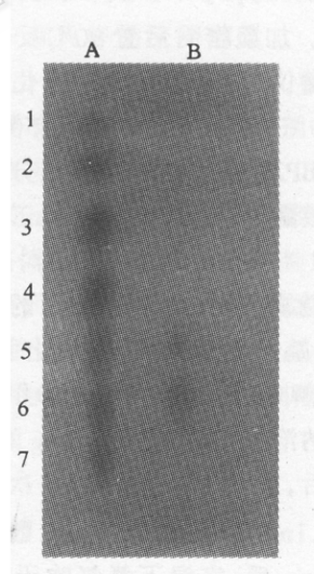


图 2 水解后 BP25 的薄层层析谱图

Fig.2 Thin-layer chromatogram of BP25 hydrolysate

A. Known sugars; B. BP25 hydrolysate.

1. Rhamnose; 2. Xylose; 3. Ribose; 4. Arabinose;

5. Mannose; 6. Glucose; 7. Galactose.

对 BP25 的甲基化、水解、还原、乙酰化、GC/MS 分析确定其存在 2,3,4,6-四甲基-1,5 二乙酰基甘露糖醇酯; 2,3,4-三甲基-1,5,6 三乙酰基葡萄糖醇酯; 2,4-二甲基-1,3,5,6 四乙酰基葡萄糖醇酯(图 4)。说明 BP25 中甘露糖为末端,1 位与葡萄糖以  $\alpha$  键连接,而葡萄糖则是 1,6 位及 1,3,6 位形成糖苷键。其中 1,6 糖苷键是 1,3,6 位糖苷键的 3 倍。

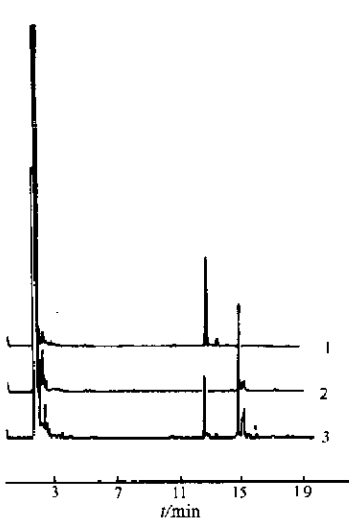


图 3 BP25 酸性甲醇水解后硅烷化的气相色谱图

Fig.3 Gas chromatogram of trimethylsilylated derivatives of BP25  
1. Mannose; 2. Glucose; 3. BP25.



图 4 BP25 部分甲基化分析的气相色谱图

Fig.4 Gas chromatogram of methylation analysis for BP25  
1: 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-1, 5-diacetate Mannose; 2: 2, 3, 4-tri-O-methyl-1, 5, 6-triacetate glucose; 3: 2, 4-di-O-methyl-1, 3, 5, 6-tetracetate glucose.

综上结果,薄层层析、硅烷化 GC 分析及甲基化分析的结果一致;即多糖 BP25 由葡萄糖和甘露糖组成,其摩尔比为 4:1,糖苷键为  $\alpha$  型。其中主链是葡萄糖,而甘露糖位于侧链上。由此可推导出 BP25 可能的结构单元如图 5,其中 G 为葡萄糖,M 为甘露糖。

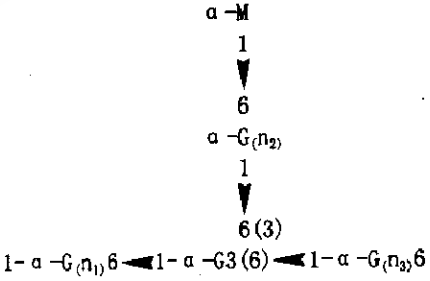


图 5 BP25 重复单元的结构

( $n_1, n_3$  均为 0~3 之间的整数; $n_2$  为 0~2 之间的整数,且  $n_1 + n_2 + n_3 = 3$ )

Fig.5 Chemical structure of repeating unit of BP25

3 讨论

絮凝作用的发生依赖于许多变量,包括被絮凝颗粒的大小和密度,搅拌的强度和时  
间,絮凝剂的浓度、构象、性质以及絮凝体系的 pH 及离子特性等。即絮凝剂的物理性质、  
化学组成及化学结构与其功能密切相关。如絮凝剂 BP25 分子量较大,这有利于细胞间的  
桥联,因为分子量大,吸附位点多,携带电荷多,中和能力就强。而多糖 BP25 富含羟基的

特性,容易使其与相邻的胶体颗粒形成氢键,从而造成胶体脱稳而产生絮凝。另外,BP25多分支的特性使它能占据更多颗粒的结合位点,从而使形成的絮凝团大而结实。这也与观察到的结果相一致。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Yuka I, Kumio Y, Hiroyasu K, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, **61**(3):520 ~ 524.
- [ 2 ] Sik N, Gi S K, Sang O L, et al. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, **60**(2):325 ~ 327.
- [ 3 ] Suh H H, Kwon G S, Lee C H, et al. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, **84**:108 ~ 112.
- [ 4 ] Harrus R H, Mitchell R. *Annu Rev Microbiol*, 1973, **27**:27 ~ 50.
- [ 5 ] Chaplin M F, Kennedy J F. *Carbohydrate analysis*. Washington: IRL Press, 1986. 2.
- [ 6 ] Bradford M M. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**:248 ~ 254.
- [ 7 ] 徐桂云, 常理文, 费丽华. 分析化学, 1998, **26**(8):922 ~ 926.
- [ 8 ] 徐桂云, 常理文. 分析化学, 1996, **24**(12):1400 ~ 1404.

## COMPOSITION AND STRUCTURE OF BIOFLOCCULANT BP25 \*

Liu Zijuan Xu Guiyun<sup>1</sup> Liu Zhipei Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(<sup>1</sup> Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** A strain of *Bacillus megaterium* screened from activated sludge could produce exocellular flocculant. The flocculant was purified through ethanol precipitation and Sephadex S-500 column chromatography. The purified flocculant BP25 was assayed by Bradford reaction, agarose gel electrophoresis and Sulfate-phenol method. The results showed that BP25 was a kind of polysaccharide which contains 36.97% O, 6.28% H, 47.00% C, 0% N. NMR assay showed BP-25 contains no uronic acid. Gas-chromatography assay combined with thin-layer chromatography of acid hydralate revealed that BP25 contains Glucose and Mannose with the mole ratio of 4:1. Methylation analysis revealed the polysaccharide contains  $\alpha$ -1, 6 glycosidic bond and  $\alpha$ -1, 3 glycosidic bond. The main chains are comprised of Glucose and all the Mannose are in the side chains. Possible repeating unit structure was deduced.

**Key words:** Flocculant, Polysaccharide, Methylation analysis, GC/MS

\* Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(96-909-01-03)