

中国江蓠属红藻所含琼胶的结构特征*

纪明侯

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

M. Lahaye, W. Yaphe

(麦吉尔大学, 蒙特利尔, 加拿大)

提要 用分级法和 ^{13}C -NMR 研究了从中国产江蓠属红藻(真江蓠、细基江蓠、芋根江蓠和凤尾菜)提取的6份琼胶多糖的结构特征。这些琼胶主要由用 0.5mol/L 和 1.0mol/L NaCl 从 DEAE-Sephadex A 50 层析柱洗脱下的带电荷的琼胶糖分子组成。 6.0mol/L 尿素级分是带低电荷密度的琼胶糖分子。各级分总得率达 80% 或以上。 ^{13}C -NMR 谱图表明各种江蓠琼胶的主要级分基本上由琼胶糖结构构成, 但有的级分中琼胶糖含微量 $6\text{-SO}_4\text{-L-半乳糖}$, 真江蓠和细基江蓠的琼胶糖含有 $6\text{-OCH}_3\text{-D-半乳糖}$, 而凤尾菜琼胶中则主要含有 $2\text{-OCH}_3\text{-3, 6-内醚-L-半乳糖}$ 。真江蓠和凤尾菜的个别级分的琼胶酶降解产物与 ^{13}C -NMR 分析结果相一致。

琼胶 (agar), 是从某些红藻的细胞壁中经热水提取出来的具有共同骨架结构的多糖。1922年 Samec 等^[20]将琼胶进行甲基化或乙酰化处理, 产物能溶于氯仿者称为琼胶糖 (agarose), 不溶物称为硫酸琼胶 (agarpectin)。后来, 经过荒木等^[4]对石花菜琼胶的系统研究, 确定了琼胶糖是由 C1,3 连接的 $\beta\text{-D-半乳糖}$ 与 C1,4 连接的 3,6-内醚- $\alpha\text{-L-半乳糖}$ 组成的琼二糖 (agarobiose) 重复单位连接而成的直链聚合物 (图 1:II); 而硫酸琼胶基本上也是琼胶糖骨架所构成, 但有些 3,6-内醚-L-半乳糖被硫酸基-L-半乳糖取代, 并且有的 D-半乳糖被丙酮酸乙缩醛 4,6-O-(1-羧亚乙基)-D-半乳糖取代。这样, 对石花菜、伊谷草^[3]、鸡毛菜^[26]、江蓠^[27] 等所含琼胶的化学研究基本上证实琼胶糖为琼胶的主要构成骨架。琼胶糖的凝固能力比较强, 是决定琼胶质量的重要组分。

近来, Duckworth 等^[10]将琼胶于 DEAE-Sephadex A50 层析柱上用水和离子强度递增的 NaCl 溶液进行洗脱分级, 结果表明, 琼胶不只是由琼胶糖和硫酸琼胶组成, 而且是由一系列连续的多糖, 即由中性琼胶糖到含丙酮酸和少量硫酸基的酸性琼胶糖的混合多糖组成。硫酸基主要结合在 L-半乳糖的 C6 上 (图 1:I), 在专性酶^[18]或碱^[19]的作用下, 可转变成 3,6-内醚-L-半乳糖。D-半乳糖单位部分地被 6-O-甲基-半乳糖取代, 它分布在从中性直至带高电荷的整个区域中。这种分级方法能将具不同电荷的琼胶分子分离开来, 对进一步研究琼胶的化学结构是很有意义的。其后, YCOB 等^[28]、Friedlander 等^[11] 都曾用

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1266 号。

本工作系 1983 年春于加拿大 McGill 大学完成的。在工作中得到加拿大国家科学和工程研究委员会 (NSERC) 的资助; Montreal 大学协助作 ^{13}C -NMR 光谱分析; 中国科学院海洋研究所王玉君和徐祖洪协助琼胶样品制备; 刘思俭、伍龙畅提供南方真江蓠和细基江蓠; 在此一并表示感谢。

收稿日期: 1983 年 12 月 23 日。

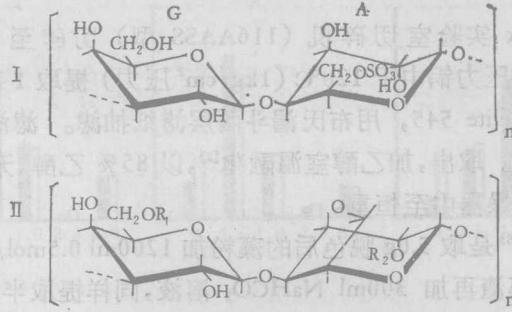


图1 几种琼胶糖分子及其生物前体的重复单位

I. β -C1,3-D-半乳糖与 α -C1,4-6-硫酸基-L-半乳糖连接的二糖, 即琼胶糖分子的基本重复单位的生物前体;

II. β -C1,3-D-半乳糖与 α -C1,4-3,6-内醚-L-半乳糖连接的琼二糖, 即琼胶糖分子的基本重复单位。

$R_1 = R_2 = H$: 琼胶糖分子的重复单位; $R_1 = CH_3, R_2 = H$: 6-OMe-琼胶糖分子; $R_1 = H, R_2 = CH_3$: 2-OMe-琼胶糖分子。

此分级法, 而 Izumi^[14] 则用 Dowex-1 \times 2 分级法研究过红藻多糖的结构特点。已证实 ^{13}C -NMR 光谱在研究琼胶的结构中是比较快和有用的技术^[22]。

中国沿海拥有丰富的红藻资源, 如石花菜、江蓠等已用作琼胶生产原料。本文对中国沿海生长的 4 种江蓠(6 份样品)琼胶用阴离子层析法进行了分级, 测定了各级分的得率分布和化学成分, 并对个别级分用 ^{13}C -NMR 光谱法辅以酶解产物鉴定, 阐述了这几种江蓠合成的琼胶聚合物中主要类型的重复单位。

实验材料与方法

1. 海藻样品

(1) 真江蓠¹⁾ *Gracilaria asiatica* (Zhang et Xia), 雌性配子体, 于 1982 年 4 月采自广东省湛江。

(2) 真江蓠¹⁾ *Gracilaria asiatica* (Zhang et Xia), 四分孢子体, 于 1982 年 4 月采自广东省湛江。

(3) 真江蓠¹⁾ (*Gracilaria asiatica* Zhang et Xia), 于 1982 年 6 月采自山东省青岛。

(4) 细江蓠 (*Gracilaria tenuistipitata* C. F. Chang et B. M. Xia), 于 1982 年 3 月采自广东省海南岛。

(5) 芋根江蓠 (*Gracilaria blodgettii* Harv.), 于 1981 年 3 月采自广东省海南岛。

(6) 凤尾菜 (*Gracilaria eucheumoides* Harv.), 于 1959 年采自广东省海南岛。

2. 海藻的前处理^[6]

称取 10.0g 剪细的干海藻, 加 200ml 60% 丙酮溶液浸泡一夜, 倾出, 再加入 100ml 丙酮, 摇动 1 小时。继而加 300ml 80% 乙醇, 于热水浴中回流 1 小时, 再加 200ml 无水乙醇回流半小时。然后以乙醚洗涤, 吹干, 放 P_2O_5 , 真空干燥器中至恒重。

1) 过去曾误订为江蓠 (*Gracilaria verrucosa* Huds.) Papenfuss, 现已改为本名^[21]。

3. 琼胶的提取

将上述藻块以 Apex 实验室切碎机 (116AASS 型) 切碎至 40 目。称取 5.0g 加 375ml 水浸泡一昼夜, 放压力锅中于 120°C (1kg/cm² 压力) 提取 1 1/2 小时, 以尼龙布过滤。滤液中加入适量 Celite 545, 用布氏漏斗两层滤纸抽滤。滤液放冷后切成条, 放冰箱中 -10°C 冻结两昼夜。取出, 加乙醇室温融化^[1], 以 85% 乙醇、无水乙醇和乙醚依次洗涤脱水, 放 P₂O₅ 真空干燥器中至恒重。

凤尾菜琼胶的制备^[6]是取 5.0g 脱色后的藻粉加 1200ml 0.5mol/L NaHCO₃ 溶液, 于 90°C 提取 1 1/2 小时, 藻渣再加 300ml NaHCO₃ 溶液, 同样提取半小时, 同上法过滤。滤液中加入适量 2% CPC (十六烷氯化吡啶) 水溶液, 生成的沉淀经离心后以乙酸钠饱和的 95% 乙醇, 95% 乙醇和乙醚依次洗涤, 放 P₂O₅ 真空干燥器中。

4. 琼胶的分级

参照 Duckworth 等^[9]的分级方法, 称取 0.50g 琼胶加 200ml 水, 煮沸使全溶, 以保温压滤器过滤。滤液分多次加入 DEAE-Sephadex A 50 (Cl⁻) (Pharmacia, 40—120μm) 柱 (φ1.5 × 38cm) 中。柱保温在 70°C。样品加完后, 依次以水, 0.5mol/L, 1.0mol/L 和 2.5mol/L NaCl 溶液洗脱。每种洗脱液的用量以苯酚-硫酸法检查流出液无糖为止。以 2.5mol/L NaCl 液洗脱完毕后, 将柱内 Sephadex 凝胶移出, 加入 50ml 6.0mol/L 尿素溶液^[6], 煮沸 10 分钟, 压滤。各级分洗脱液经定体积后均以苯酚-硫酸法测定糖含量。然后将含盐各级分减压浓缩、透析、冻干、称重。

5. 化学分析

(1) 总糖: 用 Dubois 等^[7]的苯酚-硫酸法以半乳糖为标准测定。

(2) 3,6-内醚-半乳糖(以下简称 3,6-AG): 根据 Yaphe 等^[25]的方法以果糖为标准测定。

(3) 硫酸基: 按照 Tabatabael 的方法^[21]以氯化钡-骨胶溶液与硫酸基反应, 生成硫酸钡以比浊法测定 SO₄ 含量。

6. ¹³C-NMR 光谱

将琼胶级分溶于加热的 D₂O 中 (约 4%, W/V), 以 3μm 滤膜过滤。用 Bruker BZH-400/50 光谱仪, 样品放于 100.62 MHz 磁场中 (谱线宽度 20,000 Hz, 松弛时间 0.4s), 于 80°C 扫描 1200—4780 次, 记录了质子去偶的 ¹³C-NMR 谱图。化学位移 δ 对内标 (DMSO) 以 ppm 表示, 换算成相对于外标 TMS 的值。

7. 琼胶的酶降解

用假单胞菌 *Pseudomonas atlantica* 分离的 β-琼胶酶, 基本上按照 Duckworth 等^[8]的方法, 对琼胶的个别级分进行了降解。然后取其乙醇可溶部分经过 Sephadex G-25 柱分离, 洗脱液进行了薄层色谱检查, 由斑点 R_{fa} 值 (还参考了 YCOB 等^[29]的资料) 辨别了酶解产物寡糖的种类。

实 验 结 果

1. 层析柱分级

用 DEAE-Sephadex A 50 层析柱对 6 份江蓠属红藻的琼胶进行分级, 各级分的得率

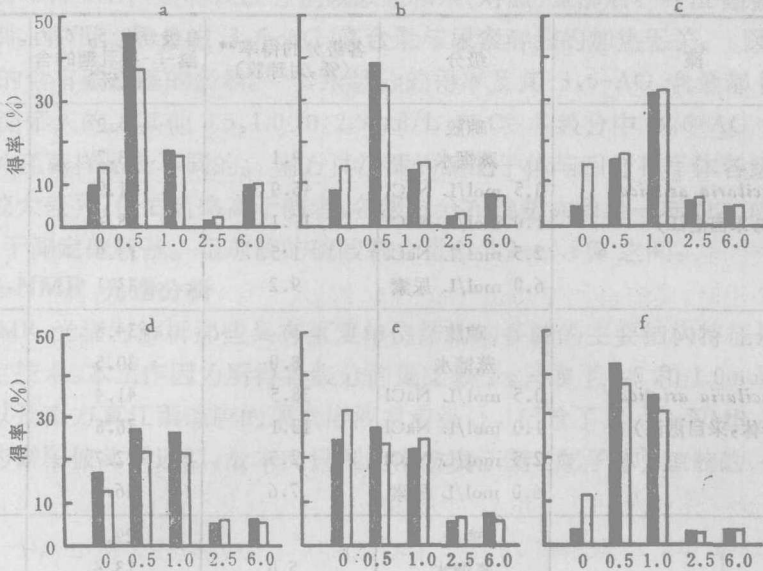


图 2 几种江蓠琼胶由 DEAE-Sephadex A 50 层析柱上洗脱下的各级分的得率分布图

A. 真江蓠琼胶(藻体为配子体, 湛江采); B. 真江蓠琼胶(藻体为四分孢子体, 湛江采); C. 真江蓠琼胶(藻体为青岛采); D. 细基江蓠琼胶; E. 芋根江蓠; F. 凤尾菜 CPC 沉淀的琼胶。

洗脱液顺序: 水(W), 0.5mol/L NaCl (0.5), 1.0mol/L NaCl (1), 2.5mol/L NaCl (2.5), 6.0mol/L 尿素(6)。

黑框: 以苯酚-硫酸比色法测得的碳水化合物得率;

空框: 实际重量得率

分布如图 2。

从图 2 可看到, 4 种 (6 份) 江蓠琼胶的多数级分的重量得率与从比色得到的碳水化合物得率基本上相一致。但水洗脱级分的重量得率大多比比色得率较高, 这反映在原始琼胶中有某些其他中性化合物存在, 影响 Dubois 比色测定。琼胶主要由带电荷的多糖组成, 可用 0.5 或 1.0mol/L NaCl 溶液由 DEAE-Sephadex A 50 洗下。南方真江蓠的雌配子体和四分孢子体两者的各级分分布图形基本相似, 都是以 0.5mol/L NaCl 洗脱级分为主, 但北方真江蓠的琼胶中以 1.0mol/L NaCl 级分为主。真江蓠的水级分与 6.0mol/L 尿素级分的得率大致相近。南方产芋根江蓠和细基江蓠两者的级分分布图形有些近似, 其中性琼胶糖(水级分)和带电荷琼胶糖(0.5 和 1.0 mol/L NaCl 级分)的得率都较高。南方产凤尾菜的 CPC 沉淀琼胶则以 0.5 和 1.0mol/L NaCl 级分为主要组分, 而水和 0.5 mol/L 级分极少。各江蓠琼胶的尿素级分, 是 2.5mol/L NaCl 洗脱完后, 从柱取出 Sephadex 凝胶, 加 6.0mol/L 尿素溶液煮沸而洗下的, 得率为 4—9%。

2. 化学分析

从表 1 的化学分析结果看, 总的说来, 各级分中 3,6-AG 含量随着洗脱液离子强度的增高而减少, 硫酸基含量则逐增。除细基江蓠的水级分中 3,6-AG 含量比原琼胶中的含量较高外, 其余各样品的水级分中的含量都低于原琼胶, 而含量较高的却是 0.5mol/L NaCl 级分(本来水级分应为具有很高结构规则性的琼胶糖分子), 这表明, 水级分中琼胶分

表 1 几种江蓠琼胶由 DEAE-Sephadex A 50 层析柱上洗脱下的各级分的化学分析

| 海 藻 | 级分 | 各级分的得率** (%,对琼胶) | 各级分中 3, 6-内 醚-L-半乳糖的含 量(%) | 各级分中 SO ₄ 含量*(%) |
|--|----------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 真江蓠 (<i>Gracilaria asiatica</i>) (配子体,采自湛江) | 琼胶 | | 35.2 | 5.0 |
| | 蒸馏水 | 9.1 | 23.2 | — |
| | 0.5 mol/L NaCl | 45.9 | 31.9 | 3.7 |
| | 1.0 mol/L NaCl | 17.1 | 18.4 | — |
| | 2.5 mol/L NaCl | 1.5 | 13.9 | — |
| | 6.0 mol/L 尿素 | 9.2 | 43.1 | — |
| 真江蓠 (<i>Gracilaria asiatica</i>) (四分孢子体,采自湛江) | 琼胶 | | 34.8 | 3.9 |
| | 蒸馏水 | 8.0 | 30.5 | — |
| | 0.5 mol/L NaCl | 38.5 | 41.4 | 2.9 |
| | 1.0 mol/L NaCl | 13.1 | 26.8 | 8.5 |
| | 2.5 mol/L NaCl | 2.5 | 22.7 | — |
| | 6.0 mol/L 尿素 | 7.6 | 46.5 | 2.4 |
| 真江蓠 (<i>Gracilaria asiatica</i>) (采自青岛) | 琼胶 | | 29.6 | 3.8 |
| | 蒸馏水 | 5.0 | 13.6 | — |
| | 0.5 mol/L NaCl | 15.2 | 29.8 | 4.4 |
| | 1.0 mol/L NaCl | 31.4 | 28.9 | 6.7 |
| | 2.5 mol/L NaCl | 5.6 | 17.3 | 7.3 |
| | 6.0 mol/L 尿素 | 4.7 | 42.2 | — |
| 细基江蓠 (<i>Gracilaria tenuistipitata</i>) (采自海南岛) | 琼胶 | | 25.1 | — |
| | 蒸馏水 | 16.8 | 35.5 | — |
| | 0.5 mol/L NaCl | 27.6 | 25.7 | 3.6 |
| | 1.0 mol/L NaCl | 26.4 | 16.3 | — |
| | 2.5 mol/L NaCl | 5.3 | 18.8 | — |
| | 6.0 mol/L 尿素 | 6.6 | 34.9 | — |
| 芋根江蓠 (<i>Gracilaria blodgettii</i>) (采自海南岛) | 琼胶 | | 26.0 | 6.8 |
| | 蒸馏水 | 24.4 | 23.4 | — |
| | 0.5 mol/L NaCl | 27.5 | 34.1 | 3.4 |
| | 1.0 mol/L NaCl | 22.8 | 17.4 | — |
| | 2.5 mol/L NaCl | 5.4 | 20.0 | 10.0 |
| | 6.0 mol/L 尿素 | 7.2 | 32.0 | — |
| 凤尾菜 (<i>Gracilaria eucheumoides</i>) (采自海南岛) | CPC 沉淀的琼胶 | | 22.8 | 3.2 |
| | 蒸馏水 | 2.4 | 3.5 | — |
| | 0.5 mol/L NaCl | 43.2 | 28.6 | 6.3 |
| | 1.0 mol/L NaCl | 34.9 | 24.0 | — |
| | 2.5 mol/L NaCl | 3.1 | 21.4 | — |
| | 6.0 mol/L 尿素 | 4.0 | 33.3 | — |

* 某些级分因得率不高,或因分析别项,故未能全作 SO₄ 测定。

** 碳水化合物比色得率。

子的不规则性或者是带入其他热水可溶中性多糖或含氮化合物。尿素级分的 3,6-AG 含量在 33—47% 之间,表明这个级分的琼胶分子具有高度的结构规则性。当 Sephadex 凝胶以尿素溶液煮沸时 pH 逐增至 8,是否会导致 L-半乳糖的 C6 上的硫酸基在此碱性下被

游离而形成 3,6-AG? 当将琼胶分别以尿素和水(对照)煮沸后, 并没有观察到 3,6-AG 含量的差别, 说明此级分的 3,6-AG 高含量与尿素溶液的加热无关。凤尾菜琼胶是加 CPC 沉淀的含有硫酸基的多糖。其水级分的得率及其 3,6-AG 含量都低, 它们是同 CPC 共沉淀带入的。其他 0.5, 1.0 和 2.5mol/L NaCl 各级分中 3,6-AG 含量大致相近, 这与其他种江蓐样品是不同的。南方真江蓐的雌配子体与四分孢子体各级分的 3,6-AG 含量没有较大差异, 但后者略高于前者, 各级分布趋势大致是一样的。有的级分得率比较低, 不足以测定硫酸基。粗琼胶的硫酸基含量在 3.2—6.8% 之间。

3. ^{13}C -NMR 光谱分析

^{13}C -NMR 光谱对解析那些具有重复单位结构的多糖的主要结构特征是一个简便而快速的测定技术。本工作因为所得各级分的量比较少, 只取了 0.5 和 1.0mol/L NaCl 主要洗脱级分以及南方真江蓐琼胶的尿素溶液煮沸级分, 记录了其 ^{13}C -NMR 谱图。因为有一些样品的谱图彼此很近似, 故本文只列出南方真江蓐(配子体)琼胶的 0.5mol/L NaCl

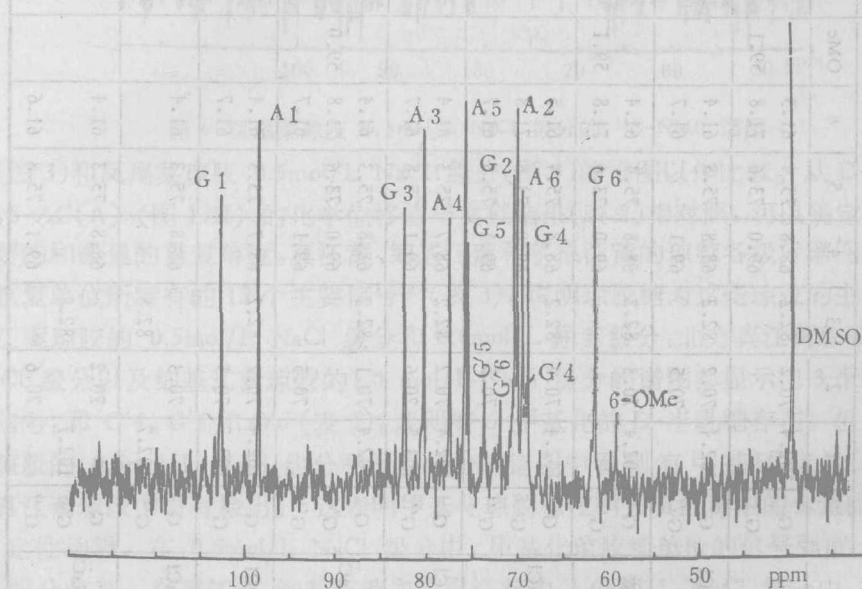


图3 真江蓐(配子体, 湛江采)琼胶 0.5 mol/L NaCl 级分的 ^{13}C -NMR 谱图

表2 几种琼胶糖和硫酸半乳糖的各碳原子的 ^{13}C -NMR 化学位移文献值 (ppm, 相对于 TMS)

| 琼胶糖与硫酸半乳糖胶 | G(D-半乳糖) | | | | | | | A(3,6-内醚-L-半乳糖) | | | | | | | | |
|---|----------|-------|------|------|------|------|------|------------------|------|-------|------|------|------|------|------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | OCH ₃ | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | OCH ₃ |
| 琼胶糖 (agarose) ^[23] (图 1:II) | G | 102.4 | 70.1 | 82.2 | 68.4 | 75.3 | 61.4 | | A | 98.4 | 69.8 | 80.1 | 77.4 | 75.6 | 69.3 | |
| 6-OCH ₃ -琼胶糖 ^[23] (图 1:II) | G' | 102.4 | 70.1 | 82.2 | 68.6 | 73.6 | 71.8 | 59.1 | A | 98.4 | 69.8 | 80.1 | 77.4 | 75.6 | 69.3 | |
| 2-OCH ₃ -琼胶糖 ^[22] (图 1:II) | G'' | 102.6 | 70.2 | 82.7 | 68.7 | 75.6 | 61.4 | | A'' | 98.7 | 78.8 | 78.4 | 77.6 | 75.3 | 69.8 | 59.1 |
| β -Cl, 3-D-半乳糖与 α -Cl, 4-6-硫酸基-L-半乳糖联接 的重复二糖 ^[23] (图 1:I) | G''' | 103.7 | 70.5 | 81.1 | 69.1 | 75.9 | 61.8 | | A''' | 101.2 | 69.8 | 71.0 | 79.0 | 67.7 | 67.5 | |

表 3 琼胶级分中各碳原子的 ^{13}C -NMR 化学位移 (ppm, 相对于 TMS)

| 琼 胶 级 分 | G(D-半乳糖) | | | | | | A(3,6-内醚-L-半乳糖) | | | | | | | | |
|--|----------|-------|------|------|------|------|-----------------|------|------|-------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | OMe | | | |
| 真江蒿 (<i>Gracilaria asiatica</i>) 0.5 mol/L NaCl 配子体, 南方湛江采 | G | 102.4 | 70.2 | 82.2 | 68.8 | 75.4 | 61.5 | A | 98.2 | 70.0 | 80.1 | 77.3 | 75.6 | 69.2 | |
| | G' | | | | 69.0 | 73.6 | 71.8 | 59.1 | | | | | | | |
| 真江蒿 (<i>Gracilaria asiatica</i>) 1.0 mol/L NaCl 配子体, 南方湛江采 | G | 102.4 | 70.2 | 82.2 | 68.8 | 75.3 | 61.4 | A | 98.2 | 69.9 | 80.1 | 77.3 | 75.6 | 69.4 | |
| | G''' | | 70.5 | | 69.1 | | 61.7 | | A''' | 101.3 | 71.0 | | 67.5 | | |
| 真江蒿 (<i>Gracilaria asiatica</i>) 6.0 mol/L 尿素 配子体, 南方湛江采 | G | 102.4 | 70.3 | 82.2 | 68.8 | 75.4 | 61.4 | A | 98.2 | 69.9 | 80.1 | 77.4 | 75.6 | 69.4 | |
| | G' | | | | 69.0 | 73.6 | 71.8 | 59.1 | | | | | | | |
| 真江蒿 (<i>Gracilaria asiatica</i>) 0.5 mol/L NaCl 北方青岛采 | G | 102.4 | 70.2 | 82.2 | 68.8 | 75.4 | 61.5 | A | 98.2 | 69.9 | 80.1 | 77.4 | 75.7 | 69.4 | |
| | G' | | | | 69.0 | 73.6 | 71.8 | | A''' | 101.1 | | | | | |
| | G''' | | 70.5 | | 69.1 | 75.8 | 61.7 | | | | | | | | |
| 真江蒿 (<i>Gracilaria asiatica</i>) 1.0 mol/L NaCl 北方青岛采 | G | 102.4 | 70.2 | 82.2 | 68.7 | 75.3 | 61.4 | A | 98.1 | 69.9 | 80.1 | 77.3 | 75.6 | 69.3 | |
| | G'' | 103.5 | 70.6 | | 69.1 | 75.8 | 61.7 | | A''' | | 70.8 | | 67.5 | | |
| | G''' | | | | | | | | | | | | | | |
| 细基江蒿 (<i>Gracilaria tenuispirata</i>) 1.0 mol/L NaCl 南方海南岛采 | G | 102.4 | 70.1 | 82.2 | 68.8 | 75.3 | 61.4 | A | 98.2 | 69.9 | 80.1 | 77.3 | 75.6 | 69.4 | |
| | G' | | | | 69.0 | 73.6 | 71.8 | 59.0 | | | | | | | |
| | G''' | | 70.5 | | 69.1 | | 61.7 | | A''' | 101.1 | 70.8 | | | | |
| 芋根江蒿 (<i>Gracilaria blodgettii</i>) 1.0 mol/L NaCl 南方海南岛采 | G | 102.4 | 70.2 | 82.2 | 68.7 | 75.3 | 61.4 | A | 98.2 | 69.9 | 80.1 | 77.3 | 75.6 | 69.4 | |
| | G'' | 103.7 | 70.5 | | | | 61.7 | | A''' | | 70.9 | | | | |
| | G''' | | | | | | | | | | | | | | |
| 凤尾菜 (<i>Gracilaria eucheumoides</i>) 0.5 mol/L NaCl 南方海南岛采 | G | | 70.3 | | 68.8 | 75.3 | 61.4 | A | 98.2 | 69.9 | 78.6 | 77.6 | 75.8 | 69.5 | 59.2 |
| | G'' | 102.7 | | 82.8 | | | | | A''' | 98.7 | | | | | |
| | G''' | | | | | | | | | | | | | | |
| 凤尾菜 (<i>Gracilaria eucheumoides</i>) 1.0 mol/L NaCl 南方海南岛采 | G | | 70.2 | | 68.8 | 75.3 | 61.4 | A | 98.3 | 69.9 | | 77.6 | 75.8 | 69.5 | 59.2 |
| | G'' | 102.7 | | 82.8 | | | | | A''' | 98.7 | 78.6 | 77.6 | 78.9 | 69.5 | 59.2 |
| | G''' | | 70.6 | | 69.1 | 75.8 | 61.6 | | A''' | | 70.8 | 78.9 | 78.9 | 69.8 | 69.8 |

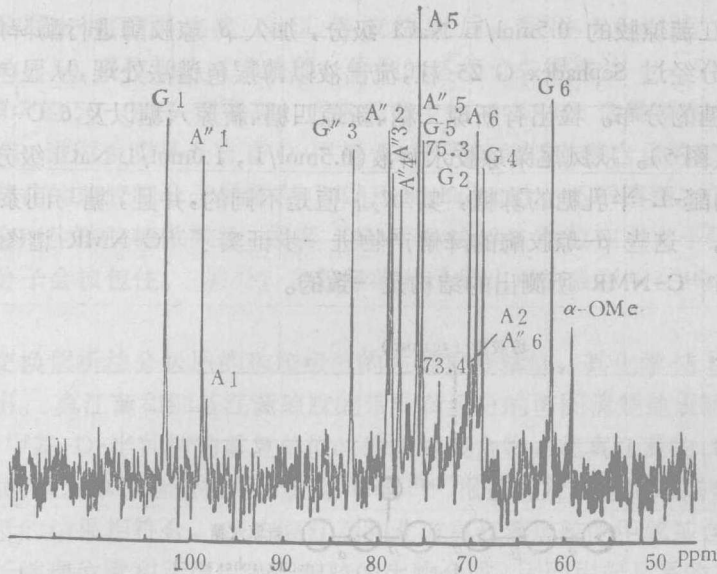


图4 凤尾菜琼胶 0.5mol/L NaCl 级分的 ^{13}C -NMR 谱图

级分(图3)和凤尾菜琼胶 0.5mol/L NaCl 级分(图4)的谱图以作比较。从D-半乳糖(G)和3,6-AG(A) (图1:II)的化学位移值与文献结果(表2)相对照,可以确定琼胶分子中的主要的和微量的重复单位。真江蓠、细基江蓠和芋根江蓠的琼胶各级分谱图都表示出琼胶糖重复单位所特有的12个主要信号^[23](表3),说明琼胶糖为这些琼胶的主要组分。南方真江蓠琼胶的0.5mol/L NaCl 级分和6.0mol/L 尿素级分,北方真江蓠琼胶的0.5mol/L NaCl 级分以及细基江蓠琼胶的1.0 mol/L NaCl 级分的谱图都显示出3个微量的化学位移信号,即G'4, G'5和G'6(表3),表明有6-甲基化的D-半乳糖存在。但只在南方真江蓠琼胶的0.5mol/L NaCl 级分和尿素级分的谱图中看到有甲基碳信号(59.1ppm)。北方真江蓠琼胶中没有检出。这表明甲基化琼胶糖在南方真江蓠中的含量比北方者较高。定性地看,在0.5mol/L NaCl 级分中,甲基化琼胶糖单位的信号强度比1.0mol/L NaCl 级分较高。在真江蓠、细基江蓠和芋根江蓠的1.0mol/L NaCl 级分中,观察到微弱的表示6-硫酸基-L-半乳糖存在的信号。尿素级分与南方真江蓠琼胶0.5mol/L NaCl 级分的谱图彼此很相似(图3),即都含有低含量的6-O-甲基-D-半乳糖,但几乎测不出6-硫酸基-L-半乳糖。

凤尾菜所含琼胶具有不同类型的重复单位,它不象有的江蓠琼胶在L-半乳糖的C6上甲基化,而是在3,6-内醚-L-半乳糖的C2上甲基化(图1:II)。其化学位移(图4和表3)与Usov等^[22]提出的数值是一致的。但G5和A5的位置相反。由于大量2-OCH₃的存在,使得A1 98.2和A2 69.9ppm信号显著地受影响而减弱。在凤尾菜琼胶的1.0mol/L NaCl 级分中,检出了微量6-硫酸基-L-半乳糖的信号。在0.5mol/L NaCl 级分的谱图中,还出现了73.4ppm未知信号。

在上述琼胶中,可能会存在低浓度的其他类型取代的重复单位,特别是与硫酸基相结合的不同类型的重复单位,但 ^{13}C -NMR 谱图却未能显示出来。

4. 酶降解

取南方真江蓠琼胶的 0.5mol/L NaCl 级分, 加入 β -琼胶酶进行酶降解。对酶解液的乙醇可溶部分经过 Sephadex G 25 柱, 流出液以薄层色谱法处理, 从显色的 R_{gal} 值^{18,29} 观察了中性寡糖的分布。检出新琼二糖、新琼四糖、新琼六糖以及 6-O-甲氧基-新琼二糖系列的寡糖(图 5)。从凤尾菜琼胶水解液(0.5mol/L, 1.0mol/L NaCl 级分)得到的含 2-甲氧基-3,6-内醚-L-半乳糖的寡糖, 其 R_{gal} 值是不同的, 并且, 糖与间苯二酚指示剂生成浅黄色斑点。这些 β -琼胶酶的降解产物进一步证实了 ^{13}C -NMR 谱图显示出的主要重复单位, 即与 ^{13}C -NMR 所测出的结构是一致的。

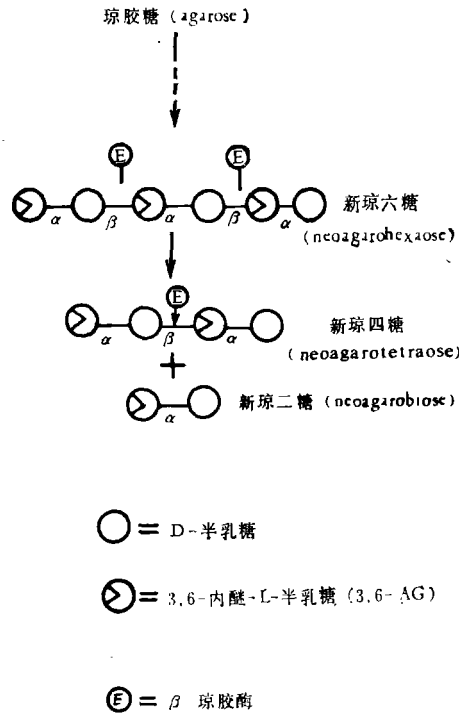


图 5 β -琼胶酶对琼胶糖的降解

讨 论

从 4 种 (6 份) 江蓠属红藻琼胶的层析分级所得级分分布图看, 这些琼胶主要由带电荷的聚合物, 即 0.5mol/L 和 1.0mol/L NaCl 洗脱级分组成。各种琼胶的水级分的重量得率与比色得率间的差异以及水级分中 3,6-AG 含量比较低, 都表明琼胶中含有非琼胶成分, 如糖苷、红藻淀粉或含氮化合物。这可能与所用的冻结-乙醇融化法^[1]的脱水步骤有关。乙醇能使水溶性非琼胶聚合物与琼胶凝胶吸附沉淀在一起, 从而干扰了对琼胶特别是对 3,6-AG 的测定。已有报道, 从红藻的水提取液中分离出藻胆素^[21]、红藻淀粉^[24]、直链淀粉^[1]等。Usov 等^[28]还从江蓠凝胶的融化水中分离出除半乳糖和木糖以外的葡萄

1) Yaphe 等未发表资料。

糖。

各琼胶样品用水和不同浓度 NaCl 溶液洗脱后, 都用 6.0mol/L 尿素溶液^[16]对 DEAE-Sephadex A 50 凝胶加热煮沸处理, 得到的各级分总得率为 68—91%, 一般大于 80%, 比前人^[10,28]的 50—70% 都要高。尿素级分中的 3,6-AG 含量都在 30% 以上。此级分的 ¹³C-NMR 谱图表明是含有 6-O-甲基-D-半乳糖的低硫酸含量的琼胶糖。为何低硫酸含量和甲基化的琼胶糖分子保留在 DEAE-Sephadex 上, 还不清楚。但当增高 NaCl 浓度时, 可能会产生琼胶糖微凝胶, 或者 DEAE-Sephadex 微粒在高离子强度溶液中膨胀时, 琼胶糖分子会被包住。另外, 琼胶糖的分子量也可能会影响在 Sephadex 上的滞留。

用阴离子交换层析法分级后的琼胶级分的主要重复单位, 其化学结构在 ¹³C-NMR 谱图上极易看出。真江蓠和细基江蓠琼胶的带电荷级分的谱图清楚地表明, 这些级分含有低浓度 6-O-甲基-D-半乳糖的重复单位的琼胶糖聚合物。在真江蓠的 1.0mol/L NaCl 级分中, 甲基化的重复单位含量很低, 这与 Izumi^[14]报道琼胶中的甲氧基含量随 SO₄ 含量的增加而降低的结果相符合。南方真江蓠和北方真江蓠琼胶的甲氧基含量差异, 可能反映藻体的生长地理位置和环境影响到琼胶的生物合成, 因而引起品系的差异。由于影响琼胶结构的变因的复杂性, 对南方和北方的真江蓠所含琼胶的某些差异, 本文尚难作出有意义的推断。只在真江蓠、细基江蓠和芋根江蓠的 1.0mol/L NaCl 级分中测出微量 6-硫酸基-L-半乳糖, 这个组分可能在 2.5mol/L NaCl 级分中较多。

凤尾菜琼胶的 ¹³C-NMR 谱图显示出的特有的 2-O-甲基-3,6-半乳糖, 曾在松节藻 (*Rhodomela larix*) 中以微量成分描述过^[29], 但在琼胶海藻凤尾菜中作为主要类型的琼胶糖聚合物, 本文是首次报道。可以认为这种甲基化重复单位是凤尾菜琼胶的特点。过去对凤尾菜的分类从外形上曾与麒麟菜属 (*Eucheuma*) 混淆过。后者所含多糖属于卡拉胶 (Carrageenan)。卡拉胶是一类由 D-半乳糖组成的具不同构象的、硫酸基结合量和结合位置不同的半乳糖胶 (galactan), 基本上不含甲基化半乳糖^[17]; 而凤尾菜多糖则具有琼胶糖骨架(图 1a), 故不仅从形态上不应隶属于麒麟菜, 从化学结构上也应归属于琼胶类型。但凤尾菜多糖又具有与其他江蓠多糖不同的结构特点, 因此, 一方面表明江蓠琼胶在结构上的多样性, 同时为分类学家提供了一个待研究的饶有兴趣的问题。

琼胶海藻的不同世代对细胞壁多糖结构的影响, 不象在卡拉胶海藻中那样明显^[15]。

用 DEAE-Sephadex A 50 对琼胶聚合物分级和对各级分的化学分析, 可以对聚合物的电荷密度得出其相对分布的资料。¹³C-NMR 光谱是表征各级分中主要重复单位的一种有用的技术, 但是这种技术对于鉴别那些构成与聚合物电荷密度有关的微量重复单位的存在, 还不够灵敏。因此, 尚需探讨另外的方法, 以测定这些能影响琼胶物理性质(凝胶强度)的微量重复单位。琼胶中的主要重复单位在江蓠各种类的分类学研究中可能具有一定意义。

参 考 文 献

- [1] 纪明侯, 史升耀, 刘万庆, 1965. 江蓠琼胶的研究 I. 提取与处理. 水产学报 2(2): 1—12.
- [2] 张峻甫, 夏邦美, 1985. 中国的真江蓠和英国江蓠. 海洋与湖沼 16(3): 175—180.

- [3] 新井清, 1961. イタニグサ寒天質のメチル化成績体のメタノリシス. 日本化学会志 **82**(11): 1557—1561.
- [4] Araki, C., 1956. Structure of the agarose constituent of agar-agar. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **29**: 543—544.
- [5] Clingman, A. L., J. R. Nunn and A. M. Stephen, 1957. Red-seaweed polysaccharides. Part I. *Gracilaria confervoides*. *J. Chem. Soc.* **1957**: 197—203.
- [6] Craigie, J. S. and C. Leigh, 1978. Carrageenan and agars. In: Handbook of Phycological Methods (ed. by J. A. Hellebust and J. S. Craigie). Cambridge University Press. pp. 109—131.
- [7] Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton et al, 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350—356.
- [8] Duckworth, M. and W. Yaphe, 1970. Thin-layer chromatographic analysis of enzymic hydrolysates of agar. *J. Chromatog.* **49**: 482—487.
- [9] Duckworth, M. and W. Yaphe, 1971. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**: 189—197.
- [10] Duckworth, M., K. C. Hong and W. Yaphe, 1971. The agar polysaccharides of *Gracilaria* species. *Carbohydr. Res.* **18**: 1—9.
- [11] Friedlander, M., Y. Lipkin and W. Yaphe, 1981. Composition of agars from *Gracilaria cf. verrucosa* and *Pterocladia capillacea*. *Bot. Mar.* **26**: 595—598.
- [12] Fujiwara, T. 1955. Studies on chromoproteins in Japanese nori (*Porphyra tenera*) I. A new method for the crystallization of phycoerythrin and phycocyanin. *J. Biochem.* (Tokyo) **42**: 411—417.
- [13] Guiseley, K. B., 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperatures of agarose. *Carbohydr. Res.* **13**: 247—256.
- [14] Izumi, K., 1972. Chemical heterogeneity of the agar from *Gracilaria verrucosa*. *J. Biochem.* **72**: 135—140.
- [15] McCandless, E. L., J. S. Craigie and J. A. Walter, 1973. Carrageenans in gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. *Planta* **112**: 201—212.
- [16] Mikš, O., 1976. Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods. Ellis Horwood Limited, England. p. 368.
- [17] Percival, E. and R. H. McDowell, 1981. Algal walls — Composition and biosynthesis. In: Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, **13B**: pp. 277—316.
- [18] Rees, D. A., 1961. Enzymatic synthesis of the 3, 6-anhydro-L-galactose within porphyran from L-galactose 6-sulfate units. *Biochem. J.* **81**: 347—352.
- [19] Rees, D. A., 1961. Estimation of the relative amounts of isomeric sulphate esters in some sulphated polysaccharides. *J. Chem. Soc.* **1961**: 5168—5171.
- [20] Samec, M. et V. Isajević, 1922. Studien über Pflanzenkolloide XIV. Physiko-chemische Analyse der Agar-gallerte. *Kolloidchem. Beihefte* **16**: 285—300.
- [21] Tabatabael, M. A., 1974. Determination of sulphate in water samples. *Sulphur Inst. J.* **10**: 11—13.
- [22] Usov, A. I., S. V. Yarotsky and A. S. Shashkov, 1980. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymer* **19**: 977—990.
- [23] Usov, A. I., E. G. Ivanova and A. S. Shashkov, 1983. Polysaccharides of algae. XXXIII: Isolation and ¹³C-NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan sea red seaweeds. *Bot. Mar.* **26**: 285—294.
- [24] Whyte, J. N. C., 1971. Polysaccharides of the red Seaweed *Rhodomenia pertusa*. I. Water soluble glucan. *Carbohydr. Res.* **16**: 220—224.
- [25] Yaphe, W. and G. P. Arsenault, 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3, 6-anhydro-galactose in polysaccharides. *Anal. Biochem.* **3**: 143—148.
- [26] Young, K., M. Duckworth and W. Yaphe, 1971. The structure of agar. Part III. Pyruvic acid, a common feature of agar from different agarophytes. *Carbohydr. Res.* **16**: 446—448.
- [27] Young, K., K. C. Hong, M. Duckworth et al, 1971. Enzymic hydrolysis of agar and properties of bacterial agarase. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **7**: 469—472.
- [28] Усов, А. И., Е. Г. Иванова и В. Ф. Макиенко, 1979. Полисахариды Водорослей. XXIX. Сравнение образцов агара из различных генераций *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. *Биоорган. Хим.* **5**: 1647—1653.
- [29] Усов, А. И. и Е. Г. Иванова, 1981. Полисахариды Водорослей. XXXI. Фермативное расщепление агароподобного полисахарида из красной водоросли *Rhodomela larix* (Turn.) C. Ag. *Биоорган. Хим.* **7**: 1060—1068.

STRUCTURAL FEATURE OF AGAR FROM CHINESE *GRACILARIA* SPP. (RHODOPHYTA)*

Ji Minghou

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

M. Lahaye and W. Yaphe

(McGill University, Montreal, Canada)

ABSTRACT

The structural feature of six samples of agar polysaccharides extracted from four Chinese *Gracilaria* species, *G. asiatica*, *G. tenuistipitata*, *G. blodgettii* and *G. eucheumoides* was investigated. These agars composed mainly of charged agarose molecules that were eluted from DEAE-Sephadex A 50 with 0.5 and 1.0 mol/L NaCl. The yield of fractions of agar from the DNTE-Sephadex was increased to 80% or more after a treatment with 6.0 mol/L urea, with the recovery of agarose molecules having a low charge density. Analysis by ^{13}C -NMR spectroscopy showed 6-sulfate-L-galactose as a minor constituent in the repeat units of agarose from the main fractions of *G. asiatica*, *G. tenuistipitata* and *G. blodgettii*. Substitution of hydroxyl groups with methoxyl was detected by ^{13}C -NMR spectroscopy; 6-OMe-D-galactose was present as a minor sugar in agarose from *G. asiatica* and *G. tenuistipitata*, and 2-OMe-3,6-anhydro-L-galactose as a major sugar in agarose from *G. eucheumoides*. Differences were noted in the fractionation pattern and 6-OMe-D-galactose content of the agars from *G. asiatica* collected in North and South China possibly from a combination of different biological factors. Agars from gametophytes and tetrasporophytes of *G. asiatica* yield similar fractionation patterns on DEAE-Sephadex, but the concentration of 3,6-anhydro-galactose in the latter fractions was somewhat higher than that of the former ones. ^{13}C -NMR spectroscopy was not sufficiently sensitive to detect the minor repeat units contributing to the charge density of agarose molecules, but it was proved to be a rapid and simple procedure to determine the types of sugars in the principal repeat units of agarose molecules that may be of taxonomic importance.

* Contribution No. 1266 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.