

南、北方坛紫菜多糖结构特征的比较研究*

高洪峰 纪明侯 曹文达

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 对南方产(1987年3月采)和移植北方养殖(1988年11月采)的两种坛紫菜的热水和冷水提取多糖进行了层析分级, 用 ^{13}C -NMR 和 IR 光谱研究了各级分的化学结构特征, 结果表明, 南北方坛紫菜多糖分别主要由用 1.0mol/L 和 0.5mol/L NaCl 从 DEAE-Sephadex A50 层析柱洗脱下的带电荷的琼胶糖分子组成; ^{13}C -NMR 谱图表明坛紫菜主要由琼胶糖结构及其生物前体(硫酸基结合在 L-半乳糖的第 6 位碳上)构成, 且甲基化琼胶糖在南方坛紫菜中的含量明显比北移坛紫菜高, 这是坛紫菜由南方移植北方后的明显差异。

关键词 坛紫菜 琼胶糖 生物前体

国内外学者曾对琼胶进行过许多研究^[3,8,11,12,15]。坛紫菜 (*Porphyra haitanensis*) 是产于我国南方的一种重要经济红藻。纪明侯等^[2]首次对我国坛紫菜热水提取物及碱处理后提取物做了 ^{13}C -NMR 光谱分析, 证明前者为琼胶糖的生物前体, 后者为标准的琼胶糖结构。近年来, 坛紫菜北移养殖获得成功, 扩大了其养殖面积和产量。本文对产于中国南北方的两种坛紫菜的冷水和热水提取多糖用 DEAE-Sephadex A50 凝胶柱分级, 对各级分进行了化学分析, 并对主要级分进行了 ^{13}C -NMR 和 IR 光谱分析, 比较了南方和北移后坛紫菜所含琼胶的化学结构特征差异。

一、材料和方法

1. 海藻样品

- (1) 北移坛紫菜 1988年11月采于青岛太平角海区人工养殖筏。
- (2) 南方坛紫菜 1987年3月采于福建省惠安县海区。

2. 海藻多糖的提取

分别称取两种阴干的坛紫菜样品各 100g, 剪碎后加入蒸馏水 1400ml, 放入冰箱中(约 4°C)浸泡, 自溶提取, 时而搅拌, 经过一周左右后, 用尼龙布过滤, 滤液离心 (5000r/min, 4°C, 15min) 除去碎屑。本试验为了使冷水提取液中溶解的藻胆蛋白尽量先分离出去, 清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度约 55%, 离心除去藻胆蛋白沉淀。上清液再加入 2% 的十六烷基氯化吡啶(简称 CPC) 至其浓度为 0.5%, 使多糖沉淀出来, 离心 (5000r/min, 4°C, 20min), 将沉淀用少量蒸馏水洗 2 次, 然后用 95% 乙醇的乙酸钠饱和溶液

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1849 号。

国家自然科学基金资助, 3870137 号。

接受日期: 1990年7月30日。

洗 6—7 次,最后用蒸馏水溶解,透析,分别经 1.2, 0.8, 0.45 μm 的微孔滤膜压滤, 滤液冻干,即为坛紫菜冷水 (4 $^{\circ}\text{C}$) 提取多糖。

将提取冷水多糖后的藻渣,加 5 倍重量的蒸馏水,放至压力锅中于 1 kg/cm^2 压力(约 120 $^{\circ}\text{C}$) 提取 2h, 以尼龙布过滤,再用双层滤纸抽滤,滤液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至约 500ml, 透析,分别经 1.2, 0.8, 0.45 μm 微孔滤膜压滤, 滤液中加入 5ml 1mol/L NaCl 溶液, 3000ml 95% 乙醇,使多糖脱水沉淀。过滤,沉淀用 95% 乙醇洗 3 次,抽真空干燥,即为坛紫菜热水提取多糖。

3. 多糖的分级

参考 Duckworth 等^[8]的分级方法,将样品通过 DEAE-Sephadex A50 柱,然后以水和 NaCl 溶液 (0.5, 1.0, 2.5mol/L) 依次洗脱(对于热水提取多糖,柱温须保持在 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右,冷水提取多糖室温即可),最后将柱内凝胶移出加蒸馏水 100ml 煮沸,过滤,滤液即为水煮沸级分。将各级分洗脱液减压浓缩 (40 $^{\circ}\text{C}$), 透析,经 1.2, 0.8, 0.45 μm 微孔滤膜压滤,冻干即得各级分。

4. 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-L-半乳糖 (3,6-AG) 用 Yaphe 等^[12]的方法,以果糖为标准测定。

(3) 硫酸基 用山梨醇比浊法^[9],以 K_2SO_4 (A.R., 110 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 3 小时以上) 为标准测定。

5. IR 光谱

称取 1—2mg 样品与约 200mg 溴化钾研磨混匀后压片,用岛津 IR-440 型光谱仪记录红外吸收光谱。

6. ^{13}C -NMR 光谱

称取 80mg 左右的样品,加热溶于 2ml D_2O 中,放入 JNM-GX400 型光谱仪的磁场中,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 记录质子去偶的 ^{13}C -NMR 谱图,化学位移以 ppm 表示,相对于 TMS (ppm=0) 的值,磁场强度 100.54MHz,谱线宽度 20 000 Hz, 弛豫时间 0.4s, 扫描次数 720—7160 次。

二、结果与讨论

1. 层析分级

将南、北方坛紫菜的冷水和热水提取多糖分别经 DEAE-Sephadex A50 层析柱进行分级,各级分的得率列于表 1。从表 1 可以看出,热水提取多糖各级分的实际重量得率大多较碳水化合物的比色得率为高。这反映了琼胶中有某些其他中性化合物(如红藻淀粉,含氮化合物)存在,影响了碳水化合物的比色测定。冷水提取多糖各级分的重量得率和比色得率基本一致,这是因为提取过程中首先用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 将藻胆蛋白沉淀分离出去,含氮化合物含量大大降低的缘故。

从表 1 还可以看出,无论热水还是冷水提取多糖,南方坛紫菜都是以较高浓度 (1.0 mol/L) 的 NaCl 级分为主要级分,北移坛紫菜以较低浓度 (0.5mol/L) 的 NaCl 级分

表 1 坛紫菜多糖由 DEAE-Sephadex A50 层析柱上洗脱下的各级分的分析结果

Tab. 1 Chemical analysis of fractions eluted from DEAE-Sephadex A50 of agar extracted from *Porphyra haitanensis*

坛紫菜样品		级 分	实际重量 得率(%) (对原始多糖)	碳水化合物 比色得率(%) (对原始多糖)	3,6-内醚-L-半乳糖含量 (%) (对级分)	SO ₄ ²⁻ 含量 ^{a)} (%) (对级分)
北移坛紫菜	热水提取多糖	原始多糖			18.00	4.20
		蒸馏水	31.51	24.06	10.32	0.57
		0.5mol/L NaCl	41.22	37.80	21.19	6.23
		1.0mol/L NaCl	5.50	3.77	16.00	10.13
		2.5mol/L NaCl	1.32	0.43	4.17	—
		水煮沸	2.76	2.03	43.93	3.82
		总得率	82.31	68.09	95.40 (对原始内醚糖)	98.56(对原始总 SO ₄ ²⁻)
	冷水提取多糖	原始多糖			13.60	13.51
		蒸馏水	1.41	1.22	1.43	—
		0.5mol/L NaCl	52.24	55.70	15.16	12.23
		1.0mol/L NaCl	38.61	38.42	10.29	14.46
		2.5mol/L NaCl	1.02	0.65	6.12	—
		水煮沸	1.13	0.54	25.45	—
		总得率	94.41	96.53	95.51 (对原始内醚糖)	93.86(对原始总 SO ₄ ²⁻)
南方坛紫菜	热水提取多糖	原始多糖			12.24	12.41
		蒸馏水	6.02	1.62	6.20	4.94
		0.5mol/L NaCl	12.60	8.54	20.16	8.55
		1.0mol/L NaCl	43.22	46.67	11.34	13.32
		2.5mol/L NaCl	19.23	13.25	8.25	15.25
		水煮沸	3.46	1.24	24.05	—
		总得率	84.53	71.32	98.90 (对原始内醚糖)	95.94(对原始总 SO ₄ ²⁻)
	冷水提取多糖	原始多糖			8.74	13.68
		蒸馏水	—	—	—	—
		0.5mol/L NaCl	1.67	1.26	12.07	—
		1.0mol/L NaCl	66.49	63.20	7.36	10.87
		2.5mol/L NaCl	8.81	8.50	4.83	17.69
		水煮沸	0.92	0.78	34.50	—
		总得率	77.89	73.74	85.76 (对原始内醚糖)	82.46(对原始总 SO ₄ ²⁻)

a) 某些级分因得率不高,或因分析别项,故未能全作 SO₄²⁻ 测定。

为主要级分,这说明南方坛紫菜比北移坛紫菜含较高电荷的半乳糖胶。

2. 化学分析

从表 1 的化学分析结果可以看出,总的来说,各级分中硫酸基的含量随着洗脱液离子强度的增高而逐渐增加,3,6-AG 的含量逐渐减少。无论热水还是冷水提取多糖,两种坛紫菜的水级分中 3,6-AG 的含量都低于原始多糖,而含量较高的却是 0.5mol/L NaCl 级分,这表明水级分中含有大量含氮化合物,在该级分的 IR 光谱中,1540cm⁻¹ 处有明显吸收,也证实含氮化合物的存在。水煮沸级分的 3,6-AG 含量在 24—44% 之间,表明该级分琼胶糖含量较高,这可能是因为 DEAE-Sephadex 在高离子强度时膨胀,少量琼胶糖分子被包住,或者高分子量琼胶糖(具有高融化温度)部分地滞留在凝胶中,当用水煮沸

时才溶出^[1]。

两种坛紫菜的热水提取多糖中 3,6-AG 的含量都分别较冷水提取多糖要高,表明热水提取多糖中含有较多的琼胶糖,而冷水提取多糖中硫酸基含量较热水提取者高,说明前者主要是带电荷高的半乳糖胶。从表 1 还可以看出,南方坛紫菜的热水和冷水提取多糖中 3,6-AG 的含量分别低于北移坛紫菜,而硫酸基含量却分别高于北移坛紫菜,说明北移坛紫菜中含有较多的琼胶糖,而南方坛紫菜中含有较多的高电荷半乳糖胶。

3. IR 光谱分析

图 1 为北移坛紫菜热水提取多糖以及各级分的 IR 光谱图,北移坛紫菜冷水提取多糖及各级分和南方坛紫菜提取多糖及各级分的 IR 光谱与之类似,故从略。从图 1 可见,1250,1370,1410 cm^{-1} 处都有明显吸收,表明多糖中含有硫酸基,而且随着洗脱液浓度的增加,吸收峰的强度也相应增加,表明级分中硫酸基的含量亦增加,这与化学分析结果是一致的(表 1),1000—1200 cm^{-1} 的吸收也逐渐增强,这与分子上连接的硫酸基含量逐渐增加而引起 C—O 伸缩振动的强度增加有关。930 cm^{-1} 处的明显吸收表明多糖中含有 3,6-AG。根据该吸收峰的相对强弱可以定性地看出 3,6-AG 在多糖样品中的含量变化趋势,即水煮沸级分 > 0.5 mol/L NaCl 级分 > 未分级多糖 > 1.0 mol/L NaCl 级分 > 2.5 mol/L NaCl 级分 > 蒸馏水级分。这一趋势与化学分析结果(表 1)相吻合。

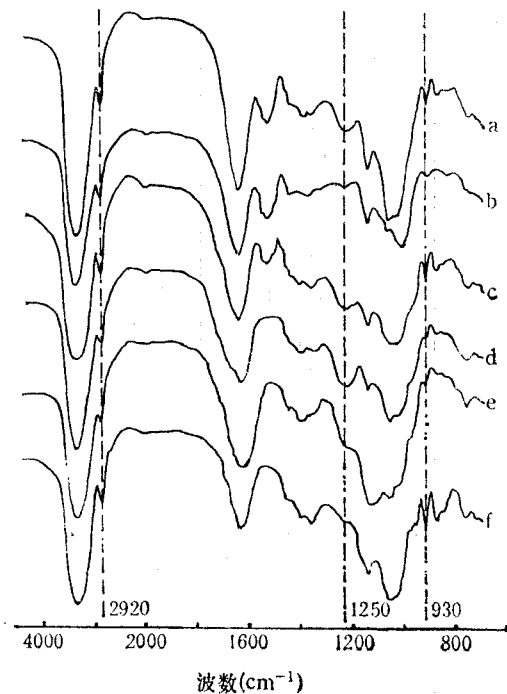


图 1 北移坛紫菜热水提取多糖及各级分的红外光谱图

Fig. 1 Infrared spectra of the hot water extract and its fractions obtained from *Porphyra haitanensis* from south China to the north

a. 未分级的热水提取多糖; b. 蒸馏水级分; c. 0.5 mol/L NaCl 级分; d. 1.0 mol/L NaCl 级分; e. 2.5 mol/L NaCl 级分; f. 水煮沸级分。

有所降低的缘故,这与多糖分级从实际重量得率和比色得率的差异所得出的结论一致。从图 1 还可以看出,水级分在 1540 cm^{-1} 处有明显吸收,因为含氮化合物的水溶解度相当大,用蒸馏水洗脱时,就能将其大部分洗脱下来。而随着 NaCl 浓度的增加,该吸收峰明显减小。

4. ^{13}C -NMR 光谱分析

对南、北方坛紫菜未分级多糖及主要级分进行了 ^{13}C -NMR 分析,本文记录了具有

在热水提取多糖的 IR 光谱中,1540 cm^{-1} 处有明显吸收(图 1),表明多糖中还含有多肽类等含氮化合物,而冷水提取多糖在 1540 cm^{-1} 处吸收峰很弱,这是因为冷水提取过程中已加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 将藻胆蛋白沉淀分离出去,含氮化合物

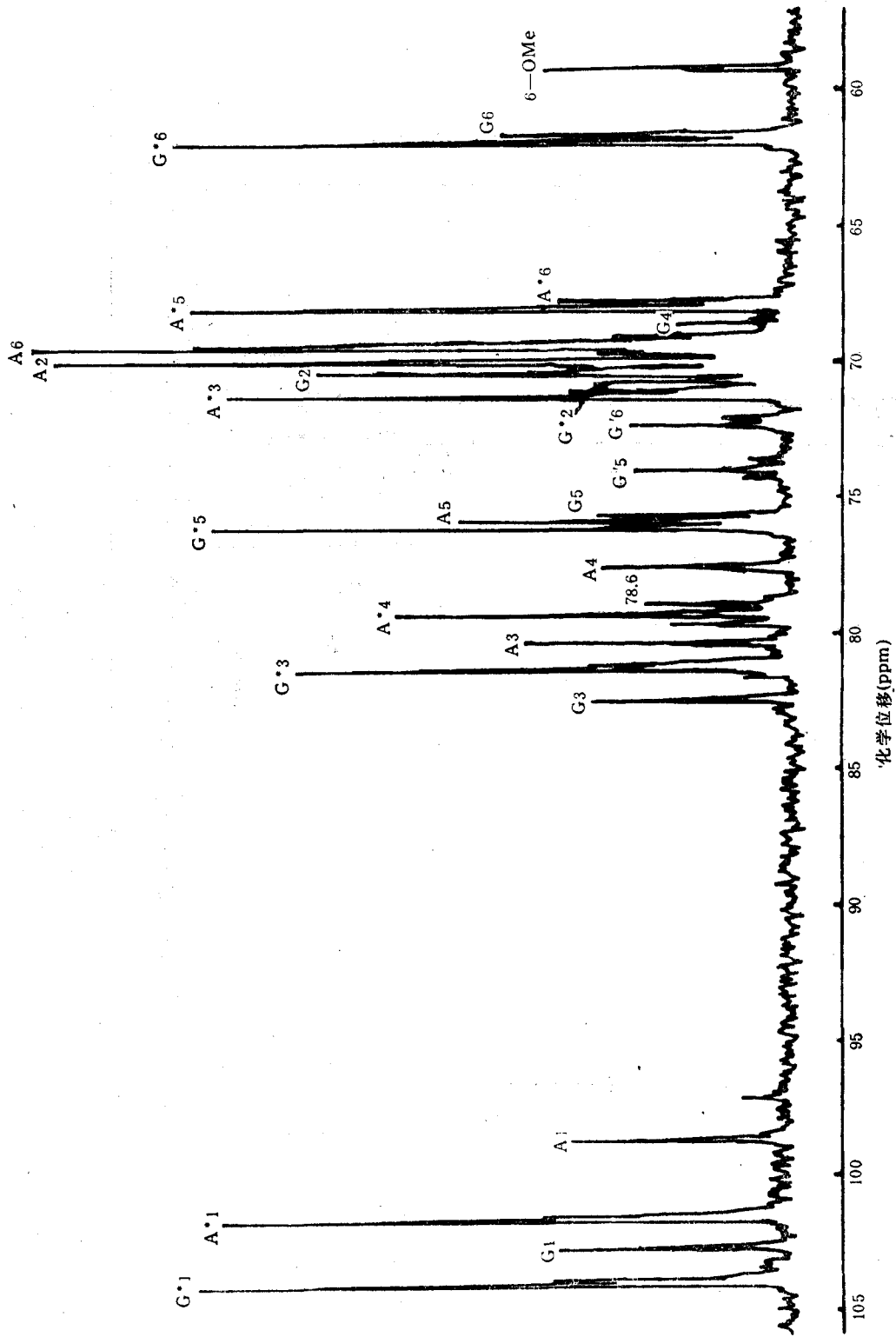


图2 南方坛紫菜冷水提取多糖 1.0 mol/L NaCl 级分的 ¹³C-NMR 谱图
Fig. 2 ¹³C-NMR spectrum of 1.0 mol/L NaCl fraction of the cold water extracted from *Porphyra haitanensis* collected from south China

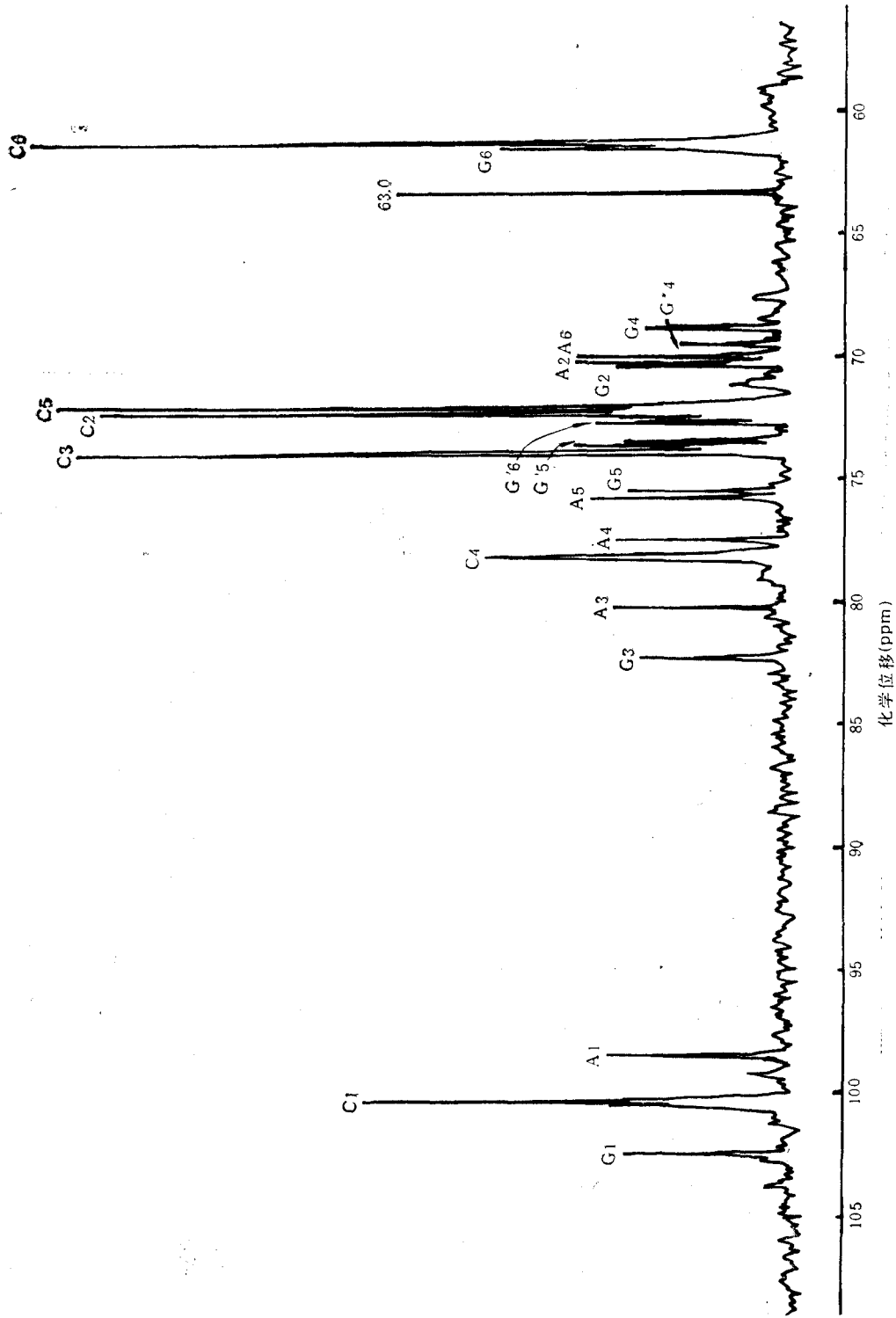


图 3 北移坛紫菜热水提取多糖水级分的 ¹³C-NMR 谱图
Fig. 3 ¹³C-NMR spectrum of water fraction of the hot water extracted from *Porphyra kaitanensis* transplanted from south China to the north

代表意义的得率比较高的两个级分的 ^{13}C -NMR 图谱(图 2、图 3),未分级多糖的吸收峰与级分相似,故从略。两种坛紫菜各级分的 ^{13}C -NMR 谱图与文献[13,14]的各碳原子共振信号相对照,都表明含有明显的琼胶糖,即琼胶二糖的 12 个信号。除此之外,还有琼二糖的生物前体的 12 个信号。由此可见,坛紫菜多糖主要由琼胶糖[(1→3)- β -D-半乳糖与(1→4)-3,6-内醚- α -L-半乳糖连接的琼二糖重复单位]及其生物前体 [(1→3)- β -D-半乳糖与 [(1→4)-6-OSO₃- α -L-半乳糖连接的二糖重复单位]所组成。

琼二糖及其生物前体的相对含量,可通过 A*1 和 A1 两个信号的强度来估算^[10]。琼二糖的生物前体在琼胶糖与生物前体总量中的百分数,根据 $A^*1/(A1 + A^*1) \times 100\%$ 计算,南方坛紫菜热水提取多糖中占 49.6%,冷水提取多糖中占 81.2%。北移坛紫菜热水提取多糖中占 34.2%,冷水提取多糖中占 76.2%。同一坛紫菜冷水提取多糖中琼二糖的生物前体含量分别较热水提取多糖高,说明琼二糖的生物前体的水溶性较琼二糖高,不经加热就可溶出,这是因为前者亲水性的硫酸基含量较高,后者疏水性的 3,6-AG 含量较高。这同化学分析结果中冷水提取多糖中硫酸基含量较高,热水提取多糖中 3,6-AG 含量较高一致。从上面的计算结果还可以看出,南方坛紫菜多糖中琼二糖的生物前体含量比北移坛紫菜多糖高。

在 ^{13}C -NMR 谱图上不同程度地显示出 G'5 和 G'6 两个信号,表明有 6-O-甲基-D-半乳糖存在,但只有南方坛紫菜多糖的谱图上看到有甲基碳信号(59.0ppm),北移坛紫菜多糖的谱图上没有检出。这表明甲基化琼胶糖在南方坛紫菜中的含量比北移坛紫菜要高,即坛紫菜由南方移植北方后,其琼胶的甲氧基含量明显减少,这种差异反映了藻体生长环境直接影响到琼胶的生物合成。纪明侯等^[11]对南北方真江蓠(*Gracilaria asiatica*)琼胶的 ^{13}C -NMR 谱研究结果表明,也只有南方真江蓠琼胶出现甲基碳信号。Craigie^[5,6]研究表明,在温度较高时或成熟的藻体中能合成甲基化程度较高的琼胶。Guiseley^[9]发现琼胶中甲基化程度越高,琼胶的胶凝温度也越高。南方坛紫菜多糖甲基化程度比北移者高,由此推测,藻体在南方生长时合成胶凝温度较高的琼胶,而移植北方后合成胶凝温度较低的琼胶以适应南北方水温等因子的差异。当然,由于影响琼胶结构因素的复杂性,对于南北方坛紫菜琼胶的差异,目前尚难做出准确的解释,不过由于南北方藻体生长条件的最大差异是水温不同,是否可以认为水温越高,藻体琼胶的甲基化程度也越高。

南方坛紫菜多糖的 ^{13}C -NMR 谱图上没有明显的红藻淀粉吸收峰,但在北移坛紫菜热水提取多糖的 ^{13}C -NMR 谱图上存在 C1 100.1, C2 72.2, C3 73.8, C4 78.0, C5 71.9 和 C6 61.3ppm 的吸收峰,这些信号是红藻淀粉的特征信号^[10]。表明北移坛紫菜热水提取多糖含有大量的红藻淀粉,在其蒸馏水级分的谱图上(图 3),红藻淀粉的特征吸收尤其明显,琼二糖的 12 个信号明显地受到影响而降低,琼二糖的生物前体的 12 个信号已检测不出,表明红藻淀粉在该级分中的含量相当高。在化学分析结果中,该级分的实际重量得率远大于碳水化合物的比色得率,表明该级分不仅含有含氮化合物,而且含有大量的红藻淀粉。另外,在北移坛紫菜热水提取多糖蒸馏水级分的谱图(图 3)中,还出现了 63.0ppm 未知信号,其归属有待于进一步解析。

三、小 结

南方坛紫菜多糖中琼二糖的生物前体含量比北移坛紫菜多糖高,冷水提取多糖中琼二糖的生物前体含量比热水提取多糖高。另外,北移坛紫菜多糖比南方坛紫菜多糖含有较多的红藻淀粉。

^{13}C -NMR 谱图表明,甲基化琼胶糖在南方坛紫菜中的含量比北移坛紫菜要高,这是坛紫菜由南方移植北方后其琼胶最显著的差异。这表明生长条件(如水温等)对藻体琼胶的生物合成有直接的影响,这种差异对于进一步研究坛紫菜甚至红藻的生理学特点是很有意义的。

参 考 文 献

- [1] 纪明侯等, 1986, 中国江蓠属红藻所含琼胶的结构特征, 海洋与湖沼, **17**(1): 72—83。
- [2] 纪明侯等, 1986, 对三种红藻琼胶的化学与 ^{13}C -NMR 分析, 海洋与湖沼, **17**(3): 185—195。
- [3] Araki, C., 1956, Structure of the agarose constituent of agar-agar, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **29**: 543—544.
- [4] Balbir, C. et al., 1977, An improved turbidimetric procedure for the determination of sulfate in plants and soils, *Talanta*, **24**: 49—50.
- [5] Craigie, J. S., et al., 1984, Intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp., *Bot. Mar.*, **27**: 55—61.
- [6] Craigie, J. S. et al., 1984, Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae), *Can. J. Bot.*, **62**: 1665—1670.
- [7] Dúbois, M. et al., 1956, Colorimetric method for the determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**: 350—356.
- [8] Duckworth, M. et al., 1971, The structure of agar, Part I, Fractionation of a complex mixture of polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **16**: 189—197.
- [9] Guiseley, K. B., 1970, The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose, *Carbohydr. Res.*, **13**: 247—256.
- [10] Ji Minghou et al., 1988, Structural studies on agar fractions extracted sequentially from Chinese red seaweeds: *Gracilaria spicostedtii*, *G. Tectorii* and *G. salicornia* using ^{13}C -NMR and IR spectroscopy, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, **6**(2): 87—103.
- [11] 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.
- [12] Samec, M. et al., 1922, Studien über pflanzenkolloide XIV, Physiko-chemische analyse der agar-gallerte, *Kolloidchem. Beihefte.*, **16**: 285—300.
- [13] Usov, A. I. et al., 1980, ^{13}C -NMR spectroscopy of red algal galactans, *Biopolymers*, **19**: 977—990.
- [14] Usov, A. I. et al., 1983, Polysaccharides of algae XXXIII, Isolation and ^{13}C -NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan Sea red seaweeds, *Bot. Mar.*, **26**: 285—294.
- [15] Yaphe, W. et al., 1965, Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3,6-anhydro-galactose in polysaccharides, *Anal. Biochem.*, **3**: 143—148.

COMPARATIVE STUDIES ON STRUCTURAL FEATURES
OF AGAR POLYSACCHARIDES FROM *PORPHYRA*
HAITANENSIS GROWN IN SOUTH AND
NORTH CHINA

Gao Hongfeng, Ji Minghou and Cao Wenda
(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)

ABSTRACT

The structural features of agar polysaccharides from *Porphyra haitanensis* grown in South China and those transplanted to the north were investigated by fractionation on DEAE-Sephadex A50, chemical analysis, infrared and ^{13}C -NMR spectroscopy. The agars, composed mainly of charged molecules, were eluted from DEAE-Sephadex A50 with 1.0 mol/L NaCl solution from the southern *P. haitanensis* and with 0.5 mol/L NaCl from the northern one. The ^{13}C -NMR spectra showed that agarobiose [(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-3, 6-anhydro- α -L-galactopyranose] and the biological precursor of agarobiose [(1 \rightarrow 3)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-6-sulfate- α -L-galactopyranose] were the major disaccharide repeat units in the charged fractions. The content of the biological precursor in the agar polysaccharides from southern *P. haitanensis* was higher than that in the northern one; the content of the biological precursor extracted by cold water was higher than that extracted by hot water. The content of 6-OMe-D-galactose in the southern *P. haitanensis* polysaccharides was higher than in the northern one. This distinct difference will be of significance for further study on the physiological characters of *P. haitanensis*.

Key words *Porphyra haitanensis*, Agarose, Biological precursor of agarose.