
海洋科学 研究进展

中国科学院海洋研究所研究生部 编

科学出版社

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书是一本海洋科学论文集。它综合论述了国内外海洋科学中最令人关注的研究领域和学科前沿,内容涉及水文物理学、化学、地质学、环境学、生物学以及科研管理等分支学科的重大课题,对其在科研、生产和管理等方面的最新进展、最新理论和最新方法及发展趋势进行了深入的评述。本书既介绍了国际上共同关心的研究领域,又介绍了根据我国国情提出的新课题,对海洋科学的研究具有指导和参考作用。本书可供海洋科学研究、教学、管理和生产的有关人员和师生参考。

海 洋 科 学 研 究 进 展

中国科学院海洋研究所研究生部 编

责任编辑 梁淑文

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1996年7月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

1996年7月第一次印刷 开张: 10 3/4

印数: 1—880 字数: 240 000

ISBN 7-03-004855-5/P·850

定价: 19.50 元

海洋科学研究进展

主 编	戴敏英	孙佩锦	郑小微
副主编	杜荣华	王 森	
编 委	杜荣华	王 森	陈浦远
	徐鸿儒	王 森	

前 言

本书最突出的特色是,作者为一批学术思想活跃且在学科前沿攻坚披锐的研究生。组织正在攻读学位的研究生著书立说,真可谓中国科学院海洋研究所研究生部开拓性治学的有力体现。近年来,研究生部把高级科技人才的培养同国家现代化建设的急需紧密联系在一起,采取种种有力措施,加快人才培养,提高培养质量。为全面提高研究生的素质与技能,多年来努力加强科学管理和教育建设,不断开办学新局面。如为培养跨世纪人才,实现代际转移,采取优秀研究生、重点课题特别支持的措施,使这些时代的“骄子”心感身受,立足于国内成才,矢志为现代化建设作贡献,从而稳定了研究生队伍。在课程设置上,除精通本专业外,还设立了海洋学公共基础课,并要有考试成绩;另外,为使研究生掌握科技语言和写作技能,还讲授了科技写作、科技翻译知识。

为记录和巩固研究生在学期间的研究成果,曾先后整理翻译出版了《研究生学位论文摘要汇编》(1956—1986级)、《海洋科学译文集》。本论文集即是学生们在阅读了大量国内外资料基础上,就海洋科学所涉及的物理学、化学、地质学、环境学、生物学、科研管理等学科及其分支学科的某些前沿课题和最新研究成果、学术进展予以概括撰写而成的。深奥的科学知识溢流于通畅的科技语言之中。如藻胆蛋白分子生物学及遗传基因,甲壳动物化学感觉生理研究,海洋无脊椎动物免疫性研究,陆架锋的研究,大陆架沉积动力学的研究,陆架沙漠化观点的提出等等,均系国内外最新研究领域,或为填补国内空白的课题。作为编者自然是先睹为快,尤如阵阵清风迎面扑来。本书可供从事海洋科学研究、教学、技术工作的人员参考,还可为导师和研究生制定学位课题提供依据。

中国科学院海洋所副所长董金海教授拨冗审阅了全书,谨致谢忱。

孙佩锦

1992年5月

目 录

藻胆蛋白分子生物学研究进展及基因工程前景	秦 松(1)
褐藻多糖化学理论研究进展	严小军(6)
海洋贝类幼虫附着变态的化学诱导——诱导物、受体及调控机理	刘保忠(13)
贝类呼吸生理生态学研究进展	王春德(20)
金属硫蛋白在贝类中的研究现状	匡世煥(29)
海洋经济贝类育种研究的现状和建议	张国范(37)
酚氧化酶原系统与甲壳动物的免疫反应	王 青(45)
甲壳动物化学感觉研究进展 I. 概论及行为学研究	陈楠生(51)
甲壳动物化学感觉研究进展 II. 电生理学研究	陈楠生(62)
甲壳动物化学感觉研究进展 III. 形态学研究	陈楠生(73)
对虾繁殖生物学的研究进展	何晋伟(84)
海洋哺乳动物的研究进展	杨雪梅(89)
赤潮问题研究进展	张 诚(97)
赤道海洋动力学回顾	袁东亮(105)
黄海冷水团水文特征和环流结构的研究进展	冯 明(114)
陆架锋研究概况	毕亚文(119)
浅谈海流测量的几种方式	刘 慧(125)
大陆架沉积动力学研究进展	吴晓涛(130)
陆架沙漠化和深海黄土质沉积——中国海洋沉积学研究新进展	石学法(136)
海洋工程地质与灾害地质学	范奉鑫(142)
研究所的科研组织管理	邓云锋(149)
谈科研实力的一个重要组分——科研装备	刘志华(155)

The Advances on Marine Science

CONTENTS

Molecular Biology and Genetic Engineering of Phycobiliproteins; Review and Prospects	Qin Song(5)
Advances of Chemical Theory on Brown Seaweed Polysaccharides	Yan Xiaojun(12)
Chemical Induction of Settlement and Metamorphosis in Marine Molluscan Larvae—— Inducer, Receptor and Regulation Mechanism	Liu Baozhong(18)
The Aspects of Molluscan Respiratory Physioecology Research	Wang Chunde(27)
Study of Metallothioneins in Shellfish	Kuang Shihuan(36)
A Perspective on the Genetic Breeding of Commercial Marine Molluscs	Zhang Guofan(43)
Prophenoloxidase System and Immunity in Crustaceans	Wang Qing(49)
Advances of Chemoreception Studies in Crustaceans I . Introduction and Behavioral Studies	Chen Nansheng(61)
Advances of Chemoreception Studies in Crustaceans II . Electrophysiological Studies	Chen Nansheng(72)
Advances of Chemoreception studies in Crustaceans III . Morphological Studies	Chen Nansheng(83)
Advances in Reproductive Biology of Penaeis Shrimp	He Jinwei(88)
Advances in Marine Mammal Studies	Yang Xuemei(95)
Advance in Red Tide Studies	Zhang Cheng(104)
Review of Equatorial Ocean Dynamics	Yuan Dongliang(112)
Recent Studies on the Hydrology Characteristics and Circulation Structure of the Huanghai Sea Cold Water Mass	Feng Ming(117)
Sketch of the Continental Shelf Front Research	Bi Yawen(123)
Several Methods of Current Measurement	Liu Hui(129)
Advance of Shelf Sediment Dynamic Study	Wu Xiaotao(135)
Shelf Desertization and Deep Sea Loess——The Latest Development in Marine Sedimentology in China	Shi Xuefa(141)
Marine Engineering and Hazardous Geology	Fan Fengxin(148)
Organization Management of the Institute Scientific Research	Deng Yunfeng(154)
Discussion on an Important Part of Science and Research Power —— Science and Research Equipment	Liu Zhihua(161)

藻胆蛋白分子生物学研究进展及基因工程前景^①

秦 松

摘要 藻胆蛋白是蓝藻、红藻、隐藻和甲藻特有的光合作用的天线色素蛋白。藻胆蛋白分子生物学研究是现代藻类生物学研究的重要方面,目前已成为藻类分子生物学研究的热点和突破口,并推动了光合作用理论以及藻类分子进化研究的发展。藻胆蛋白的基因工程前景十分广阔。国际上有关藻胆蛋白分子生物学以及基因工程的研究尚处在起步阶段,许多领域国内尚属空白。开展这方面工作具有促进基础理论研究和藻类资源开发的双重意义。

藻胆蛋白(phycobiliprotein)是某些藻类特有的捕光色素蛋白,最早在蓝藻和红藻中发现,1959年 Allen 等报道了在单细胞鞭毛隐藻中发现藻胆蛋白,1980年胡鸿钧等报道在蓝裸甲藻 *Gymnodinium cyaneum* 中发现藻胆素(phycobilin)。据目前所知,藻胆蛋白存在于原核的蓝藻,真核的红藻、隐藻和甲藻中。在藻类光合色素系统中,各门类光合系统Ⅱ的天线色素各不相同,因此作为某些藻类光合系统Ⅱ天线色素的藻胆蛋白(吸收光谱在500—671nm)成为藻类分类研究的重要依据。早在32亿年前,藻胆蛋白就伴随蓝藻出现在地球上,是光合分子中的“活化石”;16亿年前又在真核藻类中出现,成为藻类演化过程中具有特殊意义的标志分子。藻胆蛋白不仅在单细胞藻类(单细胞隐藻、蓝裸甲藻等)中存在,还在多细胞藻类(多细胞红藻)中存在;不仅在有鞭毛藻类(单细胞隐藻)中存在,还在无鞭毛藻类中存在。因此藻胆蛋白分子生物学研究对于藻类起源和进化研究以及光合作用原初理论研究都具有十分重要的意义。目前关于藻胆蛋白及其基因的研究已成为国际藻类分子生物学研究的热点,近年来取得许多新进展。藻胆蛋白占某些藻类可溶性蛋白的40—60%,是良好的食用和饵料蛋白来源。藻蓝蛋白初步证明具有抗癌的生物活性,并被用作高级天然食品色素。藻红蛋白和别藻蓝蛋白成为新一代生物工程研究和医疗诊断用免疫荧光探针。本文在综述国际藻胆蛋白分子生物学研究最新进展的基础上,阐明藻胆蛋白分子同源进化的可能性,并对基因工程前景进行展望。

一、藻胆蛋白组成和结构的研究

1. 生化组成

藻胆蛋白主要由 α 和 β 两种亚基(9—20kD)组成,二者比例一般为1:1,在某些藻胆蛋白中还有 γ 亚基的存在。每个亚基含1—4分子发色基,又称藻胆素。每一种藻胆蛋白

^① 张培军研究员审阅本文并提出宝贵意见,特致谢忱。

导师:曾呈奎、林光恒。

含有的藻胆素一般不超过两种。藻胆素为开链四吡咯化合物(0.6kD),分为 PEB,PCB, PUB 与 PXB(结构不明)4 种,通过吡咯环上的乙叉基与亚基肽链上保守性 CYS 残基形成硫醚键相连。根据组成和吸收光谱的不同,藻胆蛋白一般分为四类:藻红蛋白(简称 PE,吸收光谱在 500—570nm)、藻蓝蛋白(简称 PC,吸收光谱在 610—640nm)、别藻蓝蛋白(简称 AP,吸收光谱在 650—671nm)和藻红蓝蛋白(简称 PEC,吸收光谱为 570nm)。

前三类藻胆蛋白普遍存在于蓝藻和红藻中,藻红蓝蛋白存在于某些缺乏藻红蛋白而有异形胞的蓝藻中,充当藻红蛋白天线色素功能。隐藻中仅有藻红蛋白和藻蓝蛋白,但二者很少同时并存。甲藻中仅发现藻蓝蛋白(吸收峰位于 580nm 与 645nm 处)的存在(胡鸿钧等,1980)。在蓝藻和红藻中,藻胆蛋白常以三聚体($\alpha\beta$)₃ 或六聚体($\alpha\beta$)₆ 的形式形成半盘状或半椭圆状藻胆体 phycobilisome 颗粒(7000—15000kD),并附着于类囊体表面;在隐藻中藻胆蛋白常以单体($\alpha\beta$)或二聚体($\alpha\beta$)₂ 的形式分散于类囊体内腔中。藻胆蛋白亚基的聚合方式是实现其能量传递功能的基础。蓝藻和红藻藻胆蛋白的种类、光谱性质和组成见表 1。

表 1 蓝藻和红藻藻胆蛋白的种类和组成

Tab. 1 Kinds and composition of phycobiliproteins of cyanophytes and rhodophytes

种类	分布	可见光 吸收峰 (nm)	荧光 发射峰 (nm)	亚基 组成	发色基 构成
b-PE	红藻	545,563(肩峰)	570	($\alpha\beta$) ₆	6PEB
B-PE	红藻	545,563,498(肩峰)	575	($\alpha\beta$) _{6\gamma}	6PEB
C-PE	蓝藻	560	577	($\alpha\beta$) _{3,6}	5-6PEB
R-PE	蓝、红藻	565,540,498	578	($\alpha\beta$) _{6\gamma}	不明
C-PC	蓝、红藻	620	640	($\alpha\beta$) _{3,6}	3PCB
R-PC	红藻	617,555	636	($\alpha\beta$) _{3,6}	2PCB,1PEB
AP	蓝、红藻	650	660	($\alpha\beta$) ₃	2PCB
AP-B	蓝、红藻	671,618	673	($\alpha\beta$) ₃	2PCB
PEC	蓝藻	570,595(肩峰)	625	($\alpha\beta$) _{3,6}	2PCB,1PXB

2. 结构

目前,已有 7 种藻胆蛋白的 12 个亚基的氨基酸顺序已被完全探明(表 2)。对层理鞭枝藻 *Mastigocladus laminosus* AP,PC 和 PEC 氨基酸顺序资料的比较研究表明, α - α 之间的同源性为 27.2—62%, β - β 之间的同源性为 36.5—66.6%,其中 PC 与 PEC 最接近,PC 与 AP 较接近,AP 与 PEC 较不接近(Wehrmeyer,1983)。这说明藻胆蛋白可能是同祖起源的。对 C—PC 氨基酸顺序资料的比较研究发现,*Cyanidium* 与 *Mastigocladus* 之间亲缘关系最近(α , β 亚基之间的同源性分别为 81%与 79%),*Cyanidium* 与 *Synechococcus* 6301 之间亲缘关系较近(α , β 亚基之间的同源性分别为 70%与 74%),*Mastigocladus* 与 *Synechococcus* 6301 之间亲缘关系较远(α , β 亚基之间的同源性分别为 68%与 73%)(Wehrmeyer,1983),这项研究结果对于研究藻类内部种间分化具有重要意义。通过 X 射

线晶体衍射研究发现, *M. lamosus* C-PC 的 α 与 β 亚基具有对应的 8 个 α -螺旋片段, *Agmenellum quadruplicatum* (*Synechococcus* 7002) C-PC 的 α 与 β 亚基具有对应的 9 个 α -螺旋片段 (Shirmer et al., 1986)。通过对 *A. quadruplicatum* 三维构象的研究发现, C-PC 的 α 与 β 亚基均形成平缓的“弯月”构象, “弯月”主干为 3 个 α -螺旋 (19—63 个残基)。X 射线衍射晶体单位由 3 个 ($\alpha\beta$)₆ 六聚体组成, 每个六聚体由两个 ($\alpha\beta$)₃ 三聚体靠极性和离子作用吸引头碰头构成 (Shirmer et al., 1986)。藻胆蛋白高级结构之间的相似性是由一级结构的同源性决定的。

表 2 一级结构已完全探明的藻胆蛋白

Tab. 2 Kinds of phycobiliproteins of completely determined primary structure

种类	亚基	门 类	文 献
C-PC	α, β	<i>Mastigocladus lamosus</i>	Zuber 等, 1985
	α	<i>Cyanidium caldarium</i>	Offner 等, 1981
	β	<i>C. caldarium</i>	Troxler 等, 1981
	α	<i>Synechococcus</i> 6301	Walsh 等, 1980
	β	<i>Synechococcus</i> 6301	Freidenreich 等, 1978
AP	α, β	<i>M. lamosus</i>	Zuber 等, 1985
	α	<i>C. caldarium</i>	Offner 等, 1982
	β	<i>Anabaena variabilis</i>	Delange 等, 1981
PEC	α, β	<i>M. lamosus</i>	Zuber 等, 1985

二、藻胆蛋白基因的研究以及基因工程前景

目前, 人们已从 3 种蓝藻以及真核藻 *Cyanophora paradoxa* 的光合结构 Cyanelle 中分离出藻胆蛋白基因 (表 3)。分离方法主要有两种, 一是利用人工合成寡聚核苷酸探针从基因文库中筛选; 二是利用藻胆蛋白基因分子杂交 (允许失配) 筛选。就目前所知, 蓝藻藻胆蛋白基因以多基因簇形式存在于染色体基因组的单拷贝区。在真核藻 *C. paradoxa* 中, 藻胆蛋白基因以单拷贝成簇存在于 Cyanelle 基因组中。在所有已被研究的藻类中 AP 和 PC 的 α, β 亚基基因 (简称 $\alpha^{\text{AP}}, \beta^{\text{AP}}$ 与 $\alpha^{\text{PC}}, \beta^{\text{PC}}$) 都以双顺反子转录, 以保证细胞中这两种亚基水平接近 1:1, 而且这些基因均以 5'—3' 方向排列在基因组中。在蓝藻 *Fremyella diplosiphon* (色适应型) 中, AP 基因、红光诱导型 PC 基因 (只在红光中转录) 与组成型 PC 基因 (在红光与绿光中都转录) 依次成簇排列, 紧密连锁 (Conley et al., 1985)。在 *C. paradoxa* Cyanelle 基因组中, AP 基因位于 PC 基因上游 30kbp 处, 并与 PC 基因成反向转录 (Bryant et al., 1985 a)。在已被研究的藻类中, α^{AP} 总位于 β^{AP} 上游, α^{PC} 总位于 β^{PC} 下游。据 Bryant 等 (1985 a) 报道, 在 *C. paradoxa* Cyanelle 基因组中, α^{AP} 与 β^{AP} 间隔一富含 A—T 碱基对的 39bp 内含子, 据 Houmard 等 (1986) 报道, 在 *Synechococcus* 6301 染色体基因组中, α^{AP} 位于 β^{AP} 上游 56bp 处。至于 *Synechococcus* 7002 染色体基因组中 β^{PC} 与 α^{PC} 之间的间隔, Pilot 等 (1984) 报道的结果 (108bp) 比 de Lorimier 等 (1984) 的结果 (105 bp) 多 3 个碱基

对。通过对藻胆蛋白基因核苷酸顺序的比较研究,发现藻胆蛋白基因具有高度保守性。Lind 等(1985)通过对 *Synechococcus* 6301 β^{PC} 部分核苷酸顺序的测定,发现与 *Synechococcus* 7002 相应片段之间具有 70.4%的同源性。通过对 *Synechococcus* 6301 与 *Cyanelle* α^{AP} 之间核苷酸顺序的比较发现,二者之间具有 69%的同源性,而 β^{AP} 之间的同源性更高,达 72% (Houmard et al., 1986)。 α 亚基与 β 亚基之间的同源性较低,*Synechococcus* 7002 的 α^{PC} 与 β^{PC} 之间为 46% (de Lorimier et al., 1984),*Synechococcus*6301 的 α^{AP} 与 β^{AP} 之间同源性在 30%以下 (Houmard et al., 1986)。这些结果表明,藻胆蛋白很可能来自同一祖先基因,先分化出 α 和 β 亚基基因,再各自进化,形成今天这样纷繁多样的藻胆蛋白。Conley 等 (1985)将藻胆蛋白的同源性用于藻胆蛋白基因的分离中,利用 *Cyanelle* PC 基因酶切片段与 *F. diplosiphon* 染色体 DNA 酶切片段分子杂交分离 PC 基因,失配率为 40%左右。

表 3 已经分离的藻胆蛋白基因

Tab. 3 Isolated phycobiliprotein genes

藻类	基因	来源	文献
<i>Synechococcus</i> 6301	α^{AP}, β^{AP}	染色体基因组	Houmard 等, 1986
	β^{PC}	染色体基因组	Lind 等, 1985
<i>Synechococcus</i> 7002	α^{PC}, β^{PC}	染色体基因组	Pilot 等, 1984
			de Lorimier 等, 1984
<i>Fremyella diplosiphon</i>	红光诱导 α^{PC}, β^{PC}	染色体基因组	Conley 等, 1985
<i>Cyanophora paradoxa</i>	α^{AP}, β^{AP}	Cyanelle 基因组	Bryant 等, 1985a
	β^{PC}	Cyanelle 基因组	Lemaux 等, 1984

在上述研究的基础上, Bryant 等 (1985 b) 成功地在大肠杆菌中表达了 *Synechococcus* 7002 脱辅 α^{PC} 和 β^{PC} 以及 *C. paradoxa* 脱辅 α^{AP} 与 β^{AP} , 为藻胆蛋白基因工程研究开创了道路。目前, 转移藻类基因的合适载体尚未找到, 受体系统正在建立中, 国际上藻类基因工程的研究还处在摸索和起步的阶段。藻类具有固氮、耐盐以及蛋白质含量丰富等优良性状, 基因工程前景十分广阔。藻胆蛋白在某些藻类中含量十分丰富, 是极有开发价值的营养来源。将藻胆蛋白基因转入细菌中, 利用发酵生产藻胆蛋白, 可能成为提供食用和饵料蛋白的有效途径。对海带等大型经济海藻蛋白质性状进行基因工程改良, 培育海洋粮食作物, 也需要这类藻类基因。目前藻胆蛋白及基因的研究吸引了世界各国的科研力量, 藻胆蛋白分子生物学的研究成为藻类分子生物学研究的热点和突破口。在许多领域, 特别是在基因工程研究方面国内尚属空白。目前国内急需开展这方面工作, 以推动光合作用和藻类分类、起源研究以及藻类资源的开发。我国藻类工作者应抓住国际上藻类分子生物学和基因工程研究尚处在起步阶段这一有利时机, 优选目标, 力争在藻胆蛋白分子生物学以及基因工程研究方面有所突破。

参 考 文 献

- 胡鸿钧, 俞敏娟, 张宪孔, 1980. 科学通报 14: 651—653.
 Allen, M. B. et al., 1959. *Nature* 184: 1047—1049.
 Bryant, D. A. et al., 1985a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3242—3246.

- Bryant, D. A. ,1985b. *FEMS Microbiology Letters* **29**:343—350.
- Conley, P. B. et al. ,1985. *Science* **230**:550—553.
- Delange, R. J. et al. ,1981. *J. Biol. Chem.* **256**:9558—9566.
- de Lorimier, R. et al. ,1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:7946—7950.
- Freidenreich, P. et al. ,1978. *J. Biol. Chem.* **253**:212—219.
- Houmard, J. et al. ,1986. *Mol. Gen. Genet.* **205**:404—410.
- Lemaux, P. G. et al. ,1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4100—4104.
- Lind, L. K. et al. ,1985. *FEBS letters* **188**:27—32.
- Offner, G. D. et al. ,1981. *J. Biol. Chem.* **256**:12167—12175.
- Offner, G. D. et al. ,1982. *Fed. Proc.* **41**:1179.
- Pilot, T. J. et al. ,1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:6983—6987.
- Shirmer, T. et al. ,1986. *J. Mol. Biol.* **188**:651—676.
- Troxler, R. F. et al. ,1981. *J. Biol. Chem.* **256**:12176—12184.
- Walsh, P. G. et al. ,1980. *Fed. Proc.* **39**:1998.
- Wehrmeyer, W. ,1983. *Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 143—159.
- Zuber, H. ,1985. *Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus*. Coldspring Harbour Laboratory, pp. 183—190.

Molecular Biology and Genetic Engineering of Phycobiliproteins: Review and Prospects^①

Qin Song

Abstract

Phycobiliproteins are photosynthetic antennae pigments found in cyanophytes, rhodophytes, cryptophytes and certain dinoflagellates. Molecular biology studies of phycobiliproteins progressed fast in recent years, especially on their primary, secondary and tertiary structures, and on the isolation and nucleotide sequencing of phycobiliprotein genes. These studies revealing high degree of homology of the amino acid and nucleotide sequences, may be interpreted as evidence and basis for evaluation taxonomic transspecific differentiation of algae and elucidation of phycobiliprotein evolution lines. Phycobiliproteins, comprising as much as 40—60% of the soluble protein in these algae, may be a rich source of protein. Subunit genes of phycocyanin and allophycocyanin have been translated in *E. coli*; and genetic engineering of phycobiliproteins is attracting commercial interest. Progress of molecular biology studies of phycobiliproteins, including its composition and structure as well as gene library construction and gene isolation is summarized, and the prospects of genetic engineering of phycobiliproteins are discussed.

① Adviser: Zeng Chengkui and Lin Guang heng.

褐藻多糖化学理论研究进展^①

严小军

摘要 多糖、蛋白质、核酸是组成生命的基础。海藻多糖具有成分的复杂性、结构的独特性和功能的多样性。褐藻多糖化学理论是海藻多糖研究中开展得最为深入的一个分支。褐藻胶作为凝胶包埋基质的应用具有优越的性能,已受到了生物技术学家的广泛关注。近年来,利用大型、综合的仪器分析手段已深入地阐明了褐藻多糖组成和结构、结构和功能的关系,并展开了生物活性物质的生化研究。我国的褐藻多糖化学理论研究建立在海藻养殖业及海带加工业的基础之上,对褐藻多糖的生理生化研究起步较晚。本文综述了褐藻多糖化学理论研究的发展过程和研究现状,并对今后的发展方向和应用前景提出了见解。

褐藻是近海岸藻类群落的主要成员,大多属于底栖性的真核细胞植物。褐藻多糖包括褐藻胶、褐藻糖胶以及褐藻淀粉和纤维素。前两者含量约占海藻干品重量的60—70%,目前在化工、医药、化妆品、涂料、造纸、印染、生物制药等领域广泛应用的是褐藻胶。

褐藻胶是褐藻酸及其盐类的总称,它是细胞壁的主要成分,与少量纤维素共同担负着结构多糖的作用;褐藻糖胶是胞间衬质,和蛋白质形成的复合物能防止水分挥发;褐藻淀粉是褐藻的贮存多糖,为生物体的新陈代谢提供能量。

一、褐藻胶及其组分的结构成分分析

自从1881年英国的Stanford从狭叶海带中首次发现褐藻胶以来,直到1955年,Fisher和Dorfel才测定出了褐藻胶的组成是D-甘露糖醛酸和L-古罗糖醛酸。早期应用的方法是高碘酸降解及Smith还原,甲基化分析,两次水解后纸色谱层析,阴离子交换柱层析以及还原糖的化学分析方法等。近年来则较多地运用仪器分析。

1. 比色分析

褐藻胶含量分析的经典方法有:酸碱滴定法、脱羧法、醋酸钙法及比色分析。比色分析简单快速,适合于常规半微量分析。通常采用的显色剂有:硫酸苯酚、地衣酚、 α -萘酚、蒽酮、吡唑等。Kennedy(1986)寻找了一种特效显色剂聚亚己基缩二胍盐酸($\text{PHMBH}^+\text{Cl}^-$)直接与酸性多糖形成复合物沉淀,然后测定残余的显色剂量,其紫外吸收的灵敏度可以达到0.1—0.5mg/ml。

2. 气相色谱法

气相色谱法具有高灵敏度、高分离效能、分析速度快的特点。特别是毛细管气相色谱

^① 导师:张燕侠。

法的广泛使用使色谱分离的分辨率大大提高。对于褐藻胶这种具有多羟基的高极性酸性聚合物来说,要进行水解和衍生化的前处理。

(1)水解法 水解的最佳条件是副反应降至最小,回收率达到最大。目前采用的水解步骤有:

A. 二步酸水解法(Haug, 1962):将褐藻胶于室温时用浓酸水解,由于褐藻胶是以块结构组成的多糖链,抗水解能力按 $GG > MM > MG$ 的次序排列,因此褐藻胶首先将断裂成 GG 块、MM 块和 MG 块,然后将浓酸加以稀释,提高水解温度,进一步降解成单糖。这一方法是褐藻胶分析的标准方法。Anzai 等(1990)对水解温度和时间等细节作了进一步的探索,将第一步水解的温度稍加提高,得到了较好的回收率,缩短了分析时间。

B. 甲醇盐酸分解(HA, Y. W., 1988):由于糖醛酸羧基的电荷效应使糖苷键稳定化,从而在一定程度上抗水解,而且酸水解容易使糖醛酸缩水形成内酯,这一反应是非定量化的,影响了定量分析的重复性和准确性。因引,采用甲醇盐酸分解来克服上述缺点,得到的分解产物同样适合于气相色谱分析。但是,这一方法必须保证无水条件,因水分的存在将引起甲基糖苷的降解;加入醋酸甲酯移去反应产生的水分,且对衍生化产物峰的分辨没有影响。

C. 三氟醋酸水解(Walters, 1988):此水解条件温和,反应迅速,能应用于中性糖和酸性糖的同时测定。但是,三氟醋酸对多糖的水解程度是否完全,值得怀疑。

(2)衍生化方法 该法的理想条件是定量产率,无异构化,简单快速。目前常用的衍生化技术有:

A. 糖醇乙酸酯(Lehrfeld, 1987):将醛酸、糖醛酸及糖醛酸内酯先用碳酸钠溶液中和,使糖醛酸及其内酯均转化为糖醛酸钠,然后硼氢化钠还原,利用阳离子交换树脂中和,得到糖醇及糖酸酯,加入丙胺吡啶和醋酐吡啶,将其分别转化为糖醇乙酸酯和糖酸丙胺乙酸酯。在毛细管气相色谱极性柱上程序升温分离,结果良好。在还原过程中,加入少量 1-甲基咪唑作催化剂,可以加快反应速度,而不受 BO_3^- 干扰。

B. 三甲基硅醚化(HA, Y. W., 1988):此反应操作简单,产物稳定,挥发性好。以六甲基二硅胺烷、三甲基氯硅烷和吡啶组成的衍生化试剂对单糖及糖醛酸都能使用。但是糖苷键异头碳的存在,将在色谱图上出现多峰现象。所以此法适合于简单样品分析。对于糖醛酸,以二甲基亚砷代替吡啶作溶剂可以得到更高的衍生化产率。对于甲醇盐酸分解产物,则可以用吡啶作溶剂,或者以 1-甲基咪唑代替吡啶。

C. 三氟醋酸酯(Englmaier, 1985):此衍生化产物具有最高的挥发性,且适合于高灵敏度的电子俘获检测器检测或以质谱检测。通常采用三氟醋酐和吡啶作衍生化试剂,多余的试剂必须在色谱分析前除去,而使用 N-甲基三氟乙酰胺代替三氟醋酐则克服了这种缺点。MBTFA 具有较高的挥发性,衍生化过程中生成的胺不干扰气相色谱分析。

3. 高效液相色谱法(Annison, 1983)

离子交换液相色谱柱层析是分析褐藻胶组成 M/G 比的经典方法,采用梯度淋洗的操作技术相当复杂冗长,只能适用于制备标准样品。高效液相色谱则具备了简单快速的特点,与气相色谱法相比,它不需要衍生化步骤。特别是键合固定相的使用,防止了固定相的流失,延长了柱寿命,减少了污染。因此高效液相色谱特别适合于简单组分分析;对于复杂

组分,其分辨率不如毛细管气相色谱。高效液相色谱的种类较多,反相柱色谱、凝胶渗透排阻色谱及离子交换色谱均能使用于糖组分分析,并且能够分离单糖和寡糖,研究水解条件是否完全。

4. ^1H NMR 和 ^{13}C NMR

核磁共振技术是研究多糖组成和序列结构的有效工具。 ^1H NMR 主要解决多糖结构中糖苷键的构型问题。核磁共振的主要结构参数是化学位移 δ 和耦合常数 J 。多糖质子的信号大多数集中在 δ 4.0—5.5mg/L 范围,C1 上质子的信号在 δ 4.8—5.5mg/L 其余的信号则集中于 δ 4.0—4.8mg/L 范围内。一般说 α 型吡喃糖的 C1 上质子的 δ 值超过 5.0mg/L,而 β 型则小于 5.0mg/L。以重水作溶剂、四甲基硅烷为参考标准,从所得到的褐藻胶核磁共振谱可以看出糖组分构型是 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古罗糖醛酸。运用铜系位移试剂可以将峰进一步分辨解析。在高磁场核磁共振谱中,褐藻胶的单元组分由于邻近糖的构象不同,因而所引起的不同核屏蔽效应将造成质子化学位移也不同。这种空间效应引起的化学位移差别可以测定褐藻胶的序列结构(Grasdalen,1983)。

^{13}C 的天然丰度只有 ^1H 的 1%,它的信号灵敏度只有 ^1H 的 1/63,因此总的灵敏度只有 ^1H 的 1/6000。但是由于脉冲傅里叶转换方法的应用,使 ^{13}C NMR 得到了清晰的光谱。碳氢去偶合谱得到的 ^{13}C 化学位移都处于独立区域内,没有重叠。它也是以重水为溶剂、四甲基硅烷作参照标准,同时利用核的奥氏效应得到噪音很低的高分辨图谱。同样, ^{13}C 的位学位移也受到褐藻胶多糖链序列结构的空间效应;特别是前后邻近两个单元的糖组分构象不同,能引起化学位移的细微差别。从谱图解析可以得到 β -D-甘露糖醛酸的构象是 1C,而 α -L-古罗糖醛酸的构象也是 1C。另外,根据谱图显示峰的强度可以计算出 M/G 比及块结构分布(Grasdalen,1981)。

5. CD 谱(Morris,1980)

糖具有手性碳原子引起的旋光性,如果以偏振光照射将引起旋光色散。以圆二色性偏振光照射引起的吸收谱称为圆二色性谱。这种吸收对应于第一康顿效应,它与糖的构型有关。对褐藻胶作 CD 分析,在 200nm 附近出现一个波峰,在 215nm 附近出现一个波谷,其相对强度随着组成的不同而变化。对于聚甘露糖醛酸,则只有一个强的正波段;对于聚古罗糖醛酸,则只有一个负波段;而 MG 块则处于中间。因此,这一方法提供了直接的 M/G 比信息。由于该方法不破坏样品,可以作为其它方法的参照。

6. GC-MS

由于糖的难挥发性和热不稳定,限制了电子轰击质谱法对低聚糖的研究,因而必须将糖衍生化提高其挥发性和热稳定。质谱对样品的这种要求正好吻合了气相色谱分离技术的性能,从而发展了 GC-MS 的应用。应用质谱法对糖的衍生物加以检测、解析,能够精确预测出单糖的种类及低聚糖的序列。这一方法正成为碳水化合物结构研究中最有效的方法之一。特别是数据处理系统的发展,使这一方法的精确性和重复性均大大提高,对于研究化合物的碎裂途径及糖的序列结构特别有用(张惟杰,1987)。

7. IR 谱及同位素示踪标记法

红外光谱是分子振转区吸收图谱,每一种化合物都具有特殊的红外光谱。在糖类应用中可以识别吡喃糖和呋喃糖,确定多糖中各种吡喃糖的糖苷键类型。甘露糖苷则有 810 及 870 cm^{-1} 的特征吸收峰。褐藻胶的红外谱图显示甘露糖醛酸的特征吸收峰是 808 cm^{-1} ,古罗糖醛酸的特征吸收峰是 787 cm^{-1} ,其强度之比即 M/G 比。但是,红外光谱的定性分析受外界环境影响较大,光的强度较弱,故只能作为一种估测。

同位素示踪法首先应用于糖醛酸测定,利用氚标记的硼氟化钠还原糖醛酸,然后水解后作气相色谱分析(Prihar, 1981)。其后,利用标记寡糖与荧光素的缀合作为探针研究褐藻胶的凝胶次单元(Valarie, 1989)。

8. 凝胶电泳及酶法分析

褐藻多糖成分复杂,且都是异聚性多糖。褐藻胶在酸性水解后的块结构分析及褐藻糖胶的组分分析均可以使用凝胶电泳的方法来鉴定其纯度和组成。对于褐藻胶,首先用褐藻胶裂解酶将其分解为 M 块及 G 块,然后于聚丙烯酰胺凝胶上作电泳分析,可以得到纯 M 块和 G 块,这一方法可用于制备标准。对于褐藻糖胶,可以测定凝胶渗透色谱分级分离产物的均一性(Nishino, 1989)。

褐藻酸裂解酶对褐藻胶及其碎片的活性和降解方式,可以找出共聚物单元分布的排布规律性。褐藻胶 C-5 差向异构酶可以研究褐藻胶中甘露糖醛酸转化为古罗糖醛酸的方式。研究表明,古罗糖醛酸块不易进行乙酸酯化,而酯化后的甘露糖醛酸块则不被裂解酶分解。褐藻中的甘露糖醛酸块积累到一定程度后将被 C-5 差向异构酶转变为古罗糖醛酸。这些研究结果表明,褐藻多糖化学研究正越来越多地应用生化技术。

二、多糖的胶体化学性能研究

褐藻胶具有性能优异的胶体性质,广泛应用于印染、医药、食品饮料、日用化工等领域。这些性能取决于褐藻胶分子的物理化学性质,如块结构和 M/G 比。当分子本身的物理化学性质发生变化时,其胶体性能也有相应变化。因此开展褐藻多糖的应用可以从结构研究和功能研究两方面入手。

1. 胶体性能

(1)增稠性 褐藻酸的一价阳离子及其低分子胺和镁盐能溶于水,具有高度的亲水性,即使在低浓度时也保持高的粘度。

(2)悬浮性 褐藻胶电离后带有负电荷,在颗粒表面形成保护层。

(3)絮凝性 线性高分子长链吸附了溶胶粒子后,由于本身链段的桥联作用而使固体粒子凝集而形成沉淀。

(4)乳化性 褐藻胶的增稠性以及保护胶体颗粒的能力使它能作为极好的乳化稳定剂。

(5)成膜性 褐藻胶能根据阳离子的价态不同而形成水溶性膜和水不溶性膜。由于

它能与多种有机物或生物有机质配伍、互溶,因此它具有包囊的功能,应用于药剂的缓释胶囊和微生物体或酶的包囊培育和固定化。

(6)成凝胶性 褐藻酸及其二价、三价阳离子能形成凝胶,这是褐藻胶最重要的特性。成凝胶的区域是聚古罗糖醛酸块。褐藻胶高分子链的G块与 Ca^{2+} 或具它阳离子螯合,形成蛋箱模型。这种凝胶的性能与粘度、分子量、块结构、孔隙度、M/G比等因素有关(Cheetham, 1979)。

2. 胶体物化特性

褐藻胶凝胶具有独特的物理化学性质,主要为:

(1)离子交换特性 由于褐藻胶与不同阳离子的结合常数和结合速度不同,因此它具有离子交换树脂的特性,能用于测定痕量的金属离子含量或者用于制备亲和气相色谱的固定相,也能吸附重金属离子处理饮用水。其离子交换容量的差别与M/G比有关。M/G比越小,离子交换容量越大。对于不同的金属离子,其离子交换亲和性顺序是 $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} = \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ 。另外,氢型、钠型、钙型褐藻胶的离子交换机理有所不同,它涉及到螯合作用和吸附作用^①。

(2)触变性 褐藻酸钙凝胶和褐藻酸钠溶液之间有一定的离子交换常数。这种凝胶和溶胶在一定条件下相互转化的现象称为触变性。触变体系可使电焊条表面涂层更加光滑,使用时没有爆溅,也可以改善药物包囊的缓释性能。

(3)包埋酶或微生物体的特性 褐藻酸钙包埋酶或微生物体的操作条件简单,配伍相容性强,温和没有毒性。这一方法已用于工业化生产,如酵母发酵制取酒精,杂化瘤细胞的单克隆抗体培育以及植物胚胎的大量繁殖等。因而成为现代生物技术中很有发展前途的方法之一。褐藻酸钠与细胞的悬浮液中滴加入氯化钙溶液,可以形成包埋细胞的球状胶珠,这种胶珠具有多孔性的凝胶网络结构,可以使营养盐基质自由扩散而防止细胞蛋白质的流失(Johansen, 1986)。

另外,这种凝胶包埋和离子交换特性的综合运用可以制成高度选择性的酶电极,用于生化成分的研究和痕量元素的测定。

三、生物活性物质的研究

多糖是所有生命有机体的基本组分,并与维持生命的许多重要功能有关。海藻中含有许多特殊的多糖。近年来,具有生物活性的天然产物被广泛研究并应用于医药行业。主要的生物活性是指:免疫活性、抗凝血活性、抗体活性、抗肿瘤活性、抗发炎活性及低血糖活性等。这些天然产物制成的抗生素和毒素等生化制品在抗菌、抗病毒、治癌等市场中具有很大的潜力。相对于廉价的合成药物来说,天然产物具有特殊的生物活性和高度的专一性(Metting, 1986)。

对于褐藻多糖来说,研究并提取其生物活性物质尚处于起始阶段。褐藻糖胶具有抗凝血的功能,其作用的原理类似于肝素,因为糖胶长链中含有硫酸基团。马尾藻的一种分级

^① 郑乃余, 1989. 褐藻胶的离子交换性及吸附金属离子功能的研究。中国科学院海洋研究所硕士论文, 42—45。

分离组分具有抗肿瘤的性能,对它进行物理化学分析表明这种物质是硫酸脂的蛋白多糖。另外褐藻中的酚类物质具有抗菌活性(Baker,1984)。含有糖醛酸的多糖具有防治皮肤衰老、抗皱的作用,褐藻酸铵具有治疗狐臭的药效。但是这些药理药效的机理还不明确,这方面的许多专利申请表明褐藻多糖的医药用途还需要进一步开发探索。这种研究的困难主要是因为,不同糖单元残基之间存在着多种相互作用而形成次级结构,这种次级结构依赖于糖组分的构型及分子间氢键等多种因素,而且多糖与蛋白质之间通过糖苷键形成糖蛋白,从而使多糖复合物的次级结构异常复杂。

海藻生物活性物质的研究和开发,使农业园艺业领域也发生了变革。海藻作为饲料和肥料的实践始源于中世纪。海藻肥料能使营养条件较差的作物获得大幅度增产。研究者从海藻中提取得到了草木灰和许多种类的痕量元素,从而认为海藻中富含营养元素和微量元素是海藻肥效的主要原因。但是,随着海藻中植物生长调节物质的发现和提取,对海藻的肥料价值有了新的认识。另外,褐藻胶具有松软土壤的功能。对土壤内部环境的湿度和温度起着微空间的作用;褐藻糖胶经常用于树木移植时保护水分的挥发,避免树木长途运输时由于脱水而死亡。

1979年,南非申请了海藻液体提取物或海藻浓缩物的生产新工艺专利。这种产品是通过低温、减压导致细胞破裂的工艺生产的,由于避免了化学试剂及高温高压的使用,因此保留了海藻中生物物质的原有活性。经过研究分析表明,这种液体提取物中含有细胞分裂素,它能使植物发育出更好的根部系统,以保证营养和水分的吸收,抵御病毒的入侵和严寒的威胁,从而增加了作物的产量(Beckett,1990)。如果在我国也能设计出一套保持生物活性的海藻液体提取物工艺,将对我国土地贫脊地区的作物生产起极大的促进作用。

四、结 语

综合以上论述,褐藻多糖化学的理论研究是与褐藻胶工业的发展同步进行的,理论研究的成果为进一步开发利用褐藻胶及其它物质打下了扎实的基础,并提出了广阔的应用前景。近年来,褐藻多糖化学与生物工程技术和生物化学分析密切相关。今后,褐藻化学的理论研究方向是:

(1)致力于形成一套有关褐藻胶及其凝胶的组成、结构、功能相互关连并能用数学模式定量表达的理论体系。

(2)倾向于使用新的大型分析仪器研究其表面化学特征,特别是糖蛋白的结构和功能。同时,也应发展快速、综合的常规分析,为褐藻胶及其它多糖的工业生产提供更详细的物理化学数据。

(3)努力开发褐藻化工产品的新用途,从实践领域反过来促进褐藻化学研究的进一步发展,特别是生物活性物质的开发和研制将具有很大的理论价值和经济利益,能从其代谢产物的产生过程进一步了解褐藻的生理生化机理。

参 考 文 献

- 张惟杰,1987.复合多糖生化研究技术.上海科学技术出版社,128—150。
Annison,G.,1983. *J. Chromatogr.* 264:137—143.
Anzai,H.,1990. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(1):73—81.