

## 海带<sup>14</sup>C代谢的初级产物研究\*

纪明侯 蒲淑珠 纪祥礼

(中国科学院海洋研究所)

关于藻类的有机物代谢,用淡水单胞藻——小球藻、栅藻类已进行了大量的研究,代谢产物的相互转化过程,已基本得到阐明<sup>[17]</sup>。

随着对海藻各种化学成分,特别是多糖的分离、提纯、结构、性质等的深入研究,人们开始注意海藻中化学成分的代谢途径的研究。

1955年,Bean等<sup>[6]</sup>首次对红藻银杏藻(*Iridophycus*)以<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>进行了光合作用产物的研究,并初步提出代谢产物循环图示。随后,Bidwell等对海藻碳代谢做了较系统的研究。他<sup>[7]</sup>先用<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>比较研究了14种红藻、绿藻的光同化速度及初级代谢产物。其后他们<sup>[8-11]</sup>专门用褐藻墨角藻研究了光合作用中<sup>14</sup>C的分布,以及用各种<sup>14</sup>C和<sup>32</sup>S标记的有机物作培养基,研究了其在藻体内的代谢途径。六十、七十年代陆续发表了关于用褐藻研究代谢产物,特别是多糖的生物合成途径的进一步报告<sup>[4,5,26]</sup>,但未曾用海带(*Laminaria japonica*)做过实验。

海带在我国已大量人工养殖,我国海带是一年生植物,不同于国外自然繁殖的海带以及其他褐藻是多年生的,因此对我国海带进行系统的生物化学研究,阐明其所含化学成份的变化及有机物代谢规律,并了解其化学特点,是具有一定的应用与理论意义的。我们在对我国海带的主要化学成份<sup>[1]</sup>及氨基酸含量变化<sup>[2]</sup>的研究基础上,于1963和1964年首次用<sup>14</sup>C研究了我国海带的碳代谢,初步了解了<sup>14</sup>C代谢初级产物的形成过程。

### 一、实验材料与方法

#### 1. 实验材料

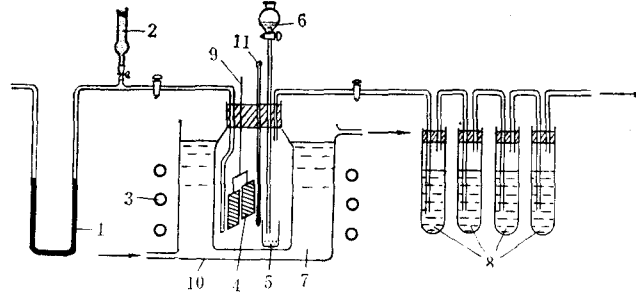
实验材料为人工培养的“海青1号”海带。1963年11月上旬从海中采集,培养于流动海水中,实验时将海带从中间横切为两部分,并从中带部竖切许多3×4厘米大小的块,每个实验用两块。当时藻体已成熟、衰老,有孢子囊群隆起。1964年用的材料为当年10月下旬采收,也正值孢子囊成熟度高的时期。实验用海水采自鲁迅公园前,用3号砂芯漏斗过滤,S‰=28, pH=8。

#### 2. 光合设备与方法

(1) <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 气体法: 光合作用都在通风橱内进行。按图1装置联接好。将两块海带叶片(共约6—8克)先用海水湿润,悬挂在铂丝上。将盛有0.05克稳定BaCO<sub>3</sub>和0.006克Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>(500微居里)的小烧杯置广口瓶底,盖好瓶口。于分液漏斗中加入6毫升乳酸,然后使瓶内略呈负压,关闭广口瓶两边的活塞,自分液漏斗中徐徐流入4.5毫升乳酸,产生

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第560号。

李金岭同志参加了部分实验,张燕霞和郭玉彩同志协助了预备实验,特此致谢。

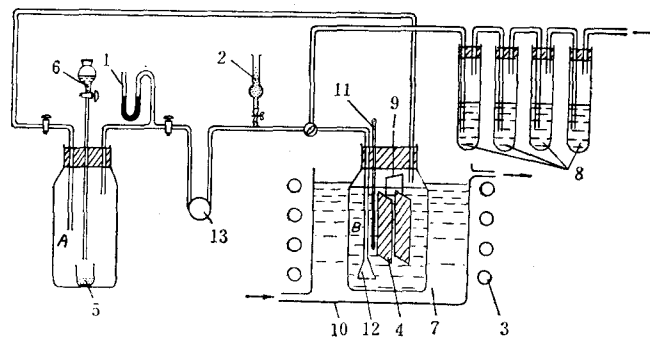
图1  $^{14}\text{CO}_2$  气体法光合作用装置

1. 汞柱 2. Ascarite 管 3. 日光灯管 4. 海带叶片 5.  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$   
6. 真空泵 7. 流动水 8. 2N, NaOH 溶液各管 35 毫升 9. 铂丝  
10. 玻璃水缸 11. 温度计

$^{14}\text{CO}_2$  气体, 关闭漏斗活塞, 打开 6 支 20 W 日光灯管, 使海带叶片于  $^{14}\text{CO}_2$  气体中进行光合作用。此时广口瓶外连以流动自来水降温, 瓶内温度为 18—20°C。光照时间分 1、3、4、6、12 小时。广口瓶中心的光强为 3,000 米烛 (Lux)。光照完毕, 关闭日光灯, 打开 Ascarite 管的铁夹, 开动真空泵将瓶内多余的  $^{14}\text{CO}_2$  经过 2N NaOH 溶液排除。打开广口瓶塞, 取出海带叶片, 用蒸馏水冲洗。

(2)  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  海水法: 同上法将两块海带叶片挂铂丝上, 广口瓶中加入溶有 0.1514 克  $\text{NaHCO}_3$  和 10 毫升  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (250 微居里) 的 450 毫升海水。盖好瓶塞, 广口瓶外以流动自来水调节海水温度为 18—20°C。打开 6 支日光灯管, 与 (1) 法同样进行光合作用。

(3) 循环  $^{14}\text{CO}_2$  海水法: 装置基本上与 (1) 法相似。如图 2 所示, 系统中加一个小泵使在 A 瓶中产生的  $^{14}\text{CO}_2$  气通入 B 瓶海水中, 光照过程中  $^{14}\text{CO}_2$  循环于整个系统中。用 8 支 20W 日光灯管光照, 其强度为 9,700 米烛。 $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  用量与 (1) 法相同。

图2 循环  $^{14}\text{CO}_2$  海水法光合作用装置

1—11 说明同图 1 12. 打泡器 13. 小循环泵

### 3. 分级方法

将光照完毕并以蒸馏水冲洗后的海带叶片按图 3 所示图解进行分级处理, 然后对所得各分级部分的化学组分及其放射性进行了测定。

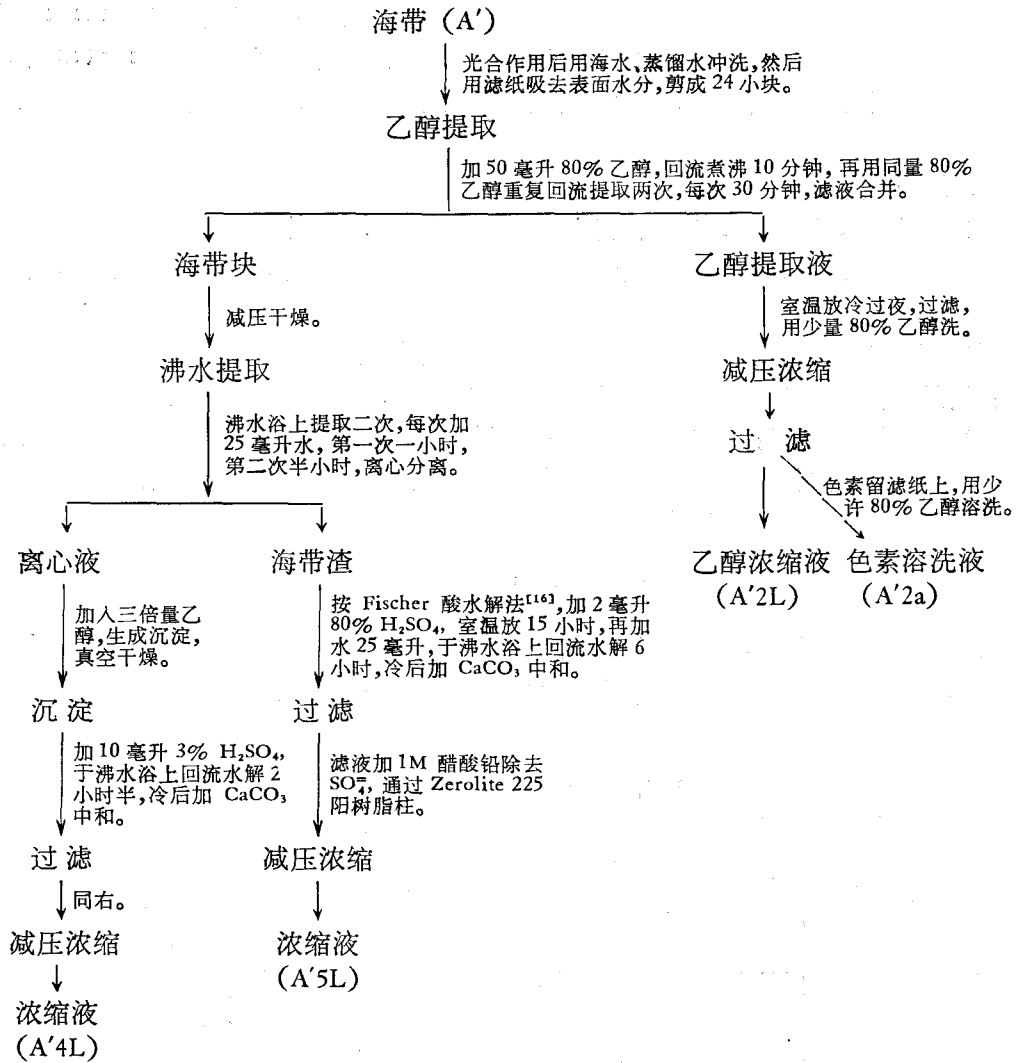


图 3 海带的分级图解(以实验号 A' 为例)

将各浓缩液进行纸层析, 分离各化合物。以实验 A' 为例, A'2L 用以测定乙醇可溶性代谢物的放射性, 主要应为甘露醇、各种氨基酸等; A'5L 系海带经乙醇、沸水提取后的酸水解液, 用以观察组成褐藻酸的糖类的分布; A'4L 为热水提取物(含海带淀粉、褐藻糖胶等), 测定糖类的分布, 1963 年未测, 只在 1964 年实验中做过 D4L 的纸层析。

#### 4. 纸层析方法

取 0.02 毫升样品在杭州新华造纸厂层析纸上点样。

(1) 氨基酸: 用  $23 \times 19$  厘米层析纸, 以上行法做双向层析。层析系统<sup>[3]</sup>的第一向为正丁醇-甲酸-水 (15:3:2); 第二向为正丁醇-12% 氨水 (13:3)。显色剂为 0.5% 茚三酮的丙酮 (95%) 溶液。

(2) 甘露醇: 用氨基酸同样方法点样、层析。显色剂为 1%  $\text{KMnO}_4$  的 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液<sup>[22]</sup>。

(3) 糖类: 上行法所用层析纸为  $28 \times 46$  厘米, 用正丁醇-吡啶-苯-水 (5:3:1:3) 作层析剂<sup>[18]</sup>; 下行法用层析纸为  $52 \times 19$  厘米, 用乙酸乙酯-吡啶-乙酸-水 (5:5:1:3) 作层析剂, 吡啶-乙酸乙酯-水 (11:40:6) 作饱和剂<sup>[15]</sup>。显色剂为 1% 甲氧苯胺盐酸的正丁醇液<sup>[21]</sup>。

### 5. 放射技术

(1)  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ : 比度 77.2 毫居里/克, 每个实验约用 0.006 克, 约为 500 微居里。

$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ : 比度 1 毫居里/毫升。取 5 毫升稀释至 200 毫升, 取 10 毫升(约 250 微居里)加至 450 毫升海水中。

(2) 自射线照相: 将上海或 Agfa X 射线感光片与放射性样品叠放于两块木板(涂黑漆, 相接触面衬以黑橡皮板)中, 用螺丝夹紧使感光 5—10 天, 然后以常法显影、定影。

(3) 放射性的测量: 用 100 位定标器和钟罩式计数管测定乙醇提取后干海带块、纸层析各斑点(将自照相底片与纸层析图谱相对应, 剪下各带放射性的纸层析斑点), 以及滴于滤纸上的乙醇提取液的每分钟计数 (cpm)。

## 二、实验结果

1963 年使用了  $^{14}\text{CO}_2$  气体法与  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  海水法对海带叶片进行不同时间, 即 1、3、4、6、12 小时的光照实验。经乙醇提取, 按前述分级方法处理, 得到各部分的放射性如表 1 所示。

表 1 不同光照时间各部分中的放射性

$^{14}\text{C}$ 源	实验号	光照时间 (小时)	放射性 ( $\text{cpm} \times 10^{-4}$ )				乙醇提取液 放射性对总 放射性的% $\frac{c \times 100}{a + b + c}$
			海带块经乙 醇提取后干 海带块 a	色素的乙 醇溶洗液 b	乙醇提取 液 c	海带渣水 解浓缩液	
$^{14}\text{CO}_2$ 气体	A'	1	2.36	0.78	58	0.21	95
	B'	3	3.97	1.98	127	0.98	96
	C'	4	5.52	2.59	114	1.17	93
	D'	6	2.26	4.65	155	1.38	96
	E'	12	13.29	11.79	397	2.84	94
$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 海水	A	1	0.15	0.1	22	—	90
	B	3	0.35	0.09	40	—	90
	C	4	0.57	0.39	38	—	80
	D	6	1.0	0.72	71	—	81
	E	12	1.81	1.1	92	—	76

(注: 各项放射性计数都已减去对照空白值, 以下同。)

由表 1 结果看, 在  $^{14}\text{CO}_2$  气体中随光合作用时间增长, 乙醇提取液中放射性亦逐增, 主要因  $^{14}\text{C}$  逐渐结合到乙醇可溶成分中。乙醇经蒸发浓缩后留下的色素中放射性也随时间有所增加。同时, 海带块中放射性也随光照时间而急增。乙醇所溶成分中放射性为乙醇、色素和海带块总放射性的 93—96%。  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  海水处理者, 其乙醇提取液的放射性对总放射性的%随光照时间而稍有减少, 由光照 1 小时的 90% 降至 12 小时的 76%, 虽然

各部分的放射性的绝对值仍然是逐增。

乙醇提取液用纸层析展开,然后用X感光片自射线照相(如图4),将层析图谱与自照相重叠比较其相对位置,如图5所示。

从12小时光合作用后的乙醇提取液纸层析图谱(图5)可看到天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸,以及原点a、紫红色点b(碱性氨基酸?)、土黄色点等未知物。土黄色点在糖显色时呈白色。自射线照相与纸层析图谱相对应图表明,天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸已被 $^{14}\text{C}$ 标记,原点a、紫红色点b和斑点5都呈现有放射性,而大量放射性在b、c、d处。与自显影相对应的纸层析各斑点的放射性强度如表2所示。

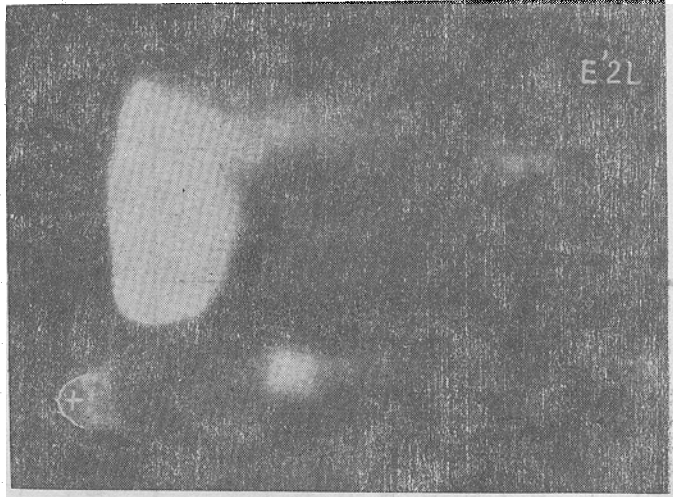


图4 1963年海带的乙醇提取液(E'2L)双向纸层析图谱的自射线照相

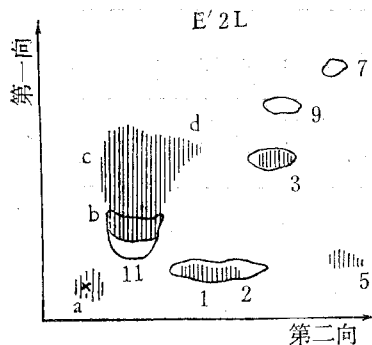


图5 1963年海带的乙醇提取液(E'2L)双向纸层析图谱与自射线照相的对应图

图中直线为放射性;圈线为茚三酮显色点。  
1.天门冬氨酸 2.谷氨酸 3.丙氨酸  
5.未知物 7.缬氨酸 9.脯氨酸 a.原点  
b + c + d.甘露醇 11.未知物(茚三酮显黄色)

的11点在1963年部分包括在b点中。黄色斑点的形状与位置,在两年的图谱上有所不同。两年的自射线照相也稍有差异。

1964年各光照条件下的纸层析图谱各点的放射性测量结果如表3所示。

以 $^{14}\text{CO}_2$ 气体光照12小时为例,1964年同1963年的纸层析图谱的放射性大致相似。1964年的天门冬氨酸和谷氨酸(1+2点)少一些,但丙氨酸却高了一个量级。1963年的

表2结果表明, $^{14}\text{CO}_2$ 气体处理者,乙醇提取液经纸层析展开的各种氨基酸中,以天门冬氨酸放射性最强,其次为丙氨酸、谷氨酸。并且放射性都随光照时间而增强。乙醇提取液的放射性总强度由1小时的 $60 \times 10^4$ 增至12小时的 $594 \times 10^4$  cpm,即增加10倍。 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 处理者进入可溶性化合物的放射性很少。

1964年实验(参看表3)中对海带的光照条件大多与1963年 $^{14}\text{CO}_2$ 气体法相同。实验C、D、F则在光照前后各暗固定半小时;I加强光照强度(8支20W灯管);F用循环 $^{14}\text{CO}_2$ 海水(8支灯管)。海带经光照后用乙醇提取,其纸层析图谱与放射性自射线照相相对应,如图6所示。自射线照相如图7。

将图6的1964年海带乙醇提取液的纸层析图谱及自射线照相的对应图,与1963年者(图5)相比,氨基酸种类增加了亮氨酸、异亮氨酸和酪氨酸。1964年的

表 2 1963 年海带乙醇可溶物质的纸层析图谱的放射性

$^{14}\text{C}$ 源	实验号	光照时间 (小时)	放 射 性 ( $\text{cpm} \times 10^{-4}$ )								b + c + d 对总放射 性的%
			纸层析图谱 各点总和	1 (天门冬氨酸)	2 (谷氨酸)	3 (丙氨酸)	5 (未知物)	b	c	d	
$^{14}\text{CO}_2$ 气体	A'2L	1	60	0.53	0.06	0.46	0.99	31	16	9	93
	B'2L	3	143	2.38	0.35	1.67	0.35	60	51	24	94
	C'2L	4	161	5.73	0.55	2.11	1.04	30	75	43	92
	D'2L	6	252	4.61	0.67	0.29	2.94	80	121	36	94
	E'2L	12	594	8.24	1.48	1.88	2.83	244	262	64	96
$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 海水	D2L	6	5	0	0	0	—	—	—	5 (b + c + d)	
	E2L	12	12	0.41	0.18	0	—	3	7		

表 3 1964 年海带乙醇可溶物质纸层析图谱的放射性

$^{14}\text{C}$ 源	实验号	光照时间 (小时)	放 射 性 ( $\text{cpm} \times 10^{-4}$ )										b + c + d 对总放射 性的%	
			纸层析各 点总和	1+2 (天门冬氨 酸+谷氨酸)	3 (丙氨酸)	4	5	6	7 (缬氨酸)	8 (异亮氨酸)	11	a (原点)		b + c + d
$^{14}\text{CO}_2$ 气体	A2L	3 (6灯)	438	63.48	23.74	4.66	无	无	0.28	0.34	无	13.08	332	77
	B2L	12 (6灯)	574	35.85	50.94	20.91	3.24	1.53	1.32	0.99	153	13.83	444	77
$^{14}\text{CO}_2$ 气体	*C2L	3 (6灯)	220	33.7	23.75	1.25	无	痕	无	无	痕	7.13	154	70
	*D2L	12 (6灯)	569	31.41	27.08	3.05	无	无	无	0.55	无	12.90	494	87
循环 $^{14}\text{CO}_2$ 海水	*F2L	3 (8灯)	53	7.49	13.22	无	无	无	无	无	无	1.4	31	59
	*I2L	3 (8灯)	641	60.48	57.96	4.4	无	无	无	0.48	无	14.0	504	79

\* 光照前后各暗固定半小时。

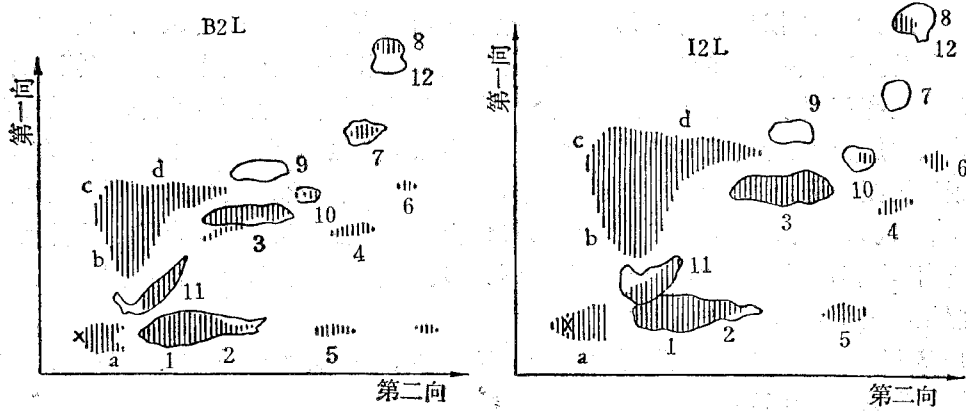


图 6 1963 年海带乙醇提取液 B2L, I2L 双向纸层析图谱与自射线照相的对应图

图中直线为放射性; 圈线为茚三酮显色点。 4、5、6. 未知物(茚三酮显紫红色)

8. 亮氨酸 10. 酪氨酸 12. 异亮氨酸 (其他说明同图 5)

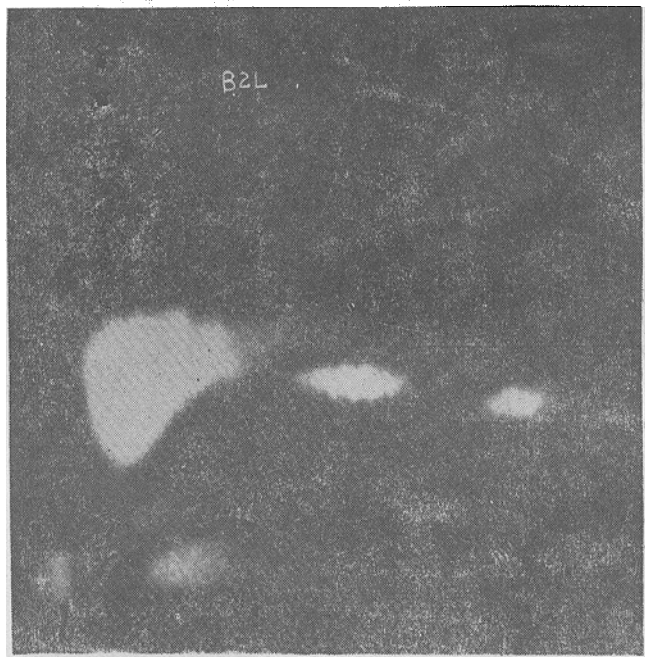


图 7 1964 年海带的乙醇提取液 (B2L) 双向纸层析图谱的自射线照相

b + c + d (主要为甘露醇) 放射性对总放射性为 92—94%；1964 年只为 59—87%。

图 4—7 中相当于 b、c、d 各点的放射性都比较高, 但在纸层析上对茚三酮不显色, 我们认为可能是甘露醇。对标准甘露醇及各样品的乙醇提取液的层析纸以  $\text{KMnO}_4$  的碱溶液喷雾, 背景呈紫红色, 甘露醇层析点逐渐呈米黄色, 凉干后背景为黄褐色, 斑点变成白

色。不论只用标准甘露醇或标准甘露醇与样品的混合液(如 E'2L) 点样,出现的斑点都与图 5、6 的 b、c 位置相对应(图 8)。d 处估计是 c 的拖尾。由此证实 b、c、d 放射性大斑点主要是甘露醇。图 5 表明 b 与呈紫色反应的放射性点相连接;在图 6 中则互相分开来。

1963 年经乙醇、沸水提取后的海带渣加酸水解,纸层析展开,显示出来的图谱由于杂质及连续水解产物的影响,各斑点之间有拖尾现象。光照 12 小时的酸水解液(E'5L)的下行纸层析图表明,放射性大多停留在原点,少量向 2、3 点扩散。1、2、3 各点的放射性分别为 14,300、2,700、1,800cpm(图 9 a)。1964 年海带渣酸水解液(D5L)的纸层析图谱与 1963 年相似,但放射性有增加,<sup>14</sup>C 已参入到 2、3、4 等各种糖醛酸组份中(图 9 b)。其自射线照相如图 10。

1963 年海带块的沸水提取物经酸水解,其上行纸层析图谱表明 <sup>14</sup>C 已参入到葡萄糖、褐藻糖和木糖中(图 11)。

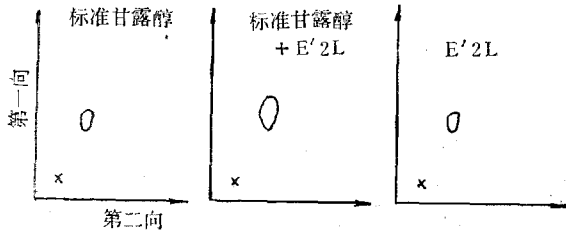


图 8 甘露醇的双向纸层析图谱

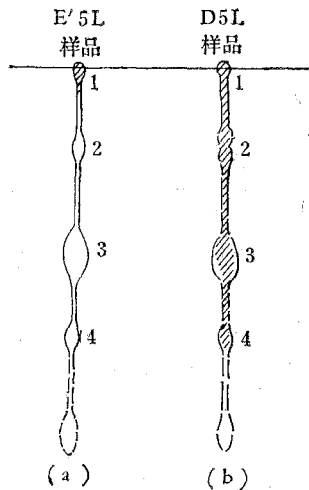


图 9 1963 年 (a) 和 1964 年 (b) 海带渣酸水解液的下行纸层析图谱

图中斜线为放射性;圈线为显色图。

- 1. 原点 2. 甘露糖醛酸 + 古罗糖醛酸
- 3. 甘露糖醛酸内酯 4. 古罗糖醛酸内酯

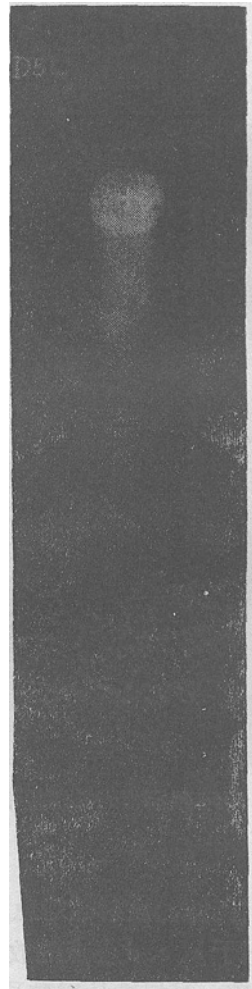


图 10 D5L 的纸层析图谱的自射线照相

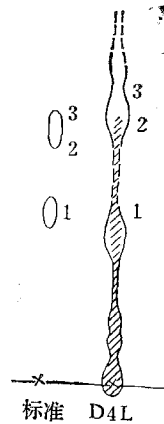


图 11 1963 年海带块的沸水提取物酸水解液的上行纸层析图谱

图中斜线为放射性;圈线为显色图。

- 1. 葡萄糖 2. 木糖
- 3. 褐藻糖



### 三、讨 论

从表 1 结果看,海带于  $^{14}\text{CO}_2$  气体中光合作用,各部分的代谢速度相当快,乙醇可溶成分的生成,随光照时间而逐增。 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  海水处理者因所用  $^{14}\text{C}$  放射强度比  $^{14}\text{CO}_2$  气体处理者低一半,故各部分的放射性约低一个量级。其乙醇可溶成分对总放射性的%随光照时间而减低。而 Bidwell 等<sup>[12]</sup>用墨角藻试验在  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  和通入  $^{14}\text{CO}_2$  气体的海水中的光同化作用,表明  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  的效果为好。

表 2 结果表明乙醇可溶化合物中,生成最快的为天门冬氨酸,其次为丙氨酸、谷氨酸。Akagawa 等<sup>[5]</sup>用褐藻以  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  处理,得知早期产物中主要为天门冬氨酸、谷氨酸、柠檬酸、丙氨酸等。Karekar 等<sup>[19]</sup>用马尾藻、石蓴等试验 10 秒钟短时间的同化作用, $^{14}\text{C}$  代谢产物首先大量出现的是天门冬氨酸,其次为 PGA、PEP (烯醇式磷酸丙酮酸)。因此,他们认为海藻中同时存在 HSK 途径和 Calvin 途径。据 Patil 等<sup>[23]</sup>报道,石蓴经短时间光照的  $^{14}\text{C}$  代谢产物为天门冬氨酸。Stepka 等<sup>[25]</sup>早已提出单胞藻光照的早期产物为天门冬氨酸,丙氨酸次之。而 Calvin 等<sup>[13]</sup>用淡水小球藻试验  $^{14}\text{C}$  暗固定的初期代谢产物主要为谷氨酸、苹果酸、柠檬酸等。Bidwell<sup>[7]</sup>在  $^{14}\text{CO}_2$  气体的海水中用掌状海带和阿格海带 (*Laminaria agardhii*) 光照 4—6 小时的光同化实验中表明,游离氨基酸中以丙氨酸放射性最强,其次为天门冬氨酸和谷氨酸。人们早就知道,在藻类中天门冬氨酸、丙氨酸、谷氨酸等是光同化的早期产物,再经氨基移换作用而形成其他氨基酸;而这些  $\text{C}_3$ 、 $\text{C}_4$  氨基酸来自丙酮酸和草酰乙酸。

在 1964 年实验中,于光照前后各暗固定半小时(见表 3),结果是:纸层析图谱的天门冬氨酸+谷氨酸和丙氨酸斑点的放射性都比未暗固定者为高;而 4、5、6 点未知物、缬氨酸、异亮氨酸等各斑点放射性却较低或未出现。这可能经暗固定,有的氨基酸转变成高分子化合物。Craigie<sup>[24]</sup>用墨角藻、多管藻光照后试验暗固定,其早期(2 分钟)产物为谷氨酸、天门冬氨酸;15 分钟才出现丙氨酸;暗固定 24 小时,代谢产物无明显变化。

不论是 1963 年或 1964 年的  $^{14}\text{CO}_2$  气体法或  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  海水法,其最初和大量积累的  $^{14}\text{C}$  代谢产物为甘露醇。以  $^{14}\text{CO}_2$  气体法光照 12 小时为例,1963 年甘露醇放射性对总强度为 92—94%,1964 年为 59—87%。Bidwell 等<sup>[8]</sup>对墨角藻用通入  $^{14}\text{CO}_2$  的海水进行光合作用试验,结果表明,乙醇中甘露醇的放射性为总放射性的 88—95%,而以  $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$  海水处理者为 72—78%。即通入海水的  $^{14}\text{CO}_2$  极易被植物同化。我们 1964 年虽试用  $^{14}\text{CO}_2$  通入海水,但表 3 纸层析图谱(F2L)的总放射性,以及天门冬氨酸+谷氨酸、a 点、甘露醇等的放射性都比  $^{14}\text{CO}_2$  气体法低一个量级。这可能因循环  $^{14}\text{CO}_2$  气体需充满图 2 整个光合系统,与藻体接触的  $^{14}\text{CO}_2$  量相对地比图 1 气体法少得多。另外,Steemann Nielsen<sup>[24]</sup>用淡水植物试验,证实  $\text{CO}_2$  不用能量就能从外面扩散到植物体内;而  $\text{HCO}_3^-$  是离子,吸收需要能量,故  $\text{CO}_2$  比  $\text{HCO}_3^-$  的光合速度要快得多。而海水中的总  $\text{CO}_2$  只有 1% 为游离  $\text{CO}_2$ ,90% 为  $\text{HCO}_3^-$  态。Bidwell 等<sup>[8,9]</sup>认为甘露醇可能是光合作用的最终产物,或者是暂时贮藏化合物,而不是活跃的代谢物,也不是褐藻胶的前体。1964 年海带乙醇提取液的茚三酮三酮显色图谱有天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、酪氨酸等,比作者<sup>[2]</sup>过去用 7 月份以前的海带测出的游离氨基酸多了后三种。这可能是渡夏后的 11

月衰老海带的特点。虽经不同光照时间, $^{14}\text{C}$ 始终没有结合到脯氨酸和异亮氨酸中去。图5和图6中尚有几个茛三酮不显色,但有明显的放射性的斑点(如4、5、6、11和原点a),这些是否是文献[13]中曾提到的如磷酸甘油酸、丙酮酸、磷酸糖类等早期代谢物,因未用标准化合物比较,尚未能确定。

1963年经乙醇、沸水提取后的海带渣,随光照时间增长,其酸水解液中的放射性也递增。这里面主要含有褐藻胶的糖醛酸组分,还可能包括一部分蛋白质-氨基酸。图9a图谱表明,原点处集中了较多的放射性物质,估计是蛋白质-氨基酸。展开的各单糖醛酸组分,同Linker等<sup>[20]</sup>的纸层析图谱(同样层析条件)相对照,2、3、4各点分别相当于D-甘露糖醛酸(M)+L-古罗糖醛酸(G)(2)、D-甘露糖醛酸内酯(3)和L-古罗糖醛酸内酯(4),都基本上没有参入 $^{14}\text{C}$ 。但1964年的海带渣的酸水解液图谱的放射性,自原点向下各点逐渐扩散, $^{14}\text{C}$ 已程度不同地参入到上述四种糖组分中。Abe等<sup>[4]</sup>用 $^{14}\text{CO}_2$ 试验褐藻酸的生物合成,证实褐藻酸各化学组分的合成速度为:  $M > MG > G$ ,从图9a、b结果看,在褐藻酸分解物中占大比例的甘露糖醛酸内酯(3点)比古罗糖醛酸内酯较早参入 $^{14}\text{C}$ ,这一方面说明海带褐藻酸中主要含甘露糖醛酸,而且这种酸在代谢中合成速度也较快。在多糖的生成途径方面,尚需作更细致的研究。

1963年海带沸水提取物的酸水解液层析图谱显示,放射性进入了葡萄糖、木糖等中,即经6小时光照,海带淀粉中已参入 $^{14}\text{C}$ 。

我们在实验中所用的海带都是在深水中渡夏的衰老个体,藻体上都带有孢子囊。实验表明,不论在 $^{14}\text{CO}_2$ 或 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 溶液中,光同化仍是很旺盛的。虽然在 $^{14}\text{CO}_2$ 气体中,同在自然界含 $^{14}\text{CO}_2$ 的海水中的光合作用效率是会有差异的,但从实验结果看,海带虽长时间离开海水,代谢仍很活跃,初级代谢产物与在海水中的实验基本是相似的。

#### 四、小 结

1963—1964年用人工培育的海带叶片分别置于 $^{14}\text{CO}_2$ 气体中,以及含 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 的海水和含 $^{14}\text{CO}_2$ 的海水中进行了不同时间(由1至12小时)的光合作用;用纸层析法观察了藻体的乙醇提取液中可溶氨基酸等有机物质的分布,以及提取后的海带块的酸水解液中的糖组分分布;测定了各层析点的放射性;并用X感光片对纸层析图谱的放射性进行了自射线照像。

$^{14}\text{CO}_2$ 气体处理后的乙醇提取液中的放射性,一般随光照时间的延长而增高。1963年实验表明,12小时光照比1小时者的放射性约大10倍。海带块中的放射性也随光照时间而增高。

$^{14}\text{CO}_2$ 处理后的乙醇提取液的纸层析图谱表明,1963年海带有天门冬氨酸、丙氨酸、谷氨酸、脯氨酸、缬氨酸等游离氨基酸存在;1964年海带中除这些氨基酸外,尚出现酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等。1963年出现的带放射性化合物的放射性强度顺序为:甘露醇、天门冬氨酸、丙氨酸、谷氨酸等。1964年海带中则尚有带放射性的缬氨酸、异亮氨酸及二、三个未知物出现。乙醇提取液中甘露醇的放射性对总放射性之比,1963年和1964年的实验中分别为92—94%和59—87%。

$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ 处理者,只在光照12小时的乙醇提取液中有较少的放射性甘露醇、天门冬

氨酸和丙氨酸;而光照 6 小时者,只甘露醇有较少的放射性,其他氨基酸未被标记。

海带渣酸水解液的 1963 年纸层析图谱表明,有甘露糖醛酸、古罗糖醛酸、甘露糖醛酸内酯、古罗糖醛酸内酯等糖类的出现,但除原点有较多的放射性外,大多数糖未被标记。1964 年的图谱中,放射性自原点向其他各斑点有较长的扩散,上述糖类大部分有不同程度的放射性标记,看来甘露糖醛酸内酯较早较多地参入了  $^{14}\text{C}$ 。

1964 年海带块的热水提取物的酸水解液中各糖分也有一定程度的  $^{14}\text{C}$  标记。

### 参 考 文 献

- [1] 纪明侯、张燕霞, 1960. 我国经济褐藻的化学成分研究 I. 各种经济褐藻的主要化学成分. 海洋与湖沼 4(3-4):161-168.
- [2] 纪明侯、蒲淑珠、曹文达、张敬芝, 1976. 海带中各种形态氨基酸含量的季节变异. 海洋科学集刊 11:7-23.
- [3] 陈丽筠, 1958. 氨基酸的定量滤纸层析法 III. 一对新的溶剂系统. 生化学报 1:19-22.
- [4] Abe, K., T. Sakamoto, S. F. Sasaki and K. Nisizawa, 1973. *In vivo* studies on the synthesis of alginic acid in *Ishige okamurai*. *Bot. Mar.* 16: 229-234.
- [5] Akagawa, H., T. Ikawa and K. Nisizawa, 1972. Initial pathway of dark  $^{14}\text{CO}_2$ -fixation in brown algae. *Ibid.* 15: 119-125.
- [6] Been, R. C. and W. Z. Hassid, 1955. Assimilation of  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  by a photosynthesizing red alga, *Iridophycus flaccidum*. *J. Biol. Chem.* 212: 411-425.
- [7] Bidwell, R. G. S., 1958. Photosynthesis and metabolism of marine algae II. A survey of rates and products of photosynthesis in  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ . *Can. J. Bot.* 36: 337-349.
- [8] Bidwell, R. G. S., J. S. Craigie and G. Krotkov, 1958. Photosynthesis and metabolism in marine algae III. Distribution of photosynthetic carbon from  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  in *Fucus vesiculosus*. *Ibid.* 36: 581-590.
- [9] Bidwell, R. G. S. and N. R. Ghosh, 1962. Photosynthesis and metabolism in marine algae IV. The fate of  $\text{C}^{14}$ -mannitol in *Fucus vesiculosus*. *Ibid.* 40: 803-807.
- [10] Bidwell, R. G. S. and N. R. Ghosh, 1963. Photosynthesis and metabolism in marine algae V. Respiration and metabolism of  $\text{C}^{14}$ -labelled glucose and organic acids supplied to *Fucus vesiculosus*. *Ibid.* 41: 155-163.
- [11] Bidwell, R. G. S. and N. R. Ghosh, 1963. Photosynthesis and metabolism in marine algae VI. The uptake and incorporation of sulfate- $\text{S}^{35}$  in *Fucus vesiculosus*. *Ibid.* 41: 209-220.
- [12] Bidwell, R. G. S. and J. S. Craigie, 1963. A note on the greatly reduced ability of *Fucus vesiculosus* to absorb or evolve  $\text{CO}_2$  when not submerged. *Ibid.* 41: 179-182.
- [13] Calvin, M., J. A. Bassham, A. A. Benson, V. H. Lynch, C. Ouellet, L. Schou, W. Stepka and N. E. Tolbert, 1951. Carbon dioxide assimilation in plants. In "Carbon dioxide fixation and photosynthesis". *Symp. Soc. Exptl. Biol.* 5: 284-305.
- [14] Craigie, J. S., 1963. Dark fixation of  $\text{C}^{14}$ -bicarbonate by marine algae. *Can. J. Bot.* 41: 317-325.
- [15] Fischer, F. G. und H. Dörfel, 1955. Die papierchromatographische Trennung und Bestimmung der Uronsäuren. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 301: 224-234.
- [16] Fischer, F. G. und H. Dörfel, 1955. Die polyuronsäuren der Braunalgen (Kohlenhydrate der Algen I). *Ibid.* 302: 186-203.
- [17] Holm-Hansen, O., 1962. Assimilation of carbon dioxide. In "Physiology and Biochemistry of algae", Edited by R. A. Lewin, 25-45.
- [18] Hough, L. 1950. Application of paper partition chromatography to the separation of the polyhydric alcohols. *Nature*, 165: 400.
- [19] Karekar, M. D. and G. V. Joshi, 1973. Photosynthetic carbon metabolism in marine algae. *Bot. Mar.* 16: 216-220.
- [20] Linker, A. and R. S. Jones, 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* micro-organism. *Nature*, 204: 187-188.
- [21] Partridge, S. M., 1949. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature*, 164: 443.
- [22] Paseu, E., T. P. Mora, and P. W. Kent, 1949. General method for paper chromatographic ana-

- lysis of reducing and nonreducing carbohydrates and derivatives. *Science*, 110: 446—447.
- [23] Patil, B. A. and G. V. Joshi, 1970. Photosynthetic studies in *Ulva lactuca*. *Bot. Mar.*, 13: 111—115.
- [24] Steemann Nielsen, E., 1975. Marine photosynthesis with special emphasis on the ecological aspects. Elsevier Scient. Pub. Co. 141 pp.
- [25] Stepka, W., A. A. Benson and M. Calvin, 1948. The path of carbon in photosynthesis II. Amino acids. *Science*, 108: 304.
- [26] Yamaguchi, T., T. Ikawa, K. Nisizawa, and S. Nemoto, 1966. Incorporation of radioactive carbon from  $H^{14}CO_3^-$  into sugar constituents by a brown algae, *Eisenia bicyclis*, during photosynthesis and its fate in the dark. *Plant Cell Physiol.* 7: 217—229.

## STUDIES ON THE INITIAL PRODUCTS OF $^{14}C$ METABOLISM IN *LAMINARIA JAPONICA*\*

Ji Minghou

Pu Shuzhu and Ji Xiangli

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica*)

### Abstract

We carried out photosynthetic experiments from 1 hr to 12 hrs with cultivated *Laminaria japonica* frond in  $^{14}CO_2$  gas, in  $NaH^{14}CO_3$ -containing seawater, and in  $^{14}CO_2$ -containing seawater, and studied the distribution of alcohol soluble compounds in EtOH extractives and of sugars in the acid hydrolyzates using paper chromatographic and autoradiographic methods.

The radioactivities in alcohol soluble fractions in case of both  $^{14}CO_2$  gas and  $NaH^{14}CO_3$ -containing seawater in general increased with the time of illumination. As shown in 1963's experiments the radioactivities in two cases after 12 hrs illumination were seven times and five times greater than that after 1 hr illumination, respectively. The radioactivities in *Laminaria* residue after alcoholic extraction also increased with the time of illumination. The paper chromatograms of alcohol soluble fractions in case of  $^{14}CO_2$  gas showed the presence of free amino acids as Asp, Ala, Glu, Pro, Val and mannitol in 1963's experiments, and with the addition of Tyr, Leu and Ile in 1964's experiments. The order of radioactivities in chromatograms generally was: mannitol > Asp > Ala > Glu. Besides those, radioactive Val, Ile and some unknown compounds were also appeared. The radioactivity of mannitol was 92—94% and 59—87% of the total ones in EtOH extracts in 1963 and 1964, respectively. Apart from a small amount of radioactive mannitol, almost no radioactivity was found in other chromatograms in case of 6 hr illumination in  $NaH^{14}CO_3$ -containing seawater, and even after 12 hrs illumination it still showed only little radioactivity in mannitol, Asp and Ala.

The paper chromatograms of sugars in hydrolyzate of *Laminaria* residue showed that no  $^{14}C$  was incorporated into them, and a considerable amount of radioactivities still remained near the original spot in 1963's experiments. But from 1964's experiments it was apparent that some  $^{14}C$  were incorporated into mannuronolactone and other uronic acids according to the pattern of paper chromatograms of Linkers et al. The acid hydrolyzate of hot water extractive from *Laminaria* also gave radioactivities in the chromatograms corresponding to fucose and xylose in 1964's experiments.

\* Contribution No. 560 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.