

几种红藻琼脂的组分结构及理化性质的比较^{*}

王 璐 刘 力 王艳梅 苑全云[†] 李智恩 徐祖洪

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[†](青岛海洋渔业公司 青岛 266001)

提要 以我国 3 种经济红藻龙须菜、石花菜、坛紫菜为原料,对高温稀碱法、常温浓碱法和无碱法提取的琼脂进行理化性质和化学组分结构方面的横向比较。结果表明,所提取琼脂的主要组分均为无取代的琼脂糖;凝固温度与甲氧基的取代位置及含量有关;我国 3 种琼脂海藻均为优质的琼脂原料;提取琼脂时,石花菜不用碱处理,龙须菜和坛紫菜则必须经过碱处理;从灰分和硫酸基含量角度分析,石花菜琼脂优于坛紫菜琼脂,后者又优于龙须菜琼脂。

关键词 红藻,琼脂,琼脂糖,理化性质,化学结构

中图分类号 Q539

国内对琼脂的研究主要集中在琼脂的提取工艺,各种江蓠琼脂的理化性质及其受季节变化和不同世代的影响,琼脂的分级、各级分的组成及其化学结构等几方面。本文比较系统地研究了我国生产琼脂的主要经济海藻——石花菜(*Gelidium amansii*)、龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)以及坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)提取琼脂的物理性质及化学组分结构,并将这些不同属红藻所含琼脂的理化性质进行了横向比较,探讨了一些造成这些性质差异的原因。同时采用¹³C-NMR法和红外光谱法对某些样品进行了检测,以期为利用我国的海藻原料制备具有不同性能、适用于不同要求的琼脂或琼脂糖提供一些理论方面的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*) 1997 年 11 月采于烟台,人工养殖,晒干。

石花菜(*Gelidium amansii*) 1998 年 5 月采自青岛薛家岛,日光漂白。

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*) 1997 年 11 月采自福建沿海。

1.2 实验方法

1.2.1 琼脂的提取(纪明侯,1997a)

高温稀碱法 称取 15g 海藻,用 360ml 0.2% HCl(*v/v*)浸泡 0.5h,水洗至中性。加

^{*} 国家海洋 863 资助项目,819-07-05号、国家自然科学基金资助项目,39870067号。王璐,女,出生于1975年5月,硕士, E-mail: xzh@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2000-05-18, 收修改稿日期: 2001-07-26

入 225ml 5% NaOH 溶液, 90℃水浴处理 2h, 水洗至中性。加 225ml 水及 2.25ml 漂液(有效氯 7%—8%) 浸泡 0.5h, 过滤, 再向海藻中加 225ml 0.3% HCl 溶液浸泡 0.5h, 最后用水洗至中性。加水 500ml, 在压力锅中(7.84×10^4 Pa) 提取 2h, 80 目筛绢趁热过滤。滤液加硅藻土趁热抽滤。滤渣中加入 100ml 水, 在压力锅中同样条件下提取 0.5h, 同上过滤, 两次滤液合并, 冷却后放入冰箱冷冻一昼夜, 然后用乙醇融化、脱水, 红外灯下烘干, 称重、粉碎。

常温浓碱法 称取 15g 海藻, 用 360ml 0.2% HCl(*v/v*) 溶液浸泡 0.5h, 水洗至中性。加入 400ml 32% NaOH 溶液, 常温下浸泡 5d 后, 水洗至中性。其余同前。

无碱法 称取 15g 海藻, 用 360ml 0.2% HCl(*v/v*) 溶液浸泡 0.5h, 水洗至中性(师然新等, 2000)。其余同前。

1.2.2 物理性质测定

凝胶强度 称取一定量的琼脂粉末加水配成 1.5% (*w/w*) 的胶液, 按照史升耀等(1980)的方法测定凝胶强度。

凝固温度、融化温度 配制 1.5% 的胶液, 按照史升耀等(1983)的方法测定凝固温度和融化温度。

1.2.3 化学分析

灰分、水解硫酸根、3,6-内醚半乳糖、总糖的测定分别采用中华人民共和国药典(1995)的方法、明胶-BaCl₂法(Kawai *et al*, 1969)、间苯二酚法(Yaphe *et al*, 1965)、苯酚-硫酸法(Dubois *et al*, 1956)。

1.2.4 仪器分析¹⁾

¹³G-NMR 谱测定 样品溶于 D₂O, 在 Bruker DPX-400M 超导核磁共振波谱仪上测定, 5mm 样品管。在 60℃测定质子去偶¹³G-NMR 谱(100.5926MHz)。DMSO 做内标(39.4×10^{-6})。采样时间为 0.9s, 延迟时间为 1s, 90°脉宽(9.3s)。

IR 光谱测定 样品烘干后, 采用 KBr 压片法, 在 Nicolet 510P 型 FT-IR 光谱仪上测定。

2 结果与讨论

2.1 琼脂的提取及得率

表 1 不同处理方法的琼脂得率

Tab. 1 The agar yields of different extraction methods

样品 ^①	1a	2a	3a	1b	2b	3b	1c	2c	3c
琼脂得率 (%)	11.83	17.17	28.03	21.40	40.53	36.63	11.17	16.35	4.09
标准偏差 ^②	1.17	1.08	3.97	1.18	2.37	4.28	1.35	2.76	1.07

① 1. 高温稀碱法; 2. 常温浓碱法; 3. 无碱法; a. 龙须菜 *Gracilaria lemaneiformis*; b. 石花菜 *Gelidium amansii*; c. 坛紫菜 *Porphyra haitanensis*

② 标准偏差来自平行测定结果

由表 1 可知: 对于同一种海藻, 不同的碱处理方法, 浓碱法处理后的琼脂得率要比稀碱法高。龙须菜高出 45%, 石花菜高出 89%, 坛紫菜高出 46%; 对于同一种海藻, 高温稀

碱法处理与无碱法处理琼脂得率的差异: 龙须菜为 16. 2%, 石花菜为 15. 23%, 坛紫菜为 7. 08%; 用同种方法处理不同海藻, 以石花菜的琼脂得率为最高, 坛紫菜的琼脂得率最低。

2. 2 物理性质测定

2. 2. 1 凝胶强度

由表 2 可知: 对于同一种海藻, 用不同的碱处理方法, 浓碱法和稀碱法所得琼脂凝胶强度相当(龙须菜相差 0. 4%, 石花菜相差 2. 0%, 坛紫菜相差 1. 9%); 无碱法提取的石花菜琼脂凝胶强度最大(83 790Pa), 龙须菜琼脂的凝胶强度稍低(66 052Pa), 坛紫菜琼脂无凝胶特性; 碱处理后, 3 种红藻琼脂的凝胶强度相当(集中在 89 180—91 532Pa 之间)。无碱法跟碱处理法琼脂前后凝胶强度的改变, 坛紫菜琼脂非常显著(由不凝固到强度为 90 160Pa左右), 龙须菜琼脂较大(提高 250 88Pa), 石花菜琼脂变化幅度则小得多(改变 7 154Pa)。

表 2 不同提取方法提取琼脂的物理性质

Tab. 2 The physical properties of agars extracted by different methods

样品 ^{b)}	凝胶强度(Pa)	凝固温度(℃)	融化温度(℃)	样品 ^{b)}	凝胶强度(Pa)	凝固温度(℃)	融化温度(℃)
1a	91 532	34. 5	99. 0	3b	83 790	33. 6	96. 9
2a	91 140	37. 7	> 100	1c	89 376	39. 9	81. 8
3a	66 052	33. 8	93. 9	2c	91 042	37. 8	87. 6
1b	89 180	36. 8	100. 1	3c ^{c)}	—	—	—
2b	90 944	35. 0	99. 8				

1) 1. 高温稀碱法; 2. 常温浓碱法; 3. 无碱法; a. 龙须菜 *Gracilaria lemaneiformis*; b. 石花菜 *Gelidium amansii*; c. 坛紫菜 *Porphyra haitanensis*
2) 从无碱法处理的坛紫菜提取的琼脂不凝固, 因而无凝胶强度、凝固温度、融化温度的数据

2. 2. 2 凝固温度和融化温度

由表 2 可知: 对于同一种海藻, 无碱法所得琼脂无论是凝固温度还是融化温度都比碱处理后的要低。一般来讲, 凝固温度高的, 融化温度也高。

有几个比较特殊的琼脂样品: 一是碱处理后龙须菜琼脂, 具有特别高的融化温度, 如浓碱法龙须菜琼脂的融化温度超过 100 ℃, 这与 Falshaw 等人(1999) 曾观察到的结果一致。二是碱处理后的坛紫菜琼脂, 具有特别高的凝固温度(高于 37. 5 ℃) 和特别低的融化温度(低于 90 ℃)。

2. 3 化学分析

2. 3. 1 灰分和水解硫酸根测定结果(表 3)

由表 3 可知, 灰分和水解硫酸根的变化具有相同的趋势, 即: 同种海藻用不同的处理方法, 两者含量顺序一般是无碱法<稀碱法>浓碱法; 同种碱处理方法处理不同海藻, 两者含量顺序都是龙须菜琼脂<坛紫菜琼脂>石花菜琼脂; 采用无碱法时, 两者含量顺序都是石花菜琼脂<龙须菜琼脂>坛紫菜琼脂。

2. 3. 2 3, 6- 内醚半乳糖含量测定结果(表 3)

对于同一种海藻, 用不同的碱处理方法得到琼脂的 3, 6- 内醚半乳糖含量, 浓碱法处理的龙须菜和石花菜比稀碱法处理的结果要略高一些, 而坛紫菜稀碱法比浓碱法的结果高。

无碱法与碱处理法比较, 石花菜琼脂的 3, 6- 内醚半乳糖含量变化不大(集中在 36—37%), 其余两种红藻琼脂的 3, 6- 内醚半乳糖含量则都发生了变化。坛紫菜琼脂的 3, 6- 内醚半乳糖含量变化最大, 由不到 1% 增加到 42. 52% 和 39. 68% ; 龙须菜琼脂的变化小些, 分别改变了 2. 78% 和 4. 99%, 这与它们凝胶强度的变化是一致的。对于不同的海藻, 用同一种碱处理方法处理后, 3, 6- 内醚半乳糖含量以坛紫菜琼脂的最高, 龙须菜琼脂的最低。

表 3 不同提取方法提取琼脂的化学分析结果

Tab. 3 Results of chemical analysis of agarose extracted by different methods

样品	灰分(%)	SO ₄ ²⁻ (%)	3,6- 内醚半乳糖(%)	总糖(%)
1a	7. 88	3. 49±1. 86	34. 97±0. 80	100. 03±0. 91
2a	6. 90	3. 76±0. 45	37. 18±2. 28	99. 50±0. 68
3a	5. 84	3. 92±1. 19	32. 19±0. 77	94. 53±1. 23
1b	4. 30	2. 00±0. 55	36. 32±0. 63	103. 20±0. 79
2b	3. 07	1. 31±0. 34	37. 41±0. 26	103. 92±4. 14
3b	5. 37	2. 24±0. 40	36. 34±0. 67	106. 68±2. 80
1c	5. 97	3. 22±0. 26	42. 52±0. 33	103. 68±1. 58
2c	4. 18	1. 59±0. 54	39. 68±0. 31	107. 70±0. 30
3c	12. 45	10. 19±0. 31	0. 97±0. 12	—

2. 3. 3 总糖含量测定结果(表 3)

石花菜琼脂和碱处理后的坛紫菜琼脂的总糖含量相当, 都比较高。龙须菜琼脂的总糖含量稍低(94. 53% —100. 03%)。

总的看来, 各样品的总糖含量都比较高, 除无碱法龙须菜琼脂外, 总糖含量在 99% —109% 之间。这一方面证明各琼脂样品的纯度比较高, 主要组分都是多糖; 另一方面还因为以半乳糖作标准测总糖含量时, 结果应乘上一个小于 1 的校正系数(林颖等, 1996) 。原因在于苯酚- 硫酸法是利用多糖水解产生还原糖而定多糖含量的。由于多糖水解后除末端糖基外, 其余糖基都多了一分子水而形成单糖, 所以当用单糖作标准时, 算出的多糖含量应扣除水解中带进水的量, 即要乘以一个校正系数。此系数可按公式 $[180n-18(n-1)]/180n$ 计算。其中, 180 为半乳糖的分子量, 18 为水的分子量, n 为组成多糖的单糖个数。布施等(1967) 曾用粘度法测定琼脂各级分的分子量, 并计算各级分的聚合度为 45—830。按此计算, 对于琼脂来说, 这一系数应为 0. 90。乘上校正系数之后, 除无碱法龙须菜琼脂外的各样品的总糖含量将在 89. 55% —98. 73% 之间。

2. 4 仪器分析

对稀碱法得到的龙须菜琼脂、石花菜琼脂、坛紫菜琼脂, 浓碱法得到的龙须菜琼脂, 无碱法得到的龙须菜琼脂、石花菜琼脂、坛紫菜琼脂等 7 个琼胶样品进行了¹³G NMR 谱和 IR 光谱测定。

2. 4. 1 ¹³G NMR 谱测定

参考已报道的琼脂糖及其衍生物的重叠二糖各碳原子的¹³G NMR 谱(纪明侯, 1997b) , ¹³G NMR 谱分析结果见表 4。

以上¹³G-NMR 谱数据与过去文献报道一致(纪明侯, 1986; Ji 1988; Usov, 1983)。所有琼脂样品的多糖组分都以无取代的琼二糖为主要重复单位, 显示琼二糖 12 个碳典型的共振信号(Usov *et al.*, 1980, 1991; Miller *et al.*, 1997)。与支链淀粉 B(Dais, 1982) 和扁江篱的热碱提取物(红藻淀粉)(Ji *et al.*, 1988) 的¹³G-NMR 谱比较, 所有样品均无红藻淀粉信号。

表 4 ¹³G-NMR 测定结果
Tab.4 Results of ¹³G-NMR spectroscopy

样品 ¹⁾		化学位移(×10 ⁻⁶)					
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
高温稀碱法龙须菜(1a)	G	101.17	68.86	80.34	67.03	73.94	59.69
	A	96.71	68.86	78.94	75.47	74.12	67.74
低温浓碱法龙须菜(2a)	G	101.15	68.96	80.00	66.91	73.88	59.53
	A	96.45	68.96	78.96	75.24	74.16	67.61
无碱法龙须菜(3a)	G	100.65	68.33	79.91	66.57	73.50	59.23
	A	96.25	68.33	78.44	75.02	73.50	67.27
高温稀碱法石花菜(1b)	G	101.53	69.17	80.90	67.56	74.39	60.20
	A	97.21	69.17	79.30	76.02	74.39	68.27
无碱法石花菜(3b)	G	100.56	68.25	79.86	66.52	73.41	59.17
	A	96.18	68.25	78.27	74.98	73.41	67.20
高温稀碱法坛紫菜(1c)	G	101.17	68.89	80.35	67.07	74.05	59.71
	A	96.76	68.89	79.09	75.49	74.05	67.68
	G*					72.40	70.67
	C _{6-OH3}						57.75
无碱法坛紫菜(3c)	G	102.32	69.75	82.05	68.66	75.46	61.27
	A	98.22	69.75	80.02	77.22	75.31	69.05
	G'	103.58	70.04	81.08	69.05	75.86	61.51
	A'	101.23	70.04	70.84	78.96	67.48	67.21
	G*					73.56	71.77
	C _{6-OH3}						57.46

1) G. 琼脂糖的 D- 半乳糖部分; A. 琼脂糖的 3, 6- 内醚半乳糖部分; G'. 琼脂糖前体的 D- 半乳糖部分; A'. 琼脂糖前体的 L- 半乳糖部分; G*. 6- 甲氧基琼脂糖的 D- 半乳糖部分; C_{6-OH3}. D- 半乳糖部分的 6 位甲氧基碳

在龙须菜琼脂样品和石花菜琼脂样品的图谱中, 除无取代的琼脂糖信号外, 未发现有甲氧基信号。

两个坛紫菜琼脂样品的图谱中, 除主要组分无取代的琼脂糖信号外, 无碱法坛紫菜琼脂图谱中还出现了明显的琼脂糖前体的信号(Usov *et al.*, 1983; 纪明侯等, 1986) 以及微弱的 6- 甲氧基- D- 半乳糖- 3, 6- 内醚- L- 半乳糖(6- 甲氧基琼脂糖) 信号。稀碱法坛紫菜琼脂的图谱中则另外出现了 6- 甲氧基琼脂糖的信号。

2.4.2 IR 光谱测定

IR 光谱显示, 经碱处理的各琼脂样品都有很强的 3, 6- 内醚半乳糖吸收峰(932cm⁻¹) 和微弱的 SO₄²⁻ 吸收峰(1250—1255cm⁻¹)。碱处理前, 龙须菜琼脂、石花菜琼脂和坛紫菜

琼脂都有较弱的肽键信号($1532-1537\text{cm}^{-1}$),在碱处理后都消失,证明碱处理可能会除去琼脂中含有的少量蛋白质杂质。

坛紫菜琼脂在碱处理前 932cm^{-1} 处3,6-内醚半乳糖信号很弱,碱处理后此信号则变得明显,证明碱处理后有大量3,6-内醚半乳糖生成。硫酸基信号的变化则刚好相反,碱处理前, 1255cm^{-1} 处的吸收很强,碱处理后明显减弱,证明无碱法坛紫菜琼脂含大量对碱不稳定的硫酸基,在碱处理后发生了转化,这也可从 816cm^{-1} 处的硫酸基(6-SO_4^{2-})吸收峰在碱处理后消失得以验证。

3 结语

3.1 我国的3种经济红藻均是生产琼脂的优质原料,与以前研究过的江蓠属海藻对比,只有广东海丰产的真江蓠、广东湛江和广西防城产的细基江蓠、广西北海的江蓠在碱处理之后凝胶强度达到 $88\ 200\text{Pa}$ 以上(史升耀等,1988)。

3.2 石花菜不经碱处理就可得到凝胶强度很高($83\ 790\text{Pa}$)的琼脂。龙须菜和坛紫菜则必须经过碱处理。

3.3 从灰分和硫酸根含量高低的角度看,石花菜琼脂优于坛紫菜琼脂,后者又优于龙须菜琼脂。在制造低电内渗琼脂糖介质时可考虑采用石花菜和坛紫菜作原料。

3.4 甲氧基被公认为是一个影响凝固温度的重要因素。Guiseley在1970年的研究中曾表明,随着 OCH_3 含量的增加,凝固温度也增高。本文研究的坛紫菜琼脂凝固温度较龙须菜琼脂和石花菜琼脂高。光谱数据证明坛紫菜琼脂D-半乳糖部分6位有甲氧基取代,可从这方面来解释它们凝固温度高的原因。

致谢 中国科学院海洋研究所分类室的郑宝福研究员为实验中的坛紫菜定种;中国科学院生物物理所大分子实验室核磁组的周淑华研究员帮助完成了所有 $^{13}\text{G-NMR}$ 谱的测定,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 中华人民共和国卫生部药典委员会编, 1995. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 附录, 55
- 史升耀, 张燕霞, 刘万庆, 1983. 江蓠琼脂产率、物理性质和化学组成的季节变化. 海洋与湖沼, 14(3): 272-277
- 史升耀, 纪明侯, 1980. 江蓠琼脂的研究 III. 琼脂产率与凝胶强度的季节变化. 海洋湖沼通报, 1: 35-38
- 史升耀, 张燕霞, 刘万庆, 1988. 碱处理对中国江蓠属海藻所含琼胶的作用. 水产学报, 12(2): 145-155
- 纪明侯, 1997. 海藻化学. 北京: 科学技术出版社, a16-17, b69-70
- 纪明侯, Lahaye M, Yappe W, 1986. 对三种红藻琼脂的化学与 $^{13}\text{G-NMR}$ 分析. 海洋与湖沼, 17(3): 185-195
- 林颖, 吴毓敏, 1996. 天然产物中的糖含量测定方法正确性的研究. 天然产物研究与开发, 8(3): 5-9
- 师然新, 徐祖洪, 李智恩, 2000. 降解的角叉菜多糖的抗肿瘤活性. 海洋与湖沼, 31(6): 653-656
- 布施恒明, 胜浦嘉久次, 1967. ア化ホト Å K h μ F 分离 た — , í ° ; Ó N 溶液物性. 日本工业化学杂, 70: 724-728
- Dais, 1982. High field, $^{13}\text{G-NMR}$ spectroscopy of β -D-glucans, amylopectin, and glycogen. Carbohydr Res, 100: 103-106
- Dubois M, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 28(3): 350-356
- Falshaw R, 1999. Agars from three Fijian Gracilaria species. Bot Mar, 42: 51-59
- Guiseley K B, 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. Carbohydr Res, 13: 247-256
- Ji Minghou, Lahaye M, Yappe W, 1988. Structural studies on agar fractions extracted sequentially from Chinese red seaweeds;

Gracilaria jeostedtii, *G. Textorii* and *G. Salicornia* using ^{13}C -NMR and IR spectroscopy. Chin J Limnol Oceanol, 6(2):87—103

Kawai Y, 1969. A modified method for chondrosulfatase assay. Anal Biochem. 32:314—321

Miller I J, Fumeaux R H, 1997. The structural determination of the agaroid polysaccharides from four New Zealand alga in the order Ceramiales by means of ^{13}C -NMR spectroscopy. Bot Mar, 40:333—339

Usov A I, Elashvili M Ya, 1991. Polysaccharides of algae. 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using partial reductive hydrolysis. Bot Mar, 34: 553—560

Usov A I, Ivanova E G, Shashkov A S, 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

Usov A I, Yarotsky S V, Shashkov A S, 1980. ^{13}C -NMR spectroscopy of red algal galactans. Biopolymers, 19: 977—990

Yaphe W, Arsenault G P, 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3,6-anhydro-galactose in polysaccharides. Anal Biochem, 13: 143—148

COMPARATIVE RESEARCH ON THE STRUCTURES AND PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF AGARS FROM SEVERAL AGAROPHYTA

WANG Lu, LIU Li, WANG Yan-Mei, YUAN Quan-Yun^{*}, LI Zhi-En, XU Zi-Hong

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

^{*}(Qingdao Marine Fisheries Corporation, Qingdao, 266001)

Agars were extracted from *Gracilaria lemaneiformis*, *Gelidium amansii*, *Porphyra haitanensis* and *Ahlfeltia* sp. by different methods. In order to provide some theoretic guidance for preparing high quality agars suitable for different usages, comparative studies on their structures and physico-chemical properties are carried out.

The results show that the main constituent of each sample is unsubstituted agarose. Gelling temperature is affected by the location and quantity of OCH_3 substituent. The three economic agarophyta in China are all high quality resources of agar. Before extraction, the alkali pretreatment is unnecessary for *Gelidium amansii*, but it is essential for *Porphyra haitanensis* and *Gracilaria lemaneiformis*. In terms of the ash and sulfate content, agar from *Gelidium amansii* is better than from *Porphyra haitanensis*, with the latter being is better than from *Gracilaria lemaneiformis*.

Key word Red seaweed, Agar, Agarose, Physico-chemical properties, Chemical structure