

海带浸泡液腐植质的分离及其性质*

纪明侯 张鸿声

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 对海带综合利用生产中剩下的浓缩浸泡液所含腐植质进行了分离, 并对分离出的腐植酸、富里酸和乙醇可溶物三级分做了化学表征和性质研究, 包括三级分的得率、紫外和红外光谱分析, 元素、官能团、氨基酸和总糖含量分析, 分子量分布, 以及它们对鱼卵生长和褐藻酸钠粘度的影响。

关键词 海带 腐植质 分子量

早有报道, 褐藻在海中生长时能分泌出含多酚类化合物, 构成沿岸海水中总黄色物质 (gelbstoff) 的重要组分^[1]。Rashid 从褐藻的分解液和渗出液中分离过腐植质, 并对从其中分级出的腐植酸和富里酸进行了化学表征^[2]。

已知, 腐植质存在于陆地土壤和水环境中, 都是生物有机体的死骸和分解物经长时期的微生物和化学作用而生成的, 是一类含有多官能团的结构复杂、性质稳定的广分子量范围的混合有机物质^[3]。已从海水中分离出腐植质, 并分级出腐植酸 (HA)、富里酸 (FA) 和乙醇可溶物 (ES) 三个级分^[4]。

“海带浸泡液”即经分离出碘和甘露醇后的母液, 其中尚会含有一定量的甘露醇、氨基酸、其他有机物质和大量无机盐类。海带浸泡液在 200nm 波长附近有强的吸收峰, 而且所含褐色色素不被活性炭吸附, 由此推断, 其中可能含有腐植质。本文系对海带浸泡液腐植质的分离及其性质研究的报告。

一、实验材料与方法

1. 实验材料

海带 (*Laminaria japonica*) 浸泡液系取自青岛市某海带综合利用厂, 呈深褐色, 比重 1.26。

2. 实验方法

(1) 前处理 取 2 200ml 浸泡液先以脱脂棉, 后用双层滤纸抽空过滤, 得滤液 2 000 ml, 加蒸馏水稀释至 20 000ml。然后以浓盐酸调至 pH = 2, 再以双层滤纸抽滤, 除去杂

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2075 号。
曹文达研究员在工作中给予热情帮助, 特志谢忱。
接受日期: 1990 年 2 月 8 日。

质。

所用 GDX-102 树脂(60—80 目, 天津试剂二厂产品)以乙腈和苯交替萃取数次, 除去夹杂的有机物质^[1]。

(2) 通过 GDX-102 树脂层析柱分级 将酸化的浸泡液逆向通过 GDX-102 树脂层析柱 ($\phi 3.8 \times 32\text{cm}$), 流速为 5ml/min, 通柱约 60 小时, 树脂柱呈浅棕色。水洗至无 Cl^- 反应。然后逆流通入 1mol/L NH_4OH 溶液洗脱, 至流出液呈浅橙色或无色为止。将洗脱液减压浓缩至 30—40ml, 加浓盐酸调至 $\text{pH} = 2$, 静置 2 天, 离心。将生成的 HA 分离出, 溶于少量温水或 1mol/L NH_4OH 溶液中, 冻干。离心清液经浓缩至 10 ml, 冻干, 即为 FA 干品。

然后将层析柱以 95% 乙醇洗脱至无色, 离心、减压浓缩至约 10ml, 冻干, 为 ES 干品^[1]。

(3) 光学和化学分析 紫外吸收曲线用德国 SPECORD UV-VIS 分光光度计测定。红外吸收光谱是取干样品加 KBr 压片, 以 Leitz Wetzlar Model III G 红外光谱仪测定。

C, H, N 元素含量用 Carlo Erba 自动元素分析仪测定, S 以硫酸钡法分析, O 以差减法算出。总酸性基、羧基、醌基、甲氧基等官能团含量是由中国科学院山西煤炭化学研究所分析。总酚含量以 Folin-Denis 试剂法^[6]测定。即取 20mg 试样, 溶于 100ml 水中, 取 5ml, 加入 0.5ml 该试剂, 摇匀, 3min 后加入 1ml 饱和碳酸钠溶液, 加水稀释至 10 ml。1h 后, 于 760nm 波长下比色测定, 以间苯三酚作工作曲线。总糖含量测定, 取样品以 0.5mol/L 硫酸加热水解 5h 后以 Dubois 等的苯酚-硫酸法^[6]分析。氨基酸含量测定, 取样品以 6mol/L HCl 于 105°C 加热水解 48h, 加活性炭脱色后以日立 835-50 型氨基酸分析仪测定。

(4) 分子量测定 根据 Rashid 等凝胶过滤法^[12], 先以 NaOH-甘氨酸缓冲液分别配制 HA, FA 和 ES 的标准系列, 于 450nm 波长下测定光密度, 制成工作曲线, 然后分别填充 Sephadex G-10, G-15, G-25, G-50 和 G-75 (Pharmacia 公司产品) 层析柱 ($\phi 2.4 \times 36\text{cm}$)。各柱分别注入 5ml (含 10mg 样品) 的 HA, FA 和 ES 试液, 再注入 2ml NaOH-甘氨酸缓冲液。恒压通水洗脱(流速为 25ml/h)。收集计算量的流出液, 于 450nm 波长下测定光密度, 计算流出液中相当分子量的腐植质含量 (mg), 即为排阻部分。由 10mg 减去此值, 即为滞留在凝胶中的较低分子量腐植质的量。这样, 计算出 FA, HA 和 ES 分子量在 <700, 700—1500, 1500—5000, 5000—10000 和 >10000 范围的百分比。

(5) 腐植质对鱼卵生长的影响 试验中, 所用 HA, FA 和 ES 的浓度各为 2, 0.4, 0.08, 和 0.016mg/ml 4 组。于培养杯中分别加入 2ml 过滤海水, 在解剖镜下吸取 20 个正常生长的文昌鱼卵子, 然后各加入上述系列试液 0.1ml, 室温培养 12h, 观察卵子的孵化状况。

(6) 腐植质对褐藻胶粘度的影响 分别称取海带 HA, FA 和 ES 各 25mg, 溶于约 10ml 水中 (FA 和 HA 各加入 10—20 滴 0.1mol/L NaOH 溶液) 使其溶解, 定容至 25ml, 浓度约为 1mg/ml。称取数份 0.50g 褐藻酸钠, 分别加入不同体积水, 溶后加入不同量腐植质溶液 (褐藻酸钠浓度为 1%), 于 60°C 水浴中保温 24h, 促其反应。取出, 补充

蒸发水分,于25°C用 Höppler 粘度计测定加温前后的粘度 (CP), 观察粘度下降程度 (%). 然后各试样中加入 1ml 1% Na_2CO_3 溶液 (pH 达 9), 于 60°C 再保温 20h 后, 同上测定粘度。

二、结果与讨论

1. 海带浸泡液中腐植质的分离得率

由海带浸泡液中分离出的 HA, FA 和 ES 的得率如表 1 所示。

表 1 由海带浸泡液分离的腐植质得率 (% , W/W, 对浸泡液)

Tab. 1 The yield of humic substances isolated from macerated liquor of *Laminaria japonica*

腐植质	第一次 2 000ml		第二次 2 000ml		第三次 3 000ml		第四次 3 000ml	
	干重(g)	得率(%)	干重(g)	得率(%)	干重(g)	得率(%)	干重(g)	得率(%)
HA	0.47 ^{a)}	0.019 ^{a)}	1.07	0.043	1.61	0.043	1.39	0.037
FA	1.96 ^{a)}	0.078 ^{a)}	3.34	0.133	4.99	0.133	4.62	0.122
ES	0.86	0.034	0.90	0.036	—	—	—	—

a) 仅供参考。

除第一次分离时,一部分 NH_4OH 洗脱液流出液用作准备试验,以致 HA 和 FA 得率减低外,其余数值表明,浓缩浸泡液中 HA 分离物为 0.46—0.54g/L, 得率约为 0.04%; FA 为 1.54—1.67g/L, 约为 0.12—0.13%; ES 为 0.43—0.45g/L, 约为 0.035% (\bar{W}/\bar{W})。从第二次结果看, HA, FA 和 ES 的总得率约为 0.2% (W/W)。

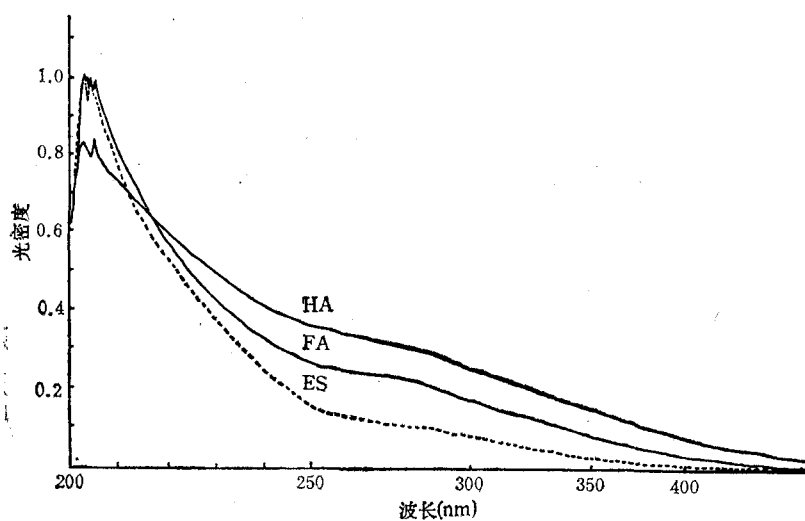


图 1 海带腐植质的紫外吸收光谱图

Fig. 1 The ultraviolet absorption spectra of humic substances from macerated liquor of *Laminaria japonica*

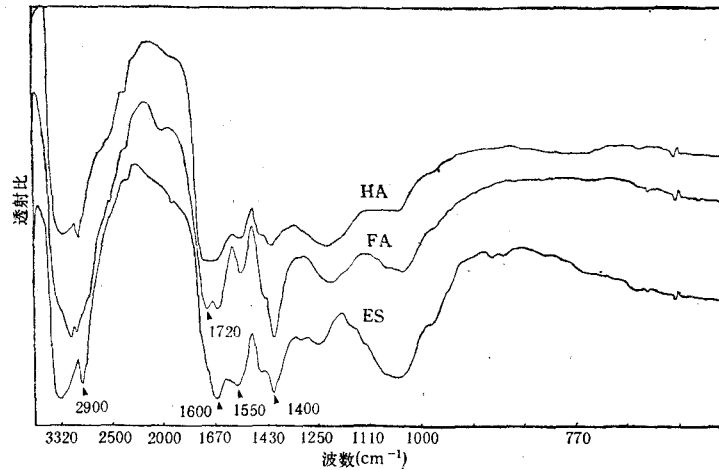


图 2 海带腐植质的红外吸收光谱图

Fig. 2 The infrared absorption spectra of humic substances from macerated liquor of *Laminaria japonica*

2. 紫外和红外吸收光谱

图 1 为浸泡液中的 HA, FA 和 ES 的 0.05mol/L NaHCO₃ 溶液的紫外吸收光谱图。

三个级分都在 205—210nm 波长处有吸收高值, 在 260—280nm 处有一微弱平台, 这与 Craigie 等^[4]对墨角藻尖端培养液所测结果类似。海带腐植质三个级分的红外吸收光谱图如图 2 所示。

HA, FA 和 ES 三级分在 1050cm⁻¹ 的吸收, 表明多糖的 C—O 伸缩。在 1200—1250cm⁻¹ 吸收是因 COOH 的 C—O 伸缩和 OH 变形。在 1400cm⁻¹ 有强吸收, 尤其 FA 的吸收更强, 表示 COO⁻ 的反对称伸缩和酚 OH 的 OH 变形。ES 在 1450—1460 cm⁻¹ (芳香族 C=C) 的吸收峰较明显。三级分, 特别是 FA, 在 1550cm⁻¹ 有较强的吸收, 是由于 N—H 变形, 表明有肽键存在, 而海水腐植质中则几乎不存在^[5]。FA 和 ES 在 1630—1660cm⁻¹ 处的吸收为酰胺基的 C=O 伸缩和醌 C=O。HA 和 FA 在 1720cm⁻¹ 的吸收是因为 COOH 的 C=O 伸缩。ES 在 2900—2940cm⁻¹ 有明显的因脂肪族 C—H 伸缩引起的吸收, 类似于海水 ES 级分^[5]。综合以上吸收峰特征, 海带 HA 与 FA 的

表 2 海带腐植质的元素分析

Tab. 2 The elemental analysis of humic substances of *Laminaria japonica*

级分	C	H	N (%)	S	O ^{a)}	灰分	C/H
HA	49.61	5.78	6.83	1.45	36.33	1.47	8.6
FA	37.44	6.50	10.13	1.22	44.71	0.76	5.8
ES	50.78	7.70	7.11	0.59	33.82	0.36	6.6

a) 由差减法算出。

谱图相似,与海水^[1,7]和土壤^[16]者也近似,但海带 FA 中所含酚 OH、酰胺基、肽键等较明显,ES 中的脂肪族显著。

3. 元素分析

海带浸泡液中的 HA,FA 和 ES 三级分的元素分析结果如表 2 所示。

海带 FA 的 C 含量比海水(46% 左右)^[1]低, C/H 也较低,但 O 和 N 含量则较高。三个级分的 H 含量彼此相近,与海水者(约 6—7%)^[1]也相似。ES 的 C 和 H 含量比 FA 为高, O 含量则较低。这表明脂肪族较多。在其红外吸收光谱图(图 2)上, 2900cm⁻¹ 处的强吸收峰(脂肪 C—H)也说明这一点。海带 HA 和 FA 的 S 含量比 ES 者高,但与海水中 FA 和 ES 的含量(1—1.3%)^[1]大致接近。

4. 官能团分析

海带浸泡液中的 FA 所含特征官能团的含量,经化学分析,所得结果如表 3 所示。

表 3 海带腐植质的官能团分析

Tab. 3 The functional group analysis of humic substances of *Laminaria japonica*

腐植质	总酸性基	羧基	酸性羟基 (meq/g) ^{b)}	醌基	甲氧基	总酚基 ^{a)} (%,对干重)
HA	—	—	—	—	—	13.33
FA	3.17	2.72	0.45	0.78	0.23	5.35
ES	—	—	—	—	—	2.81

a) Folin-Denis 试剂法测定; b) 因样品中有 NH₄Cl, 故测值偏低。酸性羟基=总酸性基-羧基。

因 FA,HA 和 ES 样品中都含有少量 NH₄Cl, 而且本文是对干样品计算,而 Rashid 等是对无灰分物计算的,因而对 FA 的测定值比 Rashid 等对掌状海带的腐败分解物的测值(总酸性基 6.6,羧基 5.9,酸性羟基 0.7meq/g, 无灰干品)^[13]偏低。由 Folin-Denis 试剂法测得的总酚基含量看, HA 中最高,达 13.3%, FA 和 ES 次之。Ragan 等^[11]用同法对泡叶藻 (*Ascophyllum nodosum*) 的多酚含量测定结果是 1 月份约达 13% (对干藻)。

5. 氨基酸与总糖含量分析

对海带浸泡液以及从中分离出的 HA,FA 和 ES 三级分分别分析了氨基酸含量和总糖含量,结果如表 4。

海带浸泡液的腐植质所含蛋白质富于酸性氨基酸: 天冬氨酸(2%)和谷氨酸(3—5%),中性氨基酸中以甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等较多,而碱性氨基酸中赖氨酸最多。HA 与 FA 的各种氨基酸含量大致接近,但 ES 级分中除酸性氨基酸比 HA 和 FA 较低外,其余氨基酸含量都比 HA 和 FA 者为高,其中赖氨酸高达 1.44%。而海水腐植质中 ES 的各氨基酸含量都较 HA 和 FA 者为低^[2]。值得注意的是,海带腐植质中的氨基酸含量(13—18%)比海水腐植质中的含量(1.7—3.1%)^[2]普遍高约 6—10 倍。海带浓缩浸泡液中含有的酸性氨基酸以谷氨酸含量最高,为 11.85mg/L; 其次为天冬氨酸和丙氨酸。总氨基酸含量为 19.3mg/L。

海带腐植质中 ES 级分的总糖含量高达 11.10%,比 HA 和 FA 分别高约 10 和 2

表 4 海带腐植质的氨基酸和总糖含量分析

Tab. 4 The contents of amino acids and total sugars in humic substances from macerated liquor of *Laminaria japonica*

氨基酸	HA	FA	ES	浸泡液中含量 (mg/L)
	(% , 对干重)			
天冬氨酸	2.29	2.22	1.97	3.44
谷氨酸	3.29	5.10	2.57	11.85
丙氨酸	0.93	1.51	1.80	1.49
甘氨酸	1.40	1.10	1.31	0.33
苏氨酸	0.70	0.84	1.41	0.23
丝氨酸	0.51	0.55	0.93	—
缬氨酸	0.90	1.06	1.57	0.64
亮氨酸	0.79	0.66	1.42	0.05
异亮氨酸	0.61	0.62	1.49	0.07
脯氨酸	0.40	0.33	0.83	0.56
胱氨酸	0.22	0.35	0.15	—
甲硫氨酸	0.15	0.11	0.24	0.12
酪氨酸	0.05	—	0.03	0.47
赖氨酸	0.55	0.55	1.44	0.05
精氨酸	0.40	0.21	0.74	—
组氨酸	0.10	—	0.12	—
总氨基酸	13.29	15.21	18.02	19.30
总糖	1.26	5.88	11.10	

倍。

海带中含有相当量的蛋白质和氨基酸、碳水化合物、酚类、脂肪酸、色素等。由以上分析可知，海带浓缩浸泡液的腐植质中也含有这些物质，这与土壤、河水和海水腐植质具有一定的类似性。这是因为海带在用水浸泡过程中，海带所含这些成分部分地溶于水，经过过滤、通过树脂柱、蒸发等长时间的处理工序，在空气存在下经微生物和酶的生化作用，这些混合的成分进行着复杂的分解、聚合等腐植化作用 (humification)^[5] 而生成结构复杂、较稳定的呈褐黄色腐植质。

6. 海带腐植质的分子量测定

用 Sephadex 凝胶过滤法对海带腐植质三级分所测得的分子量范围如表 5 所示。HA

表 5 海带腐植质的分子量范围

Tab. 5 The distribution of molecular weight of humic substances of *Laminaria japonica*

腐植质	分子量范围与百分比 (%)				
	<700	700—1 500	1 500—5 000	5 000—10 000	>10 000
HA	22.0	10.9	37.7	28.3	1.1
FA	20.0	18.0	38.2	23.7	0.1
ES	52.8	21.8	6.8	17.3	1.3

和 FA 的分子量分布基本类似。<700 者占约 20%，<1 500 的占 33—38%，1 500—5 000 者占 38%，即 1 500—10 000 范围者约占 60% 以上。而 ES 的分子量范围比较低，<700 者占 53%，<1 500 者约占 75%。

Rashid 等^[12]对从墨角藻 (*Fucus*) 和海带 (*Laminaria*) 藻体的分解液中分离出的 FA 测得的分子量 <700 者分别为 18% 和 16%，这与本文结果相接近。但所测得的分子量在 5 000—10 000 范围者较高，均为 67%。5 000—10 000 分子量范围分别为 29% 和 8%，但两藻的 HA > 200 000 者分别竟达 21% 和 40%。

纪明侯等^[1]先前用凝胶电泳法对海水 FA 测得的分子量主要分布在 400—700 之间，HA 分子量在 20 000 左右。其 FA 分子量比海带浸泡液中 FA 者要低。Gagosian 等^[7]对沿岸海水测得的 FA 分子量 <1 500 者占 81%，<5 000 者为 99%，即主要是低分子量的。

7. 海带浸泡液腐植质对鱼卵生长的影响

在海洋中海水腐植质的存在对浮游植物有促进生长的刺激作用^[3,9,10]。本试验观察了海带腐植质 FA, HA 和 ES 对文昌鱼卵子的生长影响¹⁾，所得结果如表 6。由表 6 结果看，海带 FA 对文昌鱼卵子的孵化有较明显的抑制作用，随加入浓度的增高而增大；但 HA 和 ES 并未表现出敏感的反应，即使在 0.1mg/ml 浓度下卵子仍可大部分孵化。FA 的抑制作用可能与所含酚类的量与存在形态有关。Sieburth 等^[14]报道过，褐藻分泌物因含有酚类，因而有一定毒性。

表 6 海带腐植质对文昌鱼卵子生长的影响

Tab. 6 The effect of humic substances of *Laminaria japonica* on the growth of amphioxus eggs

卵子孵化情况	FA (mg/ml)				HA(mg/ml)				ES(mg/ml)				对照
	0.1	0.02	0.004	0.0008	0.1	0.02	0.004	0.0008	0.1	0.02	0.004	0.0008	
未孵化(只)	20	12	3	2	4	0	1	2	4	6	2	1	2
孵化(只)	0	8	17	18	16	20	19	18	16	14	18	19	18

8. 海带腐植质对褐藻胶粘度的影响

褐藻胶为天然高分子化合物，其水溶液呈高粘度，但有许多因素能促使其粘度下降。我们知道，褐藻胶在碱提取、过滤、钙化、酸化、碱转化等生产过程中，粘度逐渐下降。Smidsrud 等^[15]曾用各种还原性化合物(包括酚类)证明能使褐藻胶发生降解。他们认为，褐藻中的还原性酚类化合物在碱性介质中能形成褐色具氧化和聚合作用的产物，导致褐藻胶降解。我们于褐藻酸钠溶液中加入 HA, FA 和 ES，观察了其粘度变化，结果如表 7。

很明显，褐藻酸钠溶液中加入海带腐植质 HA, FA 和 ES，经加温处理后，粘度都有一定程度的下降。当 HA 和 FA 浓度达 0.2mg/ml 时，粘度下降达 42—43%；浓度为 0.04mg/ml 时，下降 23—25%。ES 次之，对照为 20%。当使溶液呈碱性再加温处理后，

1) 得到本所胚胎发育组的协助，谨致谢忱。

表 7 海带腐植质对褐藻胶粘度的影响

Tab. 7 The effect of humic substances of *Laminaria japonica* on the viscosity of sodium alginate solution

腐植质	腐植质溶液加入量 (ml)	褐藻胶加入量 (g)	加水量 (ml)	粘 度 变 化				
				加温前 (CP)	60°C保温24h后 (CP)	粘度下降 (%)	加碱于60°C再保温20h后 (CP)	粘度下降 ^{a)} (%)
HA	10(含 10mg)	0.50	40	263	150	43.0	81	69.2
	2(含 2mg)	0.50	48	264	202	23.5	125	52.6
FA	10	0.50	40	267	154	42.3	88	67.0
	2	0.50	48	267	199	25.5		
ES	10	0.50	40	269	182	32.3		
	2	0.50	48	269	196	27.1		
对照	0	0.50	50	265	211	20.4	153	42.3

a) 对加温前粘度相比。

则加入 0.2mg/ml 时, HA 的粘度下降 69%, FA 下降 67%, 对照为 42%。由表 3 结果可知, HA 的总酚量最高, FA 次之, ES 最少, 因而 HA 的降解作用最显著。这就证明, 褐藻胶在生产过程中的粘度下降, 固然, 微生物活动是一个很重要原因外, 溶液中多酚类物质及生成的腐植质的存在, 也是导致褐藻胶降解的重要因素。

三、结 语

1. 对海带浸泡液用 GDX-102 吸附树脂吸附其中所含腐植质, 然后用碱和乙醇先后洗脱, 分离出腐植酸 (HA)、富里酸 (FA) 和乙醇可溶物 (ES) 三个级分。得率分别约为 0.04%, 0.12% 和 0.035% (W/W)。

2. 三级分都在 205nm UV 区有最大吸收值。HA 和 FA 的红外吸收光谱图同自海水和土壤中分离的相类似, 但 FA 的各特征吸收值更为明显。

3. 测定了三级分的元素和灰分含量, 并做了总酸性基、羧基等官能团含量分析。三级分的总氨基酸含量为 13—18% (对干重), 比海水腐植质含量约高 6—10 倍。ES 的总糖含量为 11%, 比 HA 和 FA 者分别高约 10 和 2 倍。

4. 用凝胶过滤法对三级分测得的分子量范围表明, HA 和 FA 的分子量范围基本类似: <700 者占约 20%, <1500 的为 33—38%; ES 的分子量分布是: <700 者占 53%, <1500 者约占 75%。即 ES 主要由低分子量组成。

5. FA 级分对文昌鱼卵子的孵化有较明显的抑制作用。HA 和 FA 对褐藻酸钠的粘度有显著的降低作用, 在碱存在下尤为明显; ES 的影响较小。

参 考 文 献

- [1] 纪明侯等, 1982, 海洋腐植质的研究 1. 用 GDX-102 吸附树脂分离海水腐植质, 海洋与湖沼, 13(4): 370—379.
 [2] 曹文达等 1981, 海水腐植质的氨基酸组成, 全国第二次腐植酸化学学术讨论会论文集, 中国化学会, 169—170.
 [3] 曹文达等, 1984, 海水腐植质对浮游植物——小角刺藻生长的影响, 全国第三次腐植酸化学学术讨论会论文集

- 中国化学会, 132—137.
- [4] Craigie, J. S., et al., 1964, Excretion of colored ultravioletabsorbing substances by marine algae, *Can. J. Bot.*, **42**: 23—33.
- [5] Dawson, R., et al., 1981, State of the art. In *Marine Organic Chemistry, Evolution, Composition, Interactions and chemistry of Organic Matter in Seawater* Elsevier Scientific Publishing Company. p. 503.
- [6] Dubois, M., et al., 1974, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **48**: 350—356.
- [7] Gagosian, R. B., et al., 1977, The cycling of biogenic compounds and their diagenetically transformed products in seawater, *Mar. Chem.*, **5**(4—6): 605—632.
- [8] Horwitz, W., 1965, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, 10th ed., The A. O. A. C., Washington, D. C., p. 139.
- [9] McLachlan, J., et al., 1964, Algal inhibition by yellow ultraviolet absorbing substances from *Fucus vesiculosus*, *Can. J. Bot.*, **42**: 23—33.
- [10] Prakash, A., et al., 1973, Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton diatoms, *Limnol. Oceanogr.*, **18**(4): 516—524.
- [11] Ragan, M. A., et al., 1978, Quantitative studies on brown algal phenols II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. and *Fucus vesiculosus* (L.), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **34**: 245—258.
- [12] Rashid, M. A., et al., 1969, Molecular weight distribution measurements on humic and fulvic acid fractions from marine clays on the Scotian Shelf, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **33**: 147—151.
- [13] Rashid, M. A., 1972, Chemical characteristics of humic compounds isolated from some decomposed marine algae, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**: 55—60.
- [14] Sieburth, J. M., et al., 1969, Studies on algal substances in the sea II. The formation of Gelbstoff (humic material) by exudates of Phaeophyta, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **3**: 275—289.
- [15] Smidsrød, O., et al., 1963, The influence of reducing substances on the rate of degradation of alginates, *Acta Chem. Scand.*, **17**: 1473—1474.
- [16] Stevenson, F. J., 1982, *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*, John Wiley & Sons, Inc. New York, pp. 269—278.

THE ISOLATION AND PROPERTIES OF HUMIC SUBSTANCES FROM THE MACERATED LIQUOR OF *LAMINARIA* *JAPONICA**

Ji Minghou and Zhang Hongsheng

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

A large amount of brownish mother liquor, remained after isolation of iodine and mannitol from the concentrated macerated liquor of *Laminaria japonica*, was not of any use up to date in the comprehensive utilization industry of *Laminaria*.

This study deals with the isolation of humic substances from the macerated liquor, the chemical characterization of the fractions isolated and the determination of their properties.

1. The humic substances were adsorbed on the China-made adsorption resin GDX-102, eluted with alkali and ethanol successively and fractionated into three fractions—humic acid (HA), fulvic acid (FA), and ethanol-soluble matter (ES). The yield of HA, FA and ES was ca. 0.04%, 0.12% and 0.035% of the weight of macerated liquor, respectively.

2. All three fractions exhibited the UV absorption maximum at 205nm. The IR spectra of HA and FA are somewhat close to those of seawater and soil, but in the spectrum of FA some absorption peaks appear more distinctly.

3. The elements and functional groups of the fractions were analyzed. The total amino acid contents of the fractions range between 13% and 18% of the dry weight, 6—10 times higher than the content of those in seawater. The total carbohydrates reach 11%, 10 and 2 times higher than HA and FA, respectively.

4. The distribution of molecular weight in the fractions determined using Sephadex filtration method showed that both HA and FA gave a similar pattern, being ca. 20% in <700, and 33—38% in <1 500, while ES gave a lower molecular weight range than HA and FA, being 53% in <700 and 75% in <1 500.

5. FA fraction exhibited more remarkable inhibition effect on the hatching of amphioxus eggs, while HA and ES showed almost no effect. The addition of HA and FA to the alginate solutions caused a remarkable depression on the viscosity, and especially in the presence of alkali, while ES gave only slight effect on the viscosity.

Key words *Laminaria japonica*, Humic substances, Molecular weight.

* Contribution No. 2075 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.