

硒硫比值对钝顶螺旋藻有机化硒的影响及藻体中硒的形态、价态构成*

黄 峙¹ 郑文杰² 向军俭¹ 杨红宇¹ 郭宝江³

(暨南大学¹ 生物工程学系,² 化学系 广州 510632)

(³ 华南师范大学生物技术研究所 广州 510631)

摘要 在培养基中添加亚硒酸钠、硫酸钾培养钝顶螺旋藻,研究硒、硫不同克分子比(Se:S)对钝顶螺旋藻有机化硒的影响,用2,3-二氨基萘荧光分光光度法测定藻体中总硒、有机硒、4价硒及6价硒含量,分析藻体中硒的形态、价态构成。结果显示,一定范围内Se:S对钝顶螺旋藻产率影响不大,但硒浓度为3.80 mmol/L,Se:S=0.812时螺旋藻产量、总硒及有机硒含量均最高,富硒钝顶螺旋藻中以有机硒为主,无机硒以4价硒为主。

关键词 硒硫比值,钝顶螺旋藻,硒,有机硒

硒(Se)和硫(S)同属氧族元素,两者化学性质类似,在吸收、转运和进入生物大分子中的途径有相同之处。Leggett和Epstein于1956年对硒、硫拮抗的研究发现,植物体对硒酸盐和硫酸盐表现出竞争性吸收的特点,并结合于根部细胞膜上的相同位点。螺旋藻(*Spirulina*)具有增殖快、光合效率高和蛋白质含量丰富的特点,硫对其生长是必需的。螺旋藻虽为非积硒植物,但对无机硒有较强耐性^[1],在培养液中添加亚硒酸钠(Na_2SeO_3)可以实现藻体对硒的富集和有机化,因此可作为硒生物有机化的理想载体^[2]。在进行硒有机化培养中,硒硫不同克分子比简称硒硫比值(Se:S)对螺旋藻产量、硒含量和硒有机化率将会产生较大影响。硒在生物体内的存在形态可区分为有机态和无机态,其中无机硒又有单质硒(Se⁰)、4价硒(Se^{IV})及6价硒(Se^{VI})之分,它们的含量是某一富硒产品营养价值的重要指标,富硒螺旋藻中硒的形态、价态及含量也有必要确证。

1 材料与方 法

1.1 藻种

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*),由深圳蓝藻公司提供,本实验室保种。

1.2 硒硫比配制

Zarrouk培养基用含硒1.267 mmol/L的 Na_2SeO_3 母液调整硒浓度。添加硫酸钾(K_2SO_4)调整硫浓度,培养基硫源中除 K_2SO_4 外,合计0.852 mmol/L(S_1), K_2SO_4 加量经扣除 S_1 计算。按表1配制不同硒硫比值。

1.3 培养条件

表 1 不同硒硫比配制

Tab.1 Preparation of different Se:S ratio

硒硫比	硒浓度(mmol/L)	硫浓度(mmol/L)
1.624	3.80	2.34
0.812	3.80	4.68
0.406	3.80	9.36
0.203	3.80	18.72
0.102	3.80	37.44

藻种接种于1000 ml鼓泡式生物反应器(实验室自制)内,接种量为 $\text{OD}_{560}^{\text{cm}} = 0.10$,温度33~35℃,pH

* 广东省自然科学基金010369号和广州市科委资助项目2001-F010-01号。

第一作者:黄峙,出生于1968年,硕士,讲师。E-mail: Hzhi@21cn.com

收稿日期:2001-07-26;修回日期:2001-10-20

8.8~9.5,光照强度 4 000 lx,光照时间为每天 24 h,培养 8 d 采收。

1.4 分析与测定

OD₆₆₀:用分光光度计测定。

测定硒:称取含硒藻粉 10.0 mg 置于具塞三角瓶中,经 5 ml 混合酸(HNO₃: HClO₄ = 4: 1)消化,使 2 价硒(Se II)氧化成 Se IV,消化液用 2, 3- 二氨基萘(2, 3- DAN) 荧光分光光度法测定硒含量,计为总硒;另称取含硒藻粉 100.0 mg 加浓盐酸至 HCl 终浓度为 20 %,煮沸 20 min,使 Se VI 完全还原成 Se IV,冷却后不经消化处理测定硒含量(Se IV、Se VI之和),计为无机硒;再称取含硒藻粉 100.0 mg 经超声波破碎,0.3 %过氧化氢浸提 3 次,每次 2 h,4 000 r/ min 离心 15 min,收集上清液,不消化直接测定其中 Se IV 含量,用所测无机硒含量减去 Se IV 含量得 Se VI 含量。实验重复 3 次。

1.5 仪器与试剂

RF- 540 型荧光分光光度计、低温高速离心机、岛津 UV- 3000 紫外分光光度计、真空冻干机、超声波细胞破碎仪,2, 3- DAN、Na₂SeO₃ 等试剂为 AR 级。

2 结果与讨论

2.1 硒硫比值对螺旋藻有机化硒的影响

考虑到硒对生物体的毒性作用,实验设计中硒硫比值的设定以不致引起明显毒性作用的硒浓度为限,作者经大量预实验认为,硒浓度在 3.80 mmol/ L 时对螺旋藻生长无不良影响。硒硫比对螺旋藻产率、总硒和有机硒含量的影响如图 1、图 2 所示。当培养基中硒添加浓度为 3.80 mmol/ L 时,除在 Se: S = 1.624 情况下导致产率下降外,硒硫比值在实验范围内对螺旋藻产量影响不大,与作者单位在实验中发现硫浓度不是影响螺旋藻产量的关键因素相一致;但硒硫比对藻体富集和有机化硒影响较大,在 Se: S = 0.812 时螺旋藻产量、总硒和有机硒含量均最高,该条件可为培养富硒螺旋藻提供参照;随硒硫比值减小,总硒与有机硒呈明显下降趋势,两者浓度变化基本同步,说明螺旋藻富硒及有机化硒与硒、硫浓度优势不同而有显著变化,这可能是硒硫竞争拮抗影响螺旋藻对硒吸收、代谢和转化所致,硒与硫性质相似,所以硒通过代替硫的代谢途径进入生物体,硒、硫浓度及其比值的不同可能会影响生物体对硒的吸收代谢过程。硒硫比高时产率下降,可能由于硫的拮抗减弱增强了硒的毒

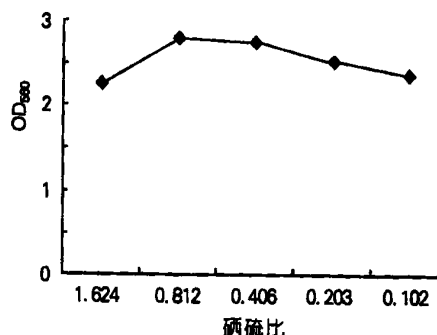


图 1 硒硫比对螺旋藻产量的影响

Fig.1 Effect of various Se: S on yield of *Spirulina*

性。

2.2 富硒螺旋藻中硒形态、价态及含量

生物体中硒的形态多样,总体上可区分为有机硒和无机硒^[3],有机硒主要指以负 2 价态结合在蛋白质、脂、多糖、核酸、氨基酸、多酚、甾类化合物等有机分子特别是生物分子中的硒^[4],其在代谢过程中又可衍生出复杂的中间形式。吴江、欧阳政于 1987 年建立了硒蛋氨酸的溴化氰-气相色谱测定法,农晋琦等在 1994 年又将该法用于硒半胱氨酸和硒胱氨酸的测

表 2 富硒螺旋藻中硒形态、价态及含量

Tab.2 Chemical states, valences and contents of Se-enriched *S. platensis*

硒浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	总 硒 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 干重)	有机硒 ($\mu\text{g}/\text{g}$ 干重)	无机硒($\mu\text{g}/\text{g}$ 干重)	
			SeIV	SeVI
0	0.014	0.012	0.002	未检出
100	189.37	172.07	17.30	未检出
300	384.52	331.43	53.09	未检出
500	627.66	484.51	143.15	未检出

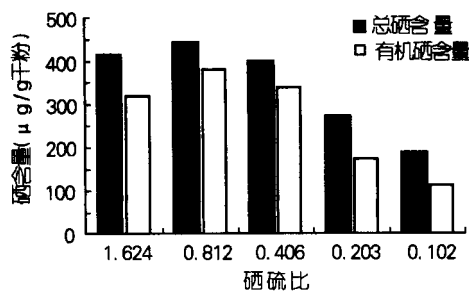


图 2 硒硫比对总硒及有机硒含量的影响

Fig.2 Effect of various Se: S on total Se and organic-Se content in *Spirulina*

定, 陈汉杰等于 1993 年对硒酵母中的硒蛋白进行色谱分离和分析, 但对许多有机硒的确切形态至今仍无简便方法进行鉴定。无机硒是 Se⁰、Se^{IV}、Se^{VI} 的统称。王子健等在 1988 年对不同价态硒的测定进行探索, 瞿进文等于 1994 年对富硒生物样品中硒的价态和形态进行了分析, 本文采用瞿进文方法并适当改良, 结果表明 (见表 2), 富硒螺旋藻中存在无机态和有机态的硒, 但以有机硒为主, 占 75% 以上, 因此螺旋藻是硒生物有机化的理想载体。从无机硒的价态上看, 添加培养的富硒螺旋藻中以 Se^{IV}, 但用本法未测出 Se^{VI}。在一定范围内, 随培养液中添加无机硒浓度的增加, 总硒、有机硒和无机硒均有所增加, 但无机硒的增加相对更明显, 按比例算, 甚至超过培养液中添加硒的增长幅度 (添加硒以 1, 3, 5 倍递增, 而无机硒

大约以 1, 3, 8 倍增长), 这是进行螺旋藻富硒培养和生物有机化研究和应用中值得注意的问题。

参考文献

- 1 李乐农, 张秀平, 郭宝江等. 富硒螺旋藻中含硒蛋白的纯化结晶及初步晶体学研究, 中国科学(C辑), 2000, 30(5): 449 ~ 455
- 2 黄 峙, 向军俭, 郑文杰等. 钝顶螺旋藻富集转化硒及硒在藻体中的分布, 植物生理学通讯, 2001, 37(1): 12 ~ 14
- 3 左银虎. 环境与植物中硒形态研究进展, 植物学通报, 1999, 16(4): 378 ~ 380
- 4 黄 峙, 郑文杰, 郭宝江. 含硒生物大分子化合物研究进展, 海南大学学报(自然科学版), 2001, 19(2): 169 ~ 175

EFFECTS OF VARIOUS Se: S RATIOS ON Se-ORGANIZING AND CHEMICAL STATES AND VALENCES OF Se IN *Spirulina platensis*

HUANG Zhi¹ ZHENG Wenjie² XIANG Jurjian¹ YANG Hongyu¹ GUO Baojiang³
 (¹ Dept. of Bioengineering, ² Dept. of Chemistry, Ji Nan University, Guangzhou 510632)
 (³ Biotechnology Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Received: Jul. 26, 2001

Key Words: Se: S ratios, *Spirulina platensis*, Selenium, Organic-Se

Abstract

Effects of various Se: S ratios on Se-organizing in *Spirulina platensis* were investigated, Se contents, chemical states and various valences in Se-enriched *S. platensis* were determined also. The culture of *S. platensis* in the Zarrouk's media with different ratios of Se: S, i. e. 1.624, 0.812, 0.406, 0.203, 0.102, was prepared by adding Na₂SeO₃ and K₂SO₄. Results showed that there was no apparent effect on alga yield in the range of present experiment, but contents of both total-Se and organic-Se were the highest in culture conduction of 3.80 mmol/L selenium and Se: S in 0.812. In addition, 75% of total Se was organic-Se and the chemical state of inorganic-Se was mostly Se^{IV}.

(本文编辑:张培新)