

用 β -琼胶酶和 NMR 光谱法研究 多管藻多糖的寡糖结构*

高洪峰 纪明侯 曹文达 韩丽君

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1990年3月用 β -琼胶酶对多管藻的冷水提取多糖进行酶解, 酶解液通过 DEAE-Sephadex A25 和 Bio-Gel P6 色谱柱分离, 分离出2个带电荷的寡糖 A-I 和 A-II。经 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 光谱法分析, 确定结构式分别为 6', 2'-二-O-甲基-6'-硫酸基-新琼四糖和 6', 2'-二-O-甲基-6', 6'-二硫酸基-新琼六糖, 证明它们构成多管藻多糖分子的单位组分。

关键词 β -琼胶酶 多管藻 带电荷琼胶寡糖 新琼四糖 新琼六糖

我国北部沿海盛产的红藻多管藻(*Polysiphonia urceolata* Grev.) 主要为冷水可溶性, 可提取出干藻的 21.4%, 而热水可溶部分仅为 6.2%。 $^{13}\text{C-NMR}$ 光谱法证明冷水可溶多糖主要由 6-硫酸基-琼二糖重复二糖连接而成的琼胶型多糖(纪明侯等, 1996)。本文将此冷水可溶多糖用 β -琼胶酶水解, 水解液经过 Sephadex A25 和 Bio-Gel P6 色谱柱进行分离, 对分离出的带电荷的寡糖用 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 光谱法研究并确定了其中硫酸基和甲基的结合位置。

1 实验材料与方法

1.1 多管藻多糖的制备

用纪明侯等(1996)制备的多管藻(*Polysiphonia urceolata*)冷水提取多糖。

1.2 β -琼胶酶的制备

取大西洋假单胞菌(*Pseudomonas atlantica*)冻干粉末(加拿大 McGill 大学 Yaphe 博士赠)安瓿瓶, 启封, 以下述配制的培养液转移到培养管中培养三代。取定量移至培养液中于室温(25 $^{\circ}\text{C}$)培养 30h, 时而摇动, 呈混浊, 离心(5000r/min)20min。取上清液加入硫酸铵晶体至约 70% 饱和度, 生成沉淀, 时而搅拌至 2h 后离心, 倒去上清液。沉淀中加入少量 0.01mol/L Tris 溶液使其溶解, 离心, 将上清液移入透析袋中, 对 0.01mol/L Tris 溶液透析, 至无 SO_4^{2-} 。袋内为粗 β -琼胶酶液。用 I_2 -KI 试剂试验, 粗酶液对琼胶液的酶解活性很高。

培养液的配制(Groleau et al., 1971; Morris et al., 1983): 将 12.5g NaCl, 0.05g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g CaCl_2 , 0.5g KCl, 1.25g 干酪素水解粉末,

* 国家自然科学基金资助项目, 3870137号。高洪峰, 男, 出生于1963年10月, 副研究员。

本工作承蒙陈勇和刘秀云两位先生给以热情协助, 谨志谢忱。

收稿日期: 1994年12月20日, 接受日期: 1996年2月1日。

0.5g 琼胶粉末(Difco)等溶于水,加入 25ml 0.2mol / L Tris 溶液,稀释到 1L, (称其为 a)。将(a)和 0.3% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液(称为 b)同时放于 $1\text{kg} / \text{cm}^2$ 蒸气压力中加热灭菌 15min。冷却后于(a)混合溶液中注入 3.3ml(b) 溶液。

1.3 多管藻冷水提取多糖的酶解

取 0.8g 多糖,加 160ml 水,加热并摇动使其全溶。冷至 40°C 加入 3ml 粗 β - 琼胶酶,于 40°C 温水浴中保温 20h,再加入 2ml 粗酶液。以 I_2 -KI 试剂试验呈浅红色,表示已充分酶解。加热煮沸 5min,通过滤纸压滤后对蒸馏水透析。透析袋内物质加 3 倍量 95% 乙醇,使其产生沉淀,离心。上清液经蒸发浓缩,简称为“乙醇浓缩液”。

1.4 寡糖的分离

将“乙醇浓缩液”注入 DEAE-Sephadex A25 色谱柱($2.5 \times 20\text{cm}$)中,室温以 1mol / L NaCl 溶液进行梯度洗脱,以部分收集器分部收集洗脱液,用苯酚-硫酸法(Dubois et al., 1956)分析各收集管中的含糖量,得 A-I 和 A-II 两个糖峰。将 A-I 和 A-II 的各管洗脱液分别合并,各通过 Bio-Gel P6 色谱柱($4.5 \times 90\text{cm}$),以 0.1mol / L NaCl 溶

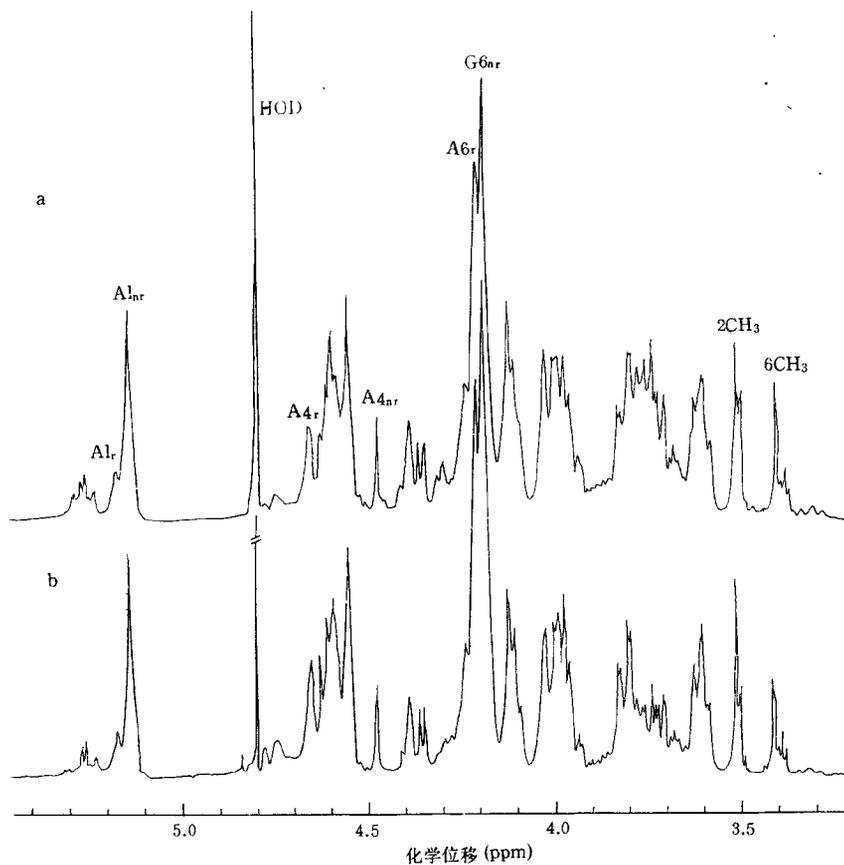


图1 A-I(a)和A-II(b)寡糖的 ^1H -NMR谱图

Fig.1 ^1H -NMR spectra of oligomers A-I (a) and A-II (b) from cold water extract of *Polysiphonia urceolata*

液洗脱, 收集含糖量较高的收集管, 合并。再分别通过 Sephadex G25 色谱柱脱盐, 收集含糖各管, 合并, 减压浓缩, 冻干。

1.5 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 光谱分析

取冻干的样品A-I 和A-II, 分别加入1ml D_2O , 溶解后冻干, 如此重复4次。然后各加入0.6ml D_2O , 溶解后注入 ^1H -NMR 管($0.5 \times 18\text{cm}^3$)中, 密封。用 JEOL JNM-GX 400 核磁共振仪在 399.65MHz 磁场下室温测定 ^1H -NMR 谱图。用同仪器于 100.40MHz 磁场下室温测定 A-II 寡糖的 ^{13}C -NMR 谱图。

2 结果与讨论

将“乙醇浓缩液”以 DEAE-Sephadex A25 和 Bio-Gel P6 色谱柱分离, 得到带电荷寡糖 A-I 和 A-II。经脱盐、冻干后分别称量为 0.005g 和 0.02g。

2.1 ^1H -NMR 光谱分析结果

A-I 和 A-II 两寡糖的 ^1H -NMR 谱图如图 1。两者相类似。从质子 A4r 的化学位移 4.66ppm 和 A4nr 的 4.47ppm (寡糖各糖单位的表示符号见图 4) 的强度估算聚合度 DP (Ji et al., 1990), 得知 A-I 和 A-II 两寡糖的聚合度分别为 2 和 3。两寡糖在 3.41ppm 和 3.52ppm 均有清晰的信号, 分别表示 L-半乳糖单位 C2 上和 D-半乳糖单位 C6 上有甲基存在¹⁾。代表 G6nr 的 4.18ppm 强信号说明 D-半乳糖单位 C6 上结合有硫酸基。

2.2 ^{13}C -NMR 光谱分析结果

A-II 寡糖的 ^{13}C -NMR 光谱图(图 2)中, 各糖单位的各碳原子的化学位移(ppm)如表 1 所示。A-I 寡糖的 ^{13}C -NMR 谱图与 A-II 者类似, 不予重述。

表 1 多管藻冷水可溶多糖的寡糖 A-II 的 ^{13}C -NMR 化学位移(ppm)(室温, 相对于 TMS)

Tab. 1 ^{13}C -NMR chemical shifts of A-II oligomer from cold water extract of *P. urceolata*, relative to TMS at room temperature

糖单位 ¹⁾	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Gnr	102.71	70.37	82.32	68.74	73.24	67.84
G	102.83	70.37	82.48	68.74	73.31	67.96
G β	97.05	71.76	83.01	69.22	75.58	61.75
G α	93.10	68.33	79.80	69.91	70.98	61.94
Anr	98.62	70.01	81.28	70.37	77.72	69.42
A	98.87	70.01	80.41	78.19	75.92	69.72
Ar	98.87	70.01	80.41	78.05	75.92	69.72
CH ₃						59.30

1) 糖单位的表示符号见图 4。

2.3 讨论

红藻多管藻属所含多糖结构是属于琼胶型。纪明侯等(1996)用 ^{13}C -NMR 光谱法证实我国产多管藻用热水提取的多糖主要由 6-硫酸基-琼二糖重复单位构成。由图 1 的

1) Lahaye, M., 1986, Agar from *Gracilaria* spp., PhD. thesis, McGill University, Canada, p. 211.

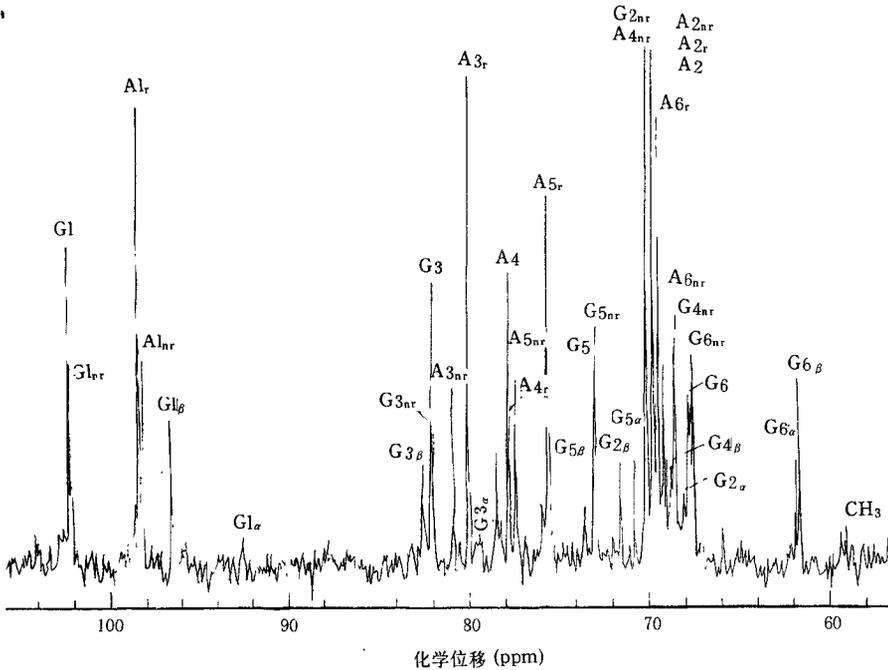


图2 多管藻冷水可溶多糖的A-II寡糖的¹³C-NMR谱图

Fig.2 ¹³C-NMR spectrum of A-II oligomer from cold water extract of *P. urceolata*

3.52ppm 和 3.41ppm 两信号的存在, 确定该多糖分子中还结合有一定量 2-O-甲基和 6-O-甲基联接在含硫酸基琼二糖重复单位上(图3), 即寡糖中同时结合有甲基和硫酸基。由 Ji 等(1990)报道得知, 扁江蓼多糖的带电荷寡糖中只结合有硫酸基, 而中性寡糖中结合有甲基。因此, 只有通过寡糖研究, 才能进一步了解硫酸基和甲基在带电荷寡糖中的结合状态。由此可知, 多管藻多糖的嵌段结构与扁江蓼多糖是不同的。

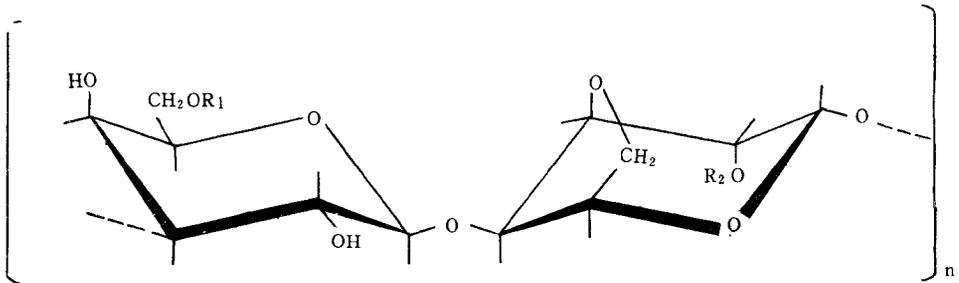


图3 琼胶糖的重复二糖单位

Fig.3 Disaccharide repeating units of agaroses

$R_1, R_2=H$, 琼二糖, (1→3)-β-D-半乳糖基-(1→4)-3,6-内醚-α-L-半乳糖, $R_1=CH_3, R_2=H$, 6-O-甲基-琼二糖; $R_2=CH_3, R_1=H$, 2-O-甲基-琼二糖; $R_1=SO_3^-, R_2=H$, 6-硫酸基-琼二糖。

β-琼胶酶对红藻琼胶型多糖的酶解断链是发生在不带有硫酸基的 D-半乳糖单位

的 β -糖苷键上。在这个 D-半乳糖还原末端糖单位上不含有硫酸基, 但可能结合有甲基¹⁾。寡糖 A-II 的 ^{13}C -NMR 谱图(图 2)和表 1 所示各碳原子化学位移 67.84, 73.24 和 68.74ppm 分别为 G6nr, G5nr 和 G4nr 的信号, 表明 D-半乳糖单位的 C6 上有硫酸基。与从扁江离分离出的带电荷寡糖 II-4 (证明为含甲基和硫酸基的新琼四糖)的诸碳原子化学位移(Ji et al., 1990)相类似。此外, 59.30ppm 弱信号表明甲基的存在。出现的 78.82ppm 信号的来源尚不清。

这样, 从图 1 和图 2 的化学位移判断, 由多管藻分离出的 A-I 寡糖(聚合度为 2)和 A-II 寡糖(聚合度为 3)分别为 6', 2'-二-O-甲基-6³-硫酸基-新琼四糖和 6', 2'-二-O-甲基-6³, 6⁵-二硫酸基-新琼六糖(图 4a 和图 4b)。由此可见, 多管藻多糖主要由图 4 所示的寡糖为其组成单位, 构成混合的琼胶糖衍生物。Usov 等(1987)对内枝多管藻(*Polysiphonia morrowii*)多糖用 β -琼胶酶水解, 对总水解液(但没有分离寡糖)测定了 ^{13}C -NMR 谱图, 确定水解液中存在有 6,6'-二硫酸基-新琼六糖寡糖。

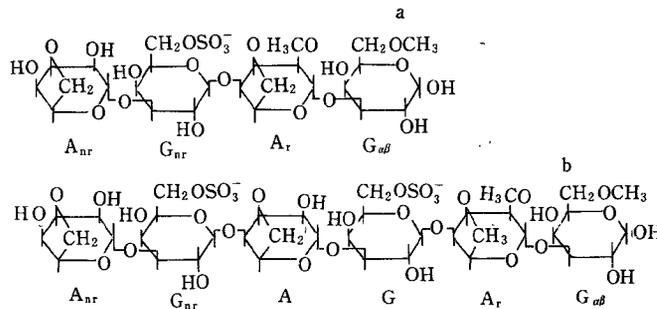


图 4 多管藻冷水可溶多糖酶解寡糖的结构式

Fig.4 Structure of enzymic hydrolyzed oligomers of polysaccharides from the cold water extract of *P. urceolata*

- a. 聚合度 =2 的寡糖, 6', 2'-二-O-甲基-6³硫酸基-新琼四糖; b. 聚合度 =3 的寡糖, 6', 2'-二-O-甲基-6³, 6⁵-二硫酸基-新琼六糖。

3 结语

用 β -琼胶酶对冷水提取多糖进行酶解, 将酶解液的乙醇沉淀澄清液前后通过 DEAE-Sephadex A25 和 Bio-Gel P6 色谱柱分离和提纯。分离出 2 个糖峰, 分别制成寡糖冻干品: A-I 和 A-II。

由两个寡糖的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 光谱图显示的化学位移判析, A-I 和 A-II 寡糖的聚合度分别为 2 和 3, 并确定两者的结构式分别为 6', 2'-二-O-甲基-6³-硫酸基-新琼四糖和 6', 2'-二-O-甲基-6³, 6⁵-二硫酸基-新琼六糖。这些单位构成多管藻中含硫酸基和 2 种甲基的琼胶糖多糖分子。

1) Lahaye, M., 1986, Agar from *Gracilaria* spp., PhD. thesis, McGill University, Canada, p. 292—293.

参 考 文 献

- 纪明侯等, 1996. 海洋与湖沼, **27**(3): 330—335.
- Dubeis, M. et al., 1956, *Anal. Chem.*, **28**: 350—356.
- Groleau, D. et al., 1971, *Can. J. Microbiol.*, **23**: 672—679.
- Ji Minghou et al., 1990, *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, **8**(2): 135—149.
- Morris, L. M. et al., 1983, *Eur. J. Biochem.*, **133**: 673—684.
- Usov, A. I. et al., 1987, *Bot. Mar.*, **30**(5): 365—370.

STUDIES ON THE STRUCTURE OF OLIGOMERS FROM
THE POLYSACCHARIDE OF *POLYSIPHONIA URCEOLATA*
(RHODOPHYTA) USING β -AGARASE
AND NMR SPECTROSCOPY

Gao Hongfeng, Ji Minghou, Cao Wenda, Han Lijun

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

Abstract The polysaccharide extracted by cold water from *Polysiphonia urceolata* collected on March 1990, in Qingdao, was hydrolyzed using β -agarase from *Pseudomonas atlantica*. The mixture after hydrolysis was precipitated by adding 95% ethanol solution, then the upper clear solution was evaporated *in vacuo*. This ethanol concentrate of enzymic hydrolyzate was chromatographed on DEAE-Sephadex A25 and then Bio-Gel P6 columns. Two charged agarooligomers A-I and A-II were isolated from the eluents. Their degrees of polymerization were estimated by $^1\text{H-NMR}$ spectra to be 2 and 3, respectively. Two oligomers gave clear resonance signals at 3.41ppm and 3.52ppm in $^1\text{H-NMR}$, which showed the presence of methyl groups on C2 of L-galactose and C6 of D-galactose, respectively. A strong signal at 4.18ppm indicated that a sulfate group links with C6 of D-galactose. The structure of the oligomers A-I and A-II was deduced by the assignment of chemical shifts in $^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra to be 6¹, 2²-di-nethyl-meoagarotetraose-6³-sulfate and 6¹, 2²-di-methyl-neoagarohexaose-6³, 6⁵-disulfate, respectively, which constitute the unit component of the polysaccharide of *Polysiphonia urceolata*.

Key words β -agarase *Polysiphonia urceolata* Charged agarooligomer
Neoagarotetraose Neoagarohexaose