

高古罗糖醛酸含量的萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)多糖细微结构研究

吴建东, 于广利, 王培培, 赵 峡, 杨 波, 台文静

(中国海洋大学 医药学院 糖科学与糖工程实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 将青岛产幼生和成熟期萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)提取分离得到多糖, 经 $^1\text{H-NMR}$ 分析, 表明其为高古罗糖醛酸含量的褐藻胶, 在对其 G/M 值分析基础上, 进一步对其二糖嵌段 F_{MM} , F_{MG} , F_{GM} , F_{GG} 和三糖嵌段 F_{GGG} , F_{GGM} , F_{MGM} , F_{MGG} 含量进行了比较分析。结果表明, 幼生和成熟期萱藻除了总糖含量不同外, 其褐藻胶细微结构也有显著差别。幼生与成熟期萱藻中 G/M 分别为 4.34 和 7.14, F_{GG} 含量分别为 73% 和 84%, F_{GGG} 含量分别为 68% 和 81%。成熟期萱藻中高含量多聚古罗糖醛酸是一种值得开发的多糖资源。

关键词: 萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)多糖; 聚古罗糖醛酸; 细微结构

中图分类号: Q949.28+8.3; R282.77 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2011)01-0040-04

褐藻胶(Alginate)是由甘露糖醛酸(Mannuronic acid, M)和古罗糖醛酸(Guluronic acid, G)组成的嵌段水溶性高分子, 主要来源于褐藻细胞壁, 由于其结构与藻种、产地以及生长季节有关, 使得褐藻胶细微结构差别很大。作为一种安全的生物功能高分子, 虽然褐藻胶在食品和化工中得到广泛应用, 但作为药物开发, 其细微结构研究十分重要^[1-4], 为了获得高含量甘露糖醛酸或者古罗糖醛酸的褐藻胶, 国内外一致从事褐藻新资源研究。

萱藻(*Scytosiphon lomentarius*)是我国沿海常见的藻种, 在山东半岛和辽东半岛广泛分布, 产量较小。但国内外学者已经对其中的部分活性成分进行了研究, 如 Demirel 等^[5]发现爱琴海产萱藻的二氯甲烷提取物有较强的抗氧化活性, 徐年军等^[6]发现萱藻的水提物能选择性抑制 L_{1210} 活性, 徐秀丽等^[7]发现萱藻的甲醇提取物对 B 淋巴细胞增殖有较好的抑制活性和免疫抑制活性。在萱藻多糖研究方面, 刘志峰等^[8]从萱藻中提取一种硫酸多糖, 发现其具有较好的抗凝血效果。关于萱藻中其他多糖的结构研究未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

萱藻(*Scytosiphon lomentarius*), 产地为青岛, 分别于 2008 年 2 月和 6 月采于青岛海边, 藻种均经中国海洋大学海洋生命学院宫相忠副教授鉴定。

各种葡聚糖系列分子质量标准品(788, 404, 212, 112, 47.3, 22.8 和 5.9 ku)购于日本 Shodex 公司; 乙醇、丙酮和盐酸等常规试剂为国产分析纯。

PL aquagel-OH mixed 不锈钢色谱柱(30 cm×7.5 mm×8 μm , 美国 Perkin Elmer 公司); 旋转蒸发器(R401 型, 瑞典 BUCHI 公司); 高效液相色谱仪(LC-20AD, 日本岛津公司); 红外光谱仪(Nicolet Nexus 470 型, Thermo Electron 公司); 核磁共振波谱仪(JNM-ECP600, 日本理光); 紫外可见分光光度计(UV-2102 PCS, 尤尼柯公司); 冷冻干燥仪(EZ50, 美国 FTS 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 多糖的提取^[9]

萱藻经水洗、烘干、粉碎后用乙醇脱脂, 经碳酸钠加热提取后精制, 分别获得幼生和成熟萱藻多糖。

1.2.2 分子量测定^[10]

采用 HPGPC 法测定多糖分子量。使用 PL aquagel-OH mixed 不锈钢色谱柱; 流动相为 0.2 mol/L NaNO_3 水溶液, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 流速 0.5 mL/min, 示差检测器。将已知分子质量的葡聚糖系列标准品

收稿日期: 2010-01-27; 修回日期: 2010-05-25

基金项目: 国际合作项目(2007DFA30980); 国家自然科学基金项目(30870506)

作者简介: 吴建东(1985-), 男, 山东文登人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋糖药物; 于广利, 通信作者, 电话: 0532-82031560; E-mail: glyu@ouc.edu.cn

及多糖样品用流动相配成 5 g/L 的溶液, 以标准多糖分子质量的对数($\log M_w$)对保留时间(t_R)作图, 得标准曲线($\log M_w = 14.8636 - 0.6837 t_R$; $R^2 = 0.998$), 计算多糖相对分子质量。

1.2.3 红外光谱(IR)分析^[11]

样品用 P_2O_5 干燥 48 h, 取 1 ~ 2 mg 经 KBr 压片, 测定红外光谱, 扫描范围为 400 ~ 4 000 cm^{-1} 。

1.2.4 1H -NMR 分析

参照 Grasdalen 等^[12-13]方法, 将样品用稀盐酸轻微解聚, 即 0.1% 水溶液, pH 3, 于 100 $^{\circ}C$ 水解 1 h。将水解液中和, 旋转浓缩, 40 $^{\circ}C$ 氮吹仪吹干, D_2O 交换 3 次, 在超导核磁共振波谱仪(ECP 600 MHz)于 80 $^{\circ}C$ 测定。

2 结果与讨论

2.1 多糖的提取

萱藻用水洗去盐类、泥沙等杂质, 晒干后 40 $^{\circ}C$ 烘干至恒重, 粉碎, 过 40 目筛。萱藻碎沫加入 10 V 85% 乙醇, 80 $^{\circ}C$ 水浴脱脂 4 h, 重复操作 3 次, 离心, 残渣 40 $^{\circ}C$ 烘干。脱脂海藻加入 10 V 蒸馏水, 80 $^{\circ}C$ 搅拌提取 4 h, 离心, 重复操作 3 次。水提后的藻体残渣, 40 $^{\circ}C$ 烘干后, 加入 10 V 的 2% Na_2CO_3 溶液 80 $^{\circ}C$ 提取 4 h, 离心, 重复操作 3 次。合并滤液, 用 4 mol/L 盐酸调节 pH 8。旋转蒸发浓缩, 加入 95% 乙醇使其终浓度达到 30%, 4 $^{\circ}C$ 静置过夜, 离心取沉淀。将沉淀溶解, 用 30% 的乙醇重新醇沉, 沉淀依次用无水乙醇和丙酮脱水, 40 $^{\circ}C$ 烘干, 得幼生萱藻多糖(ISA)和成熟萱藻多糖(MSA)。

经 HPGPC 测定 ISA 和 MSA 得相对分子质量(M_r)分别为 86 ku 和 50 ku。

2.2 萱藻褐藻胶细微结构研究

褐藻胶是由 β -1,4-*D*-甘露糖醛酸(M)和 α -1,4-*L*-

古罗糖醛酸(G)组成, 分子中含有均聚 M、均聚 G 以及杂聚 MG 3 种嵌段结构。甘露糖醛酸和古罗糖醛酸残基是 C5 差向异构体, 结构上只有羧基位置不同, 但是它们的构型和化学性质有着非常大的差别。甘露糖醛酸是 4C_1 构型并以平伏键连接; 而古罗糖醛酸是 1C_4 构型以竖直键相连接。聚甘露糖醛酸结构具有柔性, 但聚古罗糖醛酸具有一定刚性, 这些结构特点使其在食品和医药等领域具有不同的作用。

经过 IR(图略)分析表明, 2 种多糖是褐藻胶且古罗糖醛酸含量较高。采用 1H -NMR(图 1)可以精确地表征褐藻胶中单糖组成及其双聚(GG, GM, GM, MM)和三聚嵌段(GGG, GGM, MGM, MGG)含量, 从而反映出褐藻胶的嵌段细微结构, 为其构效关系研究提供理论依据。经过分析表明, 萱藻中褐藻胶主要是多聚古罗糖醛酸, 5.02 为异头碳 H1 信号, 4.4 为均聚 GG 的 H5 信号峰; 当 G 两边均相邻 M 时(MGM), 其化学位移为 4.73, 当 G 两边分别相邻 G 和 M 时(GGM), 其化学位移为 4.75; 均聚 M 的异头碳质子信号为 4.62, 当 M 与 G 相连时(MG), 其化学位移为 4.65。

从图 1 可知, 幼生和成熟萱藻褐藻胶中古罗糖醛酸含量均非常高。结合 1H -NMR 数据并根据 Grasdalen 的计算公式, 可以得到单糖 F_M 和 F_G , 二糖 F_{MM} , F_{MG} , F_{GM} 和 F_{GG} 以及相邻三糖 F_{MGM} , F_{MGG} , F_{GGM} , F_{GGG} 嵌段的摩尔比例, 相关数据见表 1。由表 1 可知, 幼生和成熟期萱藻的 F_G 含量均很高, 均大于 0.8, 远远高于报道过的海带和马尾藻($F_G = 0.35 \sim 0.45$)^[14-15], 成熟萱藻中 GG 和 GGG 的比例明显大于幼生萱藻, 而 M 含量明显变小, 特别是 GGM 和 MGG 的比例较低, 说明均聚 G 段比例高而杂合 M 的比例小。由于两种多糖中的均聚 G 含量都很高, 和二价金属离子结合能力强, 凝胶强度大, 该特点不仅适合于去除有毒金属离子, 而且在含钙食品中有特殊用途。高聚

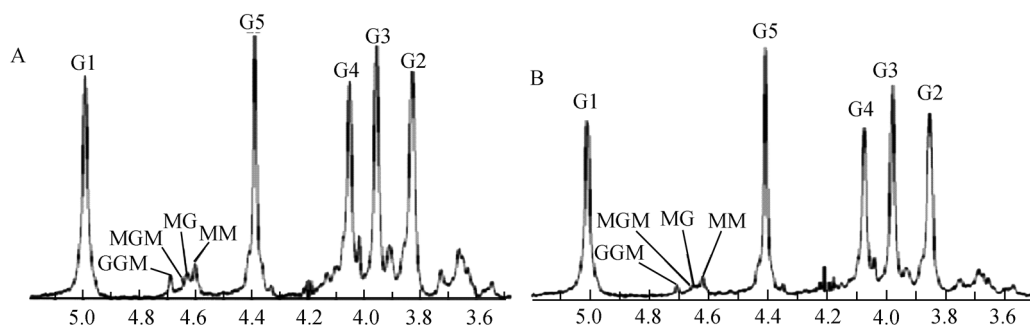


图 1 幼生与成熟萱藻褐藻胶 1H -NMR 图谱

Fig. 1 1H -NMR spectra of alginates from immature (A) and mature (B) *Scytosiphon lomentarius*

表 1 幼生和成熟期萱藻褐藻胶精细结构比较

Tab. 1 Comparison of fine structures of alginates from immature and matured *Scytosiphon lomentarius*

样品	单糖比例			二糖嵌段比例				三糖嵌段比例			
	F _M	F _G	G/M	F _{MM}	F _{MG}	F _{GM}	F _{GG}	F _{MGM}	F _{MGG}	F _{GGM}	F _{GGG}
ISA	0.19	0.81	4.26	0.11	0.08	0.08	0.73	0.03	0.05	0.05	0.68
MSA	0.12	0.88	7.33	0.08	0.04	0.04	0.84	0.02	0.02	0.02	0.81

古罗糖醛酸含量多糖是一种性能优良的生物材料,将在食品、医药和印染行业中有很大的开发应用价值^[14-17]。

2.3 褐藻胶嵌段分布研究^[18-19]

由于褐藻胶是嵌段化合物,所以多采用嵌段分布参数 η 来表征 G 和 M 的嵌段分布情况,即 $\eta = F_{MG} / (F_M \times F_G)$ 。 η 值的意义为 $0 < \eta < 1$, 表示 M,G 排列以均聚嵌段为主; $\eta = 1$, 表示 M,G 排列为无规序列; $1 < \eta < 2$, 表示 M,G 排列为交替嵌段为主。通过比较 η 值的大小,即可得到两种萱藻褐藻胶中 M, G 的结构信息。由公式可得, ISA 和 MSA 的 η 值分别为 0.52 和 0.38。结果表明,不同时期萱藻褐藻胶皆为均聚嵌段结构,成熟期均聚程度明显高于幼稚期,是一种理想的均聚古罗糖醛酸资源。

3 结论

以青岛产两种不同生长期的萱藻为材料并从中提取多糖,通过 ¹H-NMR 方法确定其为褐藻胶,并进一步测定了其单糖组成及其细微结构,表明萱藻多糖是一种高古罗糖醛酸含量的褐藻胶,而且随着萱藻的成熟,G 含量显著增加并高达 88%,这是目前发现的天然海藻中聚古罗糖醛酸含量最高的藻种。该发现为以萱藻为原料直接提取高含量和高分子质量聚古罗糖醛酸提供了依据,也为萱藻的大规模养殖,以及对该藻种进行品种改良提供了重要参考。

参考文献:

[1] Grant G, Morris E, Rees D, et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg box model [J]. FEBS Letters, 1973, 32(1): 195-198.
 [2] Grasdalen H, Larsen B, Smisrod O, et al. A PMR study of the composition and sequence of urinate residues in alginates [J]. Carbohydr Res, 1979, 68: 23-31.
 [3] Haug A, Larsen B. Biosynthesis of alginate, Part II: polymannuronic acid 1,5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* [J]. Carbohydr Res, 1971, 17: 297-308.
 [4] Salomonsen T, Jensen H, Larsen F, et al. Direct quantification of M/G ratio from 13C CP-MAS NMR spectra

of alginate powders by multivariate curve resolution [J]. Carbohydr Res, 2009, 15: 2 014-2 022.
 [5] Demirel Z, Yilmaz-koz F, Karabay-yavasoglu U. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea [J]. Journal of the Serbian Chemical Society, 2009, 74(6): 619-628.
 [6] 徐年军, 范晓, 韩丽君, 等. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(4): 407-413.
 [7] 徐秀丽, 范晓, 宋福行, 等. 中国经济海藻提取物生物活性[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(1): 55-63.
 [8] 刘志峰, 宫晓黎, 魏淑贞, 等. 五种海藻多糖体外抗血小板聚集作用的观察[J]. 中国海洋药物, 2001, 2: 36-38.
 [9] 马世昱, 刘峥, 王勤, 等. 羊栖菜中褐藻糖胶的组分分离及分析[J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 20-23.
 [10] 王培培, 于广利, 杨波, 等. 选育羊栖菜与野生羊栖菜中褐藻胶与褐藻糖胶组成分析[J]. 中国海洋药物, 2009, 28: 39-43.
 [11] 嵇国利, 于广利, 吴建东, 等. 爆发期条浒苔多糖的提取分离及其理化性质研究[J]. 中国海洋药物, 2009, 28: 7-12.
 [12] Grasdalen H, Larsen B, Smisrod O. ¹³C-n.m.r. studies of monomeric composition and sequence in alginate [J]. Carbohydr Res, 1981, 2: 179-191.
 [13] Grasdalen H. High-field, ¹H-n.m.r.spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations[J]. Carbohydr Res, 1983, 118: 244-260.
 [14] 黄来发, 洪文生. 食品增稠剂[M]. 中国轻工业出版社, 2000: 25-26.
 [15] 金骏, 林美娇. 海藻利用与加工[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
 [16] 蒋新国, 海藻酸钠的分子量与缓释作用[J]. 药学学报, 1994, 29(4), 306-310.
 [17] 朱思明, 于淑娟, 彭志英, 等. 海藻酸(盐)的生产、应用及研究现状[J]. 2003, 6: 61-65.
 [18] 郑乃余, 张燕霞. 海带和马尾藻中褐藻胶的糖醛酸组成与序列结构的研究[J]. 海洋与湖沼 1992, 23: 445-453.
 [19] Zheng naiyu, Zhang Yanxia, Fan Xiao, et al. Effects of composition and structure of alginates on adsorption of divalent metals [J]. Chin J Oceanol Limnol., 1994, 12(1): 78-83.

Fine structures of guluronic acid-rich algininate from *Scytosiphon lomentarius*

WU Jian-dong, YU Guang-li, WANG Pei-pei, ZHAO Xia, YANG Bo, TAI Wen-jing
(School of medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jan., 27, 2010

Key words: *Scytosiphon lomentarius* polysaccharide; polyguluronic acid; fine structure

Abstract: The guluronic acid- rich alginate, extracted from immature and mature *Scytosiphon lomentarius*, were studied by $^1\text{H-NMR}$. Based on the G/M ratio analysis, the disaccharide fragments (F_{MM} , F_{MG} , F_{GM} , and F_{GG}) and trisaccharide fragments (F_{GGG} , F_{GGM} , F_{MGM} and F_{MGG}) were further analyzed with $^1\text{H-NMR}$, respectively. The result shows that the total contents of guluronic acid and the fine structure of polysaccharides in immature and mature *S. lomentarius* were different. The G/M ratio were 4.34 and 7.14, F_{GG} ratio 0.73 and 0.84, and the F_{GGG} ratio 0.68 and 0.81 in the immature and mature *S. lomentarius*, respectively. The mature *S. lomentarius* that has a high content of polyguluronic acid is a good resource for polysaccharide extraction.

(本文编辑: 康亦兼)

(上接第 9 页)

The filtration rate of juvenile *Solen grandis* Dunker

WU Yang-ping, CHEN Ai-hua, YAO Guo-xing, ZHANG Zhi-wei, WU Jian-ping
(Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China)

Received: Jul., 16, 2010

Key words: *Solen grandis*; filtration rate; sizes; diet species; diet density; temperature

Abstract: The effects of temperature, diets, diet density, and sizes on the filtration rate of *Solen grandis* were studies in a laboratory system from October to November 2008. It was found that the filtration rate of five species microalgae was increased with microalgae density increasing at the optimum microalgae density. The relationship between filtration rates and individual weight followed an exponential correlation, $R_F=13.029W_D^{0.7309}$ ($R^2 = 0.9988$). In addition, the filtration rate was increased with the increase of temperature, but was decreased if the temperature exceeded 23 °C, at which the filtration rate reached the maximum of (1.38 ± 0.01) ml/(ind · min).

(本文编辑: 梁德海)