

硒化紫球藻胞外多糖组成与结构的初步分析

张 威¹, 王 敏², 朱劲华^{1*}, 张成武²

(1. 江苏职工医科大学, 南京 210029; 2. 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要:通过在 ASW 培养基中加入适量的亚硒酸制备硒化紫球藻胞外多糖, 经分离纯化、纯度鉴定后, 利用下列手段对其进行分析: 通过紫外可见光谱扫描、红外光谱扫描了解其结构信息; 通过高效液相色谱对其单糖组分进行分析; 通过硫酸 咔唑法测定其糖醛酸含量; 通过硫酸比浊法测定其硫酸根含量, 等。Se PSP 和 PSP 一样, 分离后分别得到两种成分, 紫外光谱也和 PSP 相似, 不含有蛋白质和核酸; 红外光谱显示 Se PSP 中 Se 可能取代了 G-H 上的 H 和 SO_4^2- 中的 S; HPLC 显示其单糖组分种类相似, 含量稍有差别; 另外, PSP 和 Se PSP 所含的糖醛酸含量没有统计学差异, Se PSP 所含 SO_4^2- 比 PSP 少。

关键词: 硒; 紫球藻; 胞外多糖

中图分类号: Q949

文献标识码: A

The Primary Research of the Components and the Structure of Selenium Exopolysaccharide of *Porphyridium* sp. (Se PSP)

ZHANG Wei¹, WANG Min², ZHU Jing hua^{1*}, ZHANG Cheng-wu²

(1. Jiangsu Staff Medical College, Nanjing 210029, China; 2. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Se PSP was purified by DEAE 52 cellulose column and identified by Sephadex G 200. The structure of Se PSP was studied by UV spectrophotometer and IR spectrophotometer and its components was studied by HPLC, sulfuric acid carbazole colorimetry and barium sulfate turbidimetry. The results showed that Se PSP contained two members by DEAE-52 and Sephadex G 200 cellulose column. UV spectra of Se PSP was similar to PSP, from which Se PSP was proved to contain no protein and no nucleic acid. Se might replace H of G-H and S of SO_4^2- by IR spectra. Se PSP and PSP contained the same kinds of and different quantity of monosaccharides according to HPLC. The quantity of uronic acid had no difference between PSP and Se PSP in statistics. The quantity of SO_4^2- of Se PSP was less than PSP.

Key words: Selenium; *Porphyridium* sp.; exopolysaccharide

硒是人体必需的一种微量元素, 构成若干抗氧化酶的活性中心, 可影响机体抗氧化能力和相关疾病的抵抗能力。利用紫球藻制备硒化紫球藻胞外多糖正是合成有机硒的一个有效途径。紫球藻(*Porphyridium* sp.)^[1] 是 Naegeli 于 1849 首次发现的一种比较原始的单细胞类群, 紫球藻细胞可积累 20%~50% 生物量的多糖, 该多糖是一种硫酸酯多糖, 包含木糖、半乳糖及葡萄糖等 10 种糖^[2]。

我们采用在培养液中添加无机硒来实现藻对无机硒的富集和转化, 得到了一种硒酸酯多糖, 可以发挥硒和多糖的生理活性, 使两者的作用相互协调并得到增强(另文发表)。本文比较了两种多糖组成和

结构上的异同, 为其今后的进一步综合利用和相关研究提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 供应材料

紫球藻(*Porphyridium* sp.) 产于以色列, 由本古里昂大学 Arad 教授实验室馈赠。

1.2 主要试剂和仪器设备

Dextran(均分子量 10、20、40、70、500 kD, Sigma 公司); LAMNBA-17 型紫外可见扫描仪(BIO-RAD 公司); 高效液相分离柱; ZORBAX 碳水化合物分析柱。

1.3 实验方法

1.3.1 硒化紫球藻胞外粗多糖的制备及纯化

取硒化紫球藻胞外培养液, 离心得上清液, 用无水乙醇沉淀, 将沉淀冷冻干燥后, 即得硒化紫球藻胞

外粗多糖。将粗多糖用 DEAE-52 柱层析, 将纯化后的多糖合并收集后, 在蒸馏水中充分透析, 去除小分子物质。以 CF 为检测指标, 以 AgNO_3 跟踪检测透析, 直至透析无白色浑浊出现。再经 Sephadex G-200 柱检测其纯度, 分别得到 Se PSP-I、Se PSP-II 两种组分。用相同的方法得紫球藻胞外纯化多糖得到 PSP-I 和 PSP-II, 作为实验对照。

1.3.2 硒化紫球藻胞外多糖各组分的紫外可见光谱

分离纯化后的胞外多糖溶于蒸馏水中, 浓度为 0.1 mg/mL , 用 LAMNBA-17 型紫外可见扫描仪分析。

1.3.3 硒化紫球藻胞外多糖各组分的红外光谱分析

取纯化胞外多糖 10 mg 与 KBr 压片, 用 IR-440 红外光谱仪扫描, 测定其红外吸收。

1.3.4 硒多糖、紫球藻胞外多糖的单糖组成分析

采用纸层析进行初步分析(另文发表), 并通过高效液相色谱进一步分析。高效液相色谱条件: 分离柱用 ZORBAX 碳水化合物分析柱; 上样量 $50 \mu\text{g}$; 流动相为乙腈: 水 (3:1); 流速 2 mL/min ; 温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。单糖标样: D-葡萄糖、D-甘露糖、D-果糖、D-木糖、L-岩藻糖、鼠李糖、D-半乳糖、D-葡萄糖醛酸。

1.3.5 硒多糖、紫球藻胞外多糖的糖醛酸含量检测

采用硫酸 吡唑法; 所测光密度值参照标准曲线可得葡萄糖醛酸含量。

1.3.6 硒多糖、紫球藻胞外多糖的硫酸根检测

采用硫酸比浊法。

2 结果与讨论

2.1 紫球藻胞外粗多糖的纯化

紫多糖与硒化紫多糖过 DEAE-52 阴离子交换柱, 苯酚 硫酸法跟踪检测, 以 490 nm 吸光度 A 对洗脱管数作图, 分别得两个近似对称的吸收峰。我们将第一峰分别取名为 PSP-I、Se PSP-I, 将第二峰取名为 PSP-II、Se PSP-II。再用 Sephadex G-200 柱层析做纯度鉴定, 结果显示这四个样品均呈一个近似对称峰。

2.2 PSP-I、Se PSP-I、PSP-II、Se PSP-II 紫外光谱

PSP-I、Se PSP-I、PSP-II、Se PSP-II 在 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 之间有吸收(如图 1), 说明两种化合物有共轭体系, 在 250 nm 之上没有吸收, 该化合物不是芳香族化合物。在 260 、 280 nm 处没有吸收峰, 说明没有蛋白和核酸^[3]。

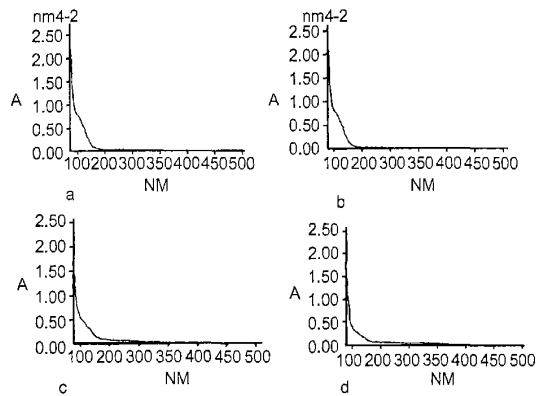


图 1 PSP-I、Se PSP-I、PSP-II 和 Se PSP-II 的紫外吸收光谱
Fig. 1 The ultraviolet spectrums of PSP I, Se PSP I, PSP II and Se PSP II

- a. PSP-I 的紫外光谱 b. Se PSP-I
c. PSP-II 的紫外光谱 d. Se PSP-II
a. The ultraviolet spectrum of PSP I
b. The ultraviolet spectrum of Se PSP I
c. The ultraviolet spectrum of PSP II
d. The ultraviolet spectrum of Se PSP II

2.3 PSP-I、Se PSP-I、PSP-II、Se PSP-II 红外光谱

多糖经 KBr 压片, 在 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ 范围内摄得的红外光谱, 可看出 PSP-I 与 Se PSP-I、PSP-II 与 Se PSP-II 图谱比较相似, 但也有明显区别。

PSP-I、Se PSP-I、PSP-II、Se PSP-II 红外光谱中, 共有的多糖特征是: 在 $3600 \sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ 出现的一宽峰是 O-H 的伸缩振动; 它们均有 $1665 \sim 1635 \text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰, 可能是 C=O 基频吸收峰; $950 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 有强吸收峰, 表明有吡喃单体; 890 cm^{-1} 附近无特征吸收峰, 表明含 β -型糖苷键^[4]; 它们在 1230 cm^{-1} 附近出现了 SO_4^{2-} 的对称伸缩振动。此外, PSP-II 与 Se PSP-II 在 610 cm^{-1} 附近都出现了硫酸酯特征吸收峰, 在 470 cm^{-1} 附近都出现了 SO_4^{2-} 变形振动吸收峰。PSP-I、Se PSP-I、PSP-II、Se PSP-II 红外光谱的区别在于: PSP-I、Se PSP-I 在 $3000 \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ 有弱吸收峰, 是 C-H 的伸缩振动, 而在 Se PSP-I、Se PSP-II 中, 这组弱吸收峰不太明显, 可能是硒取代一部分 C-H 链上的氢; Se PSP-I、Se PSP-II 在有两种 C=O 基频吸收峰, 据推测可能形成硫酸酯多糖与硒酸酯多糖两种; Se PSP-II 在 2207 、 2110 cm^{-1} 的吸收峰在金属有机化合物中常见^[5], PSP-I 在 2200 cm^{-1} 处无明显吸收峰, Se PSP-I、PSP-II 在 2200 cm^{-1} 处的吸收峰较弱, 说明 PSP 中含有金属离子, 而 Se-PSP 中可能含有两种金属离子(如图 2、3)。

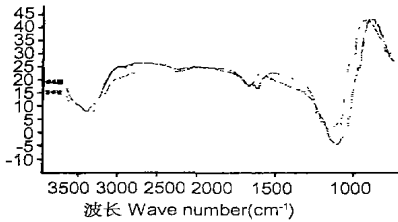


图2 PSP I和Se-PSP I的红外光谱

Fig. 2 Infrared spectroscopy of PSP I and Se-PSP I

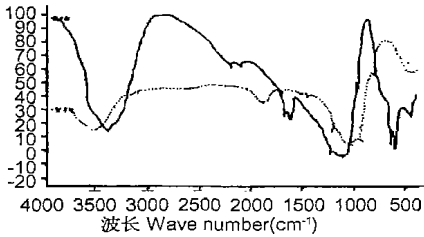


图3 PSP II和Se-PSP II的红外光谱

Fig. 3 Infrared spectroscopy of PSP II and Se-PSP II

2.4 PSP-II、Se-PSP-II的单糖组成分析

高效液相色谱分析: 分离柱选用 ZORBAX 碳水化合物分析柱; 上样量为 50 μg ; 流动相为乙腈: 水(3:1); 流速为 2 mL/min; 温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。单糖的标样为鼠李糖、D-木糖、D-果糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、D-山梨糖、D-葡萄糖醛酸。检测器为示差折光仪。硒化紫球藻多糖经高效液相分析, 检测到该多糖的六种单糖组成成分: 鼠李糖、D-木糖、D-果糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖。其组成比为: 0.51:0.25:0.09:0.33:0.09; 紫球藻多糖六种单糖组成成分鼠李糖、木糖、果糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖。其组成比为: 1:1:0.14:0.09:0.15:0.24(如图4)。

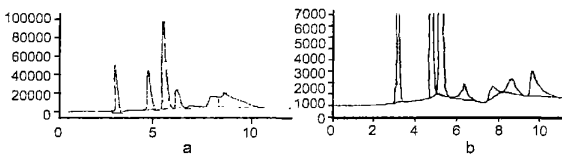


图4 PSP和Se-PSP的单糖组成分析

Fig. 4 Monosaccharides of PSP II and Se-PSP II

a. PSP II; b. Se-PSP II

2.5 PSP、Se-PSP 糖醛酸含量

PSP、Se-PSP 糖醛酸含量为(5.7 \pm 0.23) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 两者之间糖醛酸含量没有统计学差异。

2.6 PSP、Se-PSP 硫酸根含量

PSP 硫酸根含量为(51 \pm 0.03) $\mu\text{g}/\text{mg}$, Se-PSP 硫酸根含量为(44 \pm 0.02) $\mu\text{g}/\text{mg}$, 两者之间硫酸根含量有差异($P < 0.05$), 说明一部分 SO_4^{2-} 中的 S 可能被 Se 取代了。

3 讨论

高效液相、红外光谱、紫外光谱结果表明 PSP 和 Se-PSP 是由鼠李糖、木糖、果糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖等单体通过 β -型糖苷键连接成的多糖, 可能含有两种以上的金属元素, 不含磷, 含有硫元素, 是一种硫酸酯多糖; 有糖醛酸等不饱和共轭体系, 分子量都介于 $4.4 \times 10^6 \sim 5.8 \times 10^6$ D。国外有报道^[6] 该紫球藻胞外多糖分子量 2×10^6 D 以上, 是一种硫酸酯多糖, 含有糖醛酸等, 与本文的研究结果基本一致。硫酸根及糖醛酸含量会随着培养条件不同而改变, 因此各报道互不相同; 我们制备的多糖中硫酸根及糖醛酸含量远远小于文献中报道^[7]。国外文献中报道紫球藻胞外多糖由十种多糖组成, 而我们只检测到六种单糖, 其原因可能是由于示差检测仪对检测某些单糖不灵敏, 也有可能某些单糖含量比较低, 而没有检测到, 其实验方法有待于改进; 对其主要三种单糖组成成分鼠李糖、木糖、葡萄糖同文献报道是一致的。通过红外光谱发现有金属元素吸收峰, 红外光谱也说明硒多糖仍保持硫酸酯多糖的结构, 只是硒取代了紫多糖中的一些 $\beta\text{-C-H}$ 上的 H 及 SO_4^{2-} 中的 S; 而且通过测定两种多糖的硫酸根含量发现, 硒化紫球藻胞外多糖的硫酸根比紫球藻胞外多糖含量要少, 更加说明 Se 可能取代了一部分 SO_4^{2-} 中的 S。在对硒是否结合在多糖上的鉴定过程中, 为防止游离硒的干扰, 将酒精沉淀、冷冻干燥后的多糖配成水溶液后充分透析, 并以培养液中最多的 Cl 作是否透析充分的检测指标, 这样可在一定程度上排除游离硒的干扰。在测硒含量时, 发现紫球藻胞外多糖几乎不含硒, 而且通过红外光谱发现, 硒化紫球藻胞外多糖与紫球藻胞外多糖结构相似, 但又不是完全相同, 说明是外源性的硒结合了上去。但硒是采取什么样的方式结合上去, 取代了哪些部位上的 H 及 S 还有待于进一步研究。因为该多糖分子量较大, 成分、结构比较复杂, 因此对紫球藻胞外多糖结构的研究进展缓慢, 至于其结构、连接方式、连接顺序、空间结构以及硒取代方式等, 有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Cao JX(曹吉祥). The broad use of *Porphyridium*. *Chin J Marine Drugs* (中国海洋药物), 1994, 3: 55-56.
 - 2 Surendra S. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium sp.* in flat glass reactors. *Journal of Applied Phycology*, 2000, 12: 269-275.
 - 3 Wu YH(伍越震). The Structure Analysis of Organic Compound(有机结构分析). Hefei: Chinese Science Publishing House, 1993.
 - 4 Tan ZJ(谭周进), Xie DP(谢达平), Wang Z(王征), et al. Studies on isolation, purification and some properties of polysaccharide from *Armillaria mellea*. *Food Sci*(食品科学), 2002, 23(9): 49-54.
 - 5 Minkova K, et al. Antiviral activity of *Porphyridium cruentum* polysaccharide. *Pharmazie*, 1996, 51: 194-199.
 - 6 Geresh S, Adin I, Yamolinsky E, et al. Characterization of the extracellular polysaccharide of *Porphyridium sp.*: molecular weight determination and rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 2002, 50: 183-189.
-
- (上接第 947 页)
- 3 Konishi T, Azuma M, Itoga R, et al. Three new labdane type diterpenes from wood, *Excoecaria agallocha*. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44: 229-231.
 - 4 Anjaneyulu ASR, Rao V, Sreedhar K, Agallochins J L, new isopimarane diterpenoids from *Excoecaria agallocha L.* *Natural Product Research*, 2003, 17: 27-32.
 - 5 Sayama Y, Kyogoku K, Murayama H. New diterpenes of *Torreya nucifera* sieb Et Zucc. *Agric Biol Chem*, 1971, 35: 1068-1073.
 - 6 De Kimpe N, Schamp N. Isolation and structural identification of 8 (14), 15 sandaracopimaradiene 7 α , 18 diol from *Ibiza riparia*. *J Org Chem*, 1982, 47: 3628-3630.
 - 7 Fernández I, Pedro JR, Vidal R. Norisoprenoids from *Centaurea aspera* and *C salmantica*. *Phytochemistry*, 1993, 34: 733-736.
 - 8 Abe F, Yamauchi T. 5, 11-Epoxymegastigmanes from the Leaves of *Asclepias fruticosa*. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48: 1908-1911.
 - 9 Takikawa H, Isono K, Sasaki M, et al. Synthesis and structural revision of annuionone A. *Tetrahedron Lett*, 2003, 44: 7023-7025.
 - 10 González AG, Jiménez IA, Ravelo AG. Triterpenes from *Maytenus canariensis* and synthesis of a derivative from betululin. *Phytochemistry*, 1992, 31: 2069-2072.
 - 11 Mañas FA, Simonet AM, Galindo JCG, et al. Bioactive polar triterpenoids from *Melilotus messanensis*. *Phytochemistry*, 1998, 49: 709-717.
 - 12 Kizu H, Tomimor. Studies on the constituents of *Clematis species V* on the saponins of the root of *Clematis chinensis* Osbeck (5). *Chem Pharm Bull*, 1982, 30: 3340-3346.
 - 13 Kinjo J, Fukui K, Higuchi H, et al. The first isolation of lignan tri- and tetra-glycosides. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39: 1623-1625.
 - 14 Ali Z, Ahmad VU, Zahid M, et al. Benzoic acid derivatives from *Stacksia brahuica*. *Phytochemistry*, 1998, 48: 1271-1273