

# 南极适冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 胞外多糖的分离、纯化和结构分析

李江<sup>1</sup>, 宋国强<sup>2</sup>, 陈靠山<sup>1,3</sup>, 李光友<sup>1</sup>

(1. 国家海洋局一所海洋生物活性物质重点实验室, 青岛 266061;  
2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 山东大学生命科学学院, 济南 250100)

**摘要** 从一株南极海冰中分离出来一种适冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13, 其胞外多糖具有良好的免疫活性. 为了探讨南极菌 S-15-13 胞外多糖结构与功能之间的相互关系, 对其胞外多糖进行了分离纯化和结构分析. 粗多糖经 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析及 Sephadex G-100 凝胶层析纯化后得到组分 EPS-II, 经 HPLC 分析验证 EPS-II 为单一组分, 其分子量为 62000; 单糖组成、甲基化分析及核磁共振结果表明, EPS-II 的主体结构由 (1,2)- $\alpha$ -D-Man 组成主链, 并在 6 位上有分支的新甘露聚糖.

**关键词** 胞外多糖; 南极适冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13; 分离纯化

中图分类号 O629.12

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)06-1149-04

南极海冰中发现了大量的微生物(海冰微藻和细菌)及其产生的胞外多糖(EPSs), 这些胞外物质聚集在冰藻和细菌生存的海冰通道中, 提供了海冰和冰水界面的有机碳, 是能源传输的主要物质; 并且能保护细胞在结冰时免受冰晶的伤害, 缓冲 pH 值以及盐浓度的变化, 可以降低其它化学物质的伤害<sup>[1]</sup>, 在南极生态系统中具有重要的意义. 近期研究表明, 南极海冰微生物 EPSs 的分子量较大, 约为普通海洋微生物的 5 ~ 10 倍<sup>[2]</sup>, 分子量对 EPSs 的结构和生物特性具有重要的影响, 然而南极海冰微生物 EPSs 的精细结构及其结构与生物功能的相互关系尚需进一步的研究<sup>[3]</sup>.

我们从一株南极菌的发酵液中分离获得具有良好免疫和抗肿瘤活性的胞外多糖, 为了深入探讨该 EPSs 的生物活性与结构之间的相互关系, 本文对南极适冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 的 EPSs 进行了分离纯化和结构分析.

## 1 实验部分

### 1.1 材料

南极适冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13, 于 2002 ~ 2003 年第 19 次中国南极科学考察采集的海冰中(68°30'E, 65°00'S)分离获得. 鉴定结果表明, 该菌为假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)的适冷菌.

### 1.2 试剂与仪器

DEAE-Sephadex A50 和 Sephadex G100 (Pharmacia 产品); 无水二甲基亚砷(DMSO)、四甲基脒(Aldrich 产品); 氢氧化钠、硼氢化钠(Sigma 产品); 其它试剂均为国产分析纯试剂.

Labconco 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); Agilent 1100 高压液相色谱仪(美国 Agilent 公司); QP5000 型气质联用仪(日本 Shimadzu 公司); Avatar370 FT-IR 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Nicolet 公司); Inova 600 型核磁共振波谱仪(Varian 公司).

### 1.3 EPS-II 的分离纯化及分析

将南极菌 S-15-13 活化后接种于 2216E 液体培养基中, 于 8 °C 培养 56 h. 将发酵液离心, 醇沉,

收稿日期: 2007-09-28.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 40706053)资助.

联系人简介: 李江, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事海洋活性物质研究. E-mail: lijiaang2565@126.com

Sevag 法<sup>[4]</sup>脱蛋白后,透析冻干得粗多糖.经 DEAE-Sephadex A-50 层析柱(40 cm × 2.5 cm)层析,以上限为 0.5 mol/L 的 NaCl 磷酸缓冲液进行梯度洗脱,流速 24 mL/h,自动部分收集洗脱液,透析冻干.再由 Sephadex G-100 层析柱(100 cm × 2 cm)进一步纯化,洗脱液为 0.05 mol/L NH<sub>4</sub>Ac 溶液,流速为 8 mL/h,以苯酚-硫酸法<sup>[5]</sup>跟踪检测.合并出峰部分的洗脱液,透析后浓缩冻干.样品经 HPLC 分析,计算分子量并根据峰形判断样品纯度.

分析条件: TSK-GEL G2000PW(300 mm × 7.5 mm i. d.) 色谱柱; 流动相 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 流速 1.0 mL/min; 柱温 60 °C; 进样量 2 μL, 用示差折光检测器检测. 样品在 200 ~ 600 nm 范围内进行紫外扫描, KBr 压片测定红外光谱. 用 600 MHz 核磁共振仪测定其 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DQF-COSY, TOCSY, HMQC, HMBC 和 NOESY 谱.

#### 1.4 糖组成分析和甲基化分析

在 10 mg EPS- II 中加入 2 mol/L 三氟乙酸 2 mL, 在 100 °C 水浴加热下水解 18 h, 按文献<sup>[6]</sup>的步骤转化成糖酐乙酸酯衍生物, 进行气相色谱分析. 在氮气保护下, 在 10 mg EPS- II 中加入二甲基亚砜 3 mL, 溶解后依次加入 0.25 mL 四甲基脲和 3 mL 甲基亚磺酰甲基钠, 采用改良的 Hakomori 法<sup>[7]</sup>甲基化. 甲基化后的 EPS- II 固体经红外光谱检测 3500 cm<sup>-1</sup>附近有无吸收峰. 甲基化的 EPS- II 经水解和乙酰化, 得到部分甲基化糖醇乙酸酯, 进行气相色谱-质谱联用分析.

## 2 结果与讨论

### 2.1 分离纯化和分析

南极适冷菌 S-15-13 发酵液经分离纯化后得到白色疏松固体 EPS- II. 经紫外分光光度法检测, 仅 200 nm 处有多糖特征峰, 无核酸(260 nm)、蛋白质(280 nm)及色素(600 nm)等杂质峰. 冻融分析, 无沉淀. HPLC 分析测定结果表明, 样品呈对称单一峰, 表明所获得的多糖纯度较高, 经计算其分子量为 62000. 红外光谱分析结果表明, EPS- II 具有多糖的特征吸收峰: 3423 cm<sup>-1</sup>为 OH 基团的伸缩振动, 2925 cm<sup>-1</sup>为亚甲基的 CH 伸缩振动, 1648 cm<sup>-1</sup>为糖环的伸缩振动, 1058 cm<sup>-1</sup>为 C—O—H 或 C—O—C 结构中 C—O 键的弯曲振动, 890 cm<sup>-1</sup>的特征吸收峰表明其含有甘露糖<sup>[8]</sup>.

### 2.2 结构分析

糖组成分析结果表明, EPS- II 仅由 *D*-甘露糖组成. GC-MS 分析结果表明, 该多糖主要含有 1,2-Man 和 1,2,6-Man, 非还原末端 Man(T-Man) 不同连接方式的甘露糖, 仅在其主链或侧链上含有少量 1,3-Man 和 1,6-Man<sup>[9]</sup>. 由分析数据推测, EPS- II 的主要结构是由(1,2)α-*D*-Man 组成主链, 并在 O-6 位上有分支的甘露聚糖, 气相色谱-质谱分析结果见表 1.

Table 1 GC-MS data for partially methylated alditol acetate

Retention time/min	MS ions, <i>m/z</i>	Sugar residue	Ratio(%)
26.87	100.7, 160.9, 144.9, 128.8, 116.8, 86.8, 70.8, 204.9	1,2-Man	41.94
34.91	128.8, 86.8, 98.9, 116.7, 160.9, 188.9	T-Man	20.55
41.94	128.7, 188.9, 98.8, 86.8, 42.8	1,2,6-Man	24.92

在 <sup>1</sup>H NMR 谱中, δ 4.7 ~ 5.2 为甘露糖的异头质子共振区, 在 3 个较大的共振吸收峰中 δ 4.90 推测为 1,2-Man 中的 C1—H, δ 4.95 为 1,2,6-Man 中的 C1—H, δ 5.12 为 T-Man 中的 C1—H. 在 <sup>13</sup>C NMR 谱中, δ 97 ~ 102 为甘露糖的异头碳共振区. 在 DEPT-135 谱中(图 1), 存在 2 个负峰(δ 60.43, 65.11), 说明 EPS- II 中有两种处于不同化学环境类型的 CH<sub>2</sub> 基团存在. 由此推测: δ 60.43 归属为 1,2-Man 中的 C6, 此峰右边的小的“肩胛峰”(δ 60.38) 归属为 T-Man 中的 C6; δ 65.11 归属为 1,2,6-Man 中的 C6, 这是一个分支结构片断的连接点. 更多的信息来源于 EPS- II 的二维核磁共振谱. 通过 COSY 谱可以分别归属 1,2-Man, 1,2,6-Man 和 T-Man 上所有质子的共振信号. 通过 TOCSY 谱, 一方面可以归属 1,2-Man, 1,2,6-Man 和 T-Man 3 种类型甘露糖环上的 C2, C3, C4, C5 和 C6 质子信号, 另一方面又可以佐证 COSY 谱中质子信号归属的准确性.

糖链连接方式的更多信息来源于 HMBC 谱(图 2)和 ROESY 谱, δ 4.90(氢核)与 δ 77.84(碳核)的

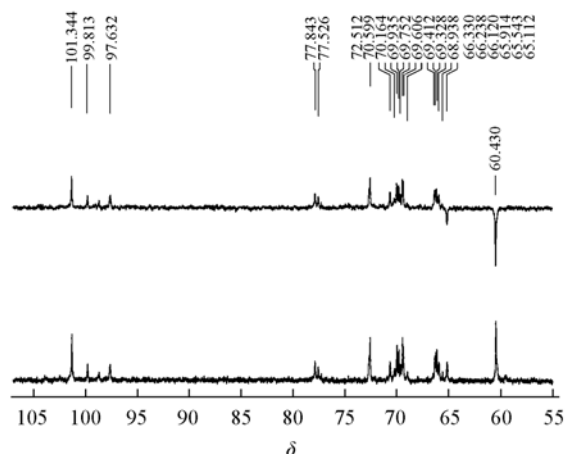
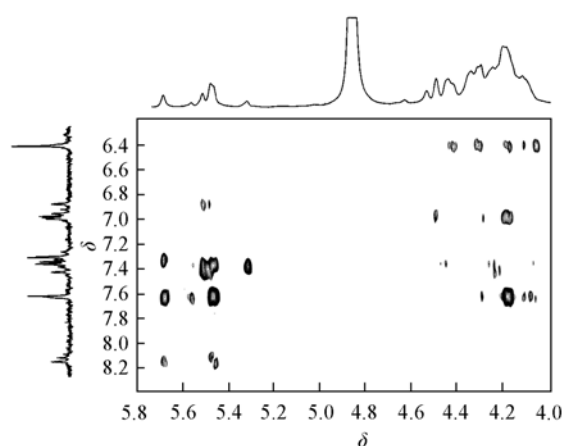
Fig. 1  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of EPS- II

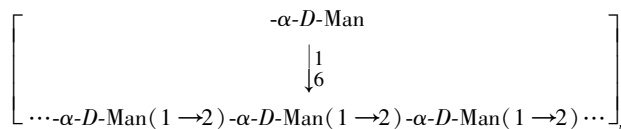
Fig. 2 HMBC spectrum of EPS- II

峰有相关点, 说明 1,2-Man 中 C1—H 与 C2 相关联;  $\delta$  5.12 (氢核) 与  $\delta$  77.53 (碳核) 的峰有相关点, 说明 T-Man 中 C1—H 与 C2 相关联;  $\delta$  4.95 (氢核) 的峰与  $\delta$  65.11 (碳核) 的峰有相关点, 说明 1,2,6-Man 中 C1—H 与 C6 相关联; 而 ROESY 谱中, 在对角线  $\delta$  4.95 (1,2,6-Man 中的 C1—H) 的水平方向上出现一长串的相关点, 与 COSY 谱的相同区域相比较得知: 1,2,6-Man 中的 C1—H 与  $\delta$  3.50~3.70 区间范围内的质子基团有 NOE 相关峰, 即基团间的空间距离较为靠近 (即 1,2,6-Man 中的 C1—H 与 1,2,6-Man 中的 C6—H, 1,2-Man 中 C6—H 以及 T-Man 中 C6—H 空间较为接近), 结果见表 2。

**Table 2 Inter-glycosidic correlations from the anomeric protons observed in  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOSEY and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC of EPS- II**

Mannose residue	Anomeric proton	NOE	HMBC
1,2-Man	4.90	3.59	77.84
1,2,6-Man	4.95	3.50	65.10
1T-Man	5.12	3.58	77.53

甘露糖残基异头碳构型借助门控去偶技术进行分析, EPS- II 的门控去偶谱测得的 1,2-Man, 1,2,6-Man 和 T-Man 异头碳的  $^1J_{\text{C-H}}$  值分别为  $\delta$  169.28, 171.02 及 172.17。因此推断 EPS 多糖结构单元内这 3 种不同连接方式甘露糖异头碳的构型均为  $\alpha$  构型。通过甲基化分析及 1D 和 2D 核磁共振分析, 推测 EPS- II 主体结构单元的示意图如 Scheme 1 所示。



Scheme 1 Structure unit of EPS- II

## 参 考 文 献

- [1] Krembs C., Engel A.. Mar. Biol. [J], 2001, **138**: 173—185
- [2] Mancuso Nichols C. A., Garon L. S., Bowman J. P., et al.. Microb. Ecol. [J], 2005, **49**: 578—589
- [3] Mancuso Nichols C. A., Guezennec J., Bowman J. P.. Marine Biotechnology [J], 2005, **7**(4): 253—271
- [4] GU Xiao-Mei (顾笑梅), WU Hou-Ming (吴厚铭), MA Gui-Rong (马桂荣). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2004, **25**(7): 1288—1290
- [5] ZHANG Long-Xiang (张龙翔), ZHANG Ting-Fang (张庭芳). Biochem. Method and Tech. Experiment (生化实验方法和技术) [M], Beijing: High Education Press, 1981: 165—166
- [6] ZHANG Wei-Jie (张惟杰). Biochem. Research and Tech. Glycoconjugates, 2nd Edition (糖复合物生化研究技术, 第二版) [M], Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999: 12—13
- [7] Hakomori S.. J. Biochem. [J], 1964, **55**: 205—208
- [8] HUANG Ru-Duo (黄汝多), GE Ji-Zhi (葛继志), LI Zhen-Hua (李振华), et al.. Acta Laser Biology Sinica [J], 1998, **7**(4): 257—

## Separation, Purification and Structure Analysis of an Extracellular Polysaccharides from Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13

LI Jiang<sup>1\*</sup>, SONG Guo-Qiang<sup>2</sup>, CHEN Kao-Shan<sup>1,3</sup>, LI Guang-You<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Bio-active Substances, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China;

3. College of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract** An immunoactive extracellular polysaccharide was isolated from *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13, a bacterium screened from Antarctic sea-ice. In order to accurately define the structure of the Antarctic bacterial EPSs and to relate these findings to the function of these molecules in the natural environment, purification and structural analysis of S-15-13 EPSs was carried out. Exopolysaccharide fractions were extracted and were purified by DEAE-Sephadex A-50 ion-exchange and Sephadex G-100 gel chromatography to give EPS- II. The EPS- II was eluted as a single peak in HPLC analysis, indicating that the homogeneity and purity of EPS- II were suited to the structural analysis. The molecular weight of the EPS- II was determined as 62000 by the HPLC method. Sugar composition analysis, methylation analysis and one-dimensional and two-dimensional NMR spectroscopies reveal that the main structure of EPS- II was a 1,2 linking mannan with fewer 1,2,6-linking branch, a new extracellular polysaccharide from Antarctic bacterium.

**Keywords** Extracellular polysaccharide; Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13; Separation and purification

(Ed. : H, J, Z)