



УДК 547.458.7+582.272

## ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

XXXV \*. ПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ НЕКОТОРЫХ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ  
ЯПОНСКОГО МОРЯ*Усов А. И., Кошелева Е. А., Яковлев А. И.**Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
Академии наук СССР, Москва*

Определены выходы и качественный моносахаридный состав полисахаридных фракций, полученных из 20 видов бурых водорослей Японского моря в результате экстракции разбавленной кислотой, растворами соды и оксалата аммония. Проведен также количественный анализ содержания глюкозы и фукозы в кислотных гидролизатах образцов водорослей. Фракции альгиновых кислот после дополнительной очистки охарактеризованы соотношением входящих в их состав моносахаридов (*D*-маннуровой и *L*-гулуруновой кислот), рассчитанным по данным спектров <sup>13</sup>C-ЯМР.

Бурые водоросли резко отличаются по полисахаридному составу от водорослей других отделов [2]. В качестве резервных полисахаридов они содержат ламинараны — семейство сравнительно низкомолекулярных глюканов, молекулы которых построены из β-1→3- и (в меньшей степени) β-1→6-связанных остатков *D*-глюкопиранозы. Ламинараны легко экстрагируются из водорослей разбавленными кислотами; вместе с ними извлекаются сульфатированные полисахариды, построенные главным образом из остатков *L*-фукозы (фукоиданы), но часто содержащие также галактозу, ксилозу, глюкуроновую кислоту, а иногда и маннозу (такие гетерополисахариды называют полисахаридами типа саргассана [3]). Последующая обработка остатка водоросли разбавленной щелочью позволяет извлечь альгиновые кислоты вместе с фракцией сульфатированных гетерополисахаридов (полисахариды типа аскофиллана), которые могут быть связаны с белком [4]. Дополнительные количества таких полисахаридов удаётся в ряде случаев экстрагировать оксалатом аммония [5]. Сульфатированные полисахариды, часто обозначаемые общим термином «фуканы» (по названию главного нейтрального моносахаридного компонента), являются сложными высокоразветвленными полимерами. Напротив, альгиновые кислоты обладают линейными молекулами, построенными из 1→4-связанных остатков β-*D*-маннуровой и α-*L*-гулуруновой кислот, и отличаются друг от друга только соотношением или распределением мономеров вдоль цепи; эти полисахариды находят широкое практическое применение [6].

Исследование полисахаридного состава бурых водорослей представляет интерес в связи с расширяющимися возможностями их промышленного культивирования и хозяйственного использования. Предыдущие работы по сравнительному полисахаридному анализу бурых водорослей Японского моря были посвящены, как правило, отдельным типам полисахаридов — фуканам [7, 8], ламинаранам [9], альгиновым кислотам [10, 11] или менее индивидуальным фракциям [12]. Имеющиеся данные, на наш взгляд, все еще нуждаются в уточнении. Поэтому целью настоящей работы было определение содержания полисахаридов упомянутых выше типов в 20 наиболее обычных для Японского моря видах бурых водорослей, а также более подробная характеристика выделенных альгиновых кислот. Подобные сведения представляются необходимыми как при оценке перспективности отдельных видов водорослей для марикультуры, так и при выборе полисахаридов для углубленного химического исследования.

\* Сообщение XXXIII см. [1].

Следует заметить, что содержание полисахаридов (в первую очередь резервного ламинарана) может изменяться в зависимости от сезона и стадии развития водоросли. В данной работе мы не имели возможности исследовать сезонные изменения и ограничились только анализом видовых различий в полисахаридном составе; большая часть водорослей (14 видов) была собрана в сентябре и только шесть видов — весной или летом (с марта по август).

Общая для всех водорослей методика определения полисахаридов заключалась в следующем. Высушенные и измельченные водоросли вначале обрабатывали органическими растворителями для удаления низкомолекулярных веществ; все выходы полисахаридов рассчитаны на полученный таким образом обезжиренный материал. Далее каждую водоросль обрабатывали двумя способами. С одной стороны, проводили кислотный гидролиз образцов водорослей по аналогии с методикой определения ламинаранов [13], но в гидролизатах анализировали содержание не только глюкозы (ферментативным методом), но и фукозы (специфической реакцией с *L*-цистеином). Полученные данные (таблица) позволяют оценить содержание в водорослях ламинаранов и фуканов. С другой стороны, была проведена ступенчатая экстракция водорослей. Вначале разбавленной кислотой при комнатной температуре извлекали ламинаран и полисахариды типа фукоидана или саргассана (фракция I). Остаток водоросли экстрагировали содовым раствором и после подкисления экстракта получали в осадке альгиновую кислоту (фракция III), а из маточного раствора выделяли полисахариды типа аскофиллана (фракция II). Далее остаток водоросли обрабатывали оксалатом аммония и из экстракта получали фракцию IV; остаток после экстракции дал фракцию V. Выходы фракций I—V для всех водорослей приведены в таблице.

Моносахаридный состав полученных фракций определяли с помощью гидролиза 2 н.  $H_2SO_4$  и анализа гидролизатов методами БХ и ГЖХ (в последнем случае — в виде ацетатов полиолов). При таком анализе возникают трудности с определением уроновых кислот; в свою очередь частичное восстановление лактонов этих кислот при получении полиолов может искажать соотношение нейтральных моносахаридов, определяемое методом ГЖХ. Поэтому хроматографические данные представляют собой лишь качественную характеристику полисахаридных фракций. Тем не менее с помощью ГЖХ показано, что основное количество глюкозы образуется при гидролизе фракций I и, следовательно, действительно происходит из ламинарана. Главным нейтральным моносахаридом фракций I, II и IV в подавляющем большинстве случаев является фукоза, что означает, что эти три фракции в основном содержат фуканы различного типа. В меньших количествах в гидролизатах фракций I, II и IV встречаются галактоза, ксилоза и манноза, причем содержание этих дополнительных моносахаридов, как правило, увеличивается для каждой водоросли при переходе от фракции I к II и далее к IV. Фукоидан, молекулы которого построены практически только из остатков фукозы и сульфата, найден лишь во фракции I из *Chorda filum* (№ 8); эта фракция дает при гидролизе фукозу и глюкозу, но легко может быть освобождена от примеси ламинарана цетавлоновым осаждением [14].

Сравнивая между собой выходы фракций, приведенные в таблице, можно заметить, что водоросли с высоким содержанием фуканов (фракции I, II и IV) дают сравнительно мало альгиновой кислоты (фракция III), и наоборот. Представители одного семейства обычно ближе друг к другу по полисахаридному составу, чем водоросли, находящиеся в более отдаленном родстве.

Гидролиз фракций альгиновых кислот (III) дал практически во всех случаях примесь небольших количеств нейтральных моносахаридов, поэтому эти фракции подвергались дополнительной очистке (см. «Экспериментальную часть»). Важнейшей характеристикой альгиновых кислот, определяющей в первом приближении их физико-химические свойства, является соотношение двух входящих в их состав моносахаридов — *D*-маннуроновой (M) и *L*-гулууроновой (G) кислот. Определение этого соотноше-

Полисахаридный состав

№	Водоросль	Фукоза, %	Глюкоза, %
	Класс Phaeosporophyceae		
	Порядок Chordariales		
	Сем. Corynophlaeaceae		
1	<i>Leathesia difformis</i> (L.) Aresch.	16,4	0
	Сем. Chordariaceae		
2	<i>Sphaerotrichia divaricata</i> (Ag.) Kyl.	16,8	2,6
3	<i>Chordaria flagelliformis</i> (Müll.) Ag.	28,4	9,1
	Порядок Ralfsiales		
	Сем. Ralfsiaceae		
4	<i>Analipus japonicus</i> (Harv.) Wynne	25,6	2,5
	Порядок Dictyosiphonales		
	Сем. Punctariaceae		
5	<i>Punctaria plantaginea</i> (Roth.) Grev.	5,8	1,1
	Порядок Scytosiphonales		
	Сем. Scytosiphonaceae		
6	<i>Scytosiphon lomentaria</i> (Lyngb.) Link	6,1	1,6
	Порядок Desmarestiales		
	Сем. Desmarestiaceae		
7	<i>Dichloria viridis</i> (Müll.) Grev.	2,8	20,7
	Порядок Laminariales		
	Сем. Chordaceae		
8	<i>Chorda filum</i> (L.) Lam.	37,6	7,2
	Сем. Laminariaceae		
9	<i>Laminaria japonica</i> Aresch.	7,8	0,3
10	<i>Laminaria cichorioides</i> Miyabe	7,2	12,6
11	<i>Costaria costata</i> (Turn.) Saund.	13,8	1,5
	Сем. Alariaceae		
12	<i>Alaria fistulosa</i> Post et Rupr.	2,8	0,5
13	<i>Undaria pinnatifida</i> (Harv.) Sur.	7,8	0
	Класс Cyclosporophyceae		
	Порядок Dictyotales		
	Сем. Dictiotaceae		
14	<i>Dictyota dichotoma</i> (Huds.) Lam.	6,8	1,7
15	<i>Dictyopteris divaricata</i> (Okam.) Okam.	6,8	11,7
	Порядок Fucales		
	Сем. Cystoseiraceae		
16	<i>Cystoseira crassipes</i> (Turn.) C. Ag.	15,1	0
	Сем. Sargassaceae		
17	<i>Coccolophora langsdorffii</i> (Turn.) Grev.	6,3	0
18	<i>Sargassum pallidum</i> (Turn.) C. Ag.	6,0	1,6
19	<i>Sargassum miyabei</i> Yendo	8,3	0,7
	Сем. Fucaceae		
20	<i>Pelvetia wrightii</i> Okam.	6,7	1,4

\* Соотношение остатков D-маннуроносовой и L-гулууроносовой кислот.

ния химическими методами затруднительно, поскольку альгиновые кислоты гидролизуются только в жестких условиях, вызывающих сильную деструкцию мономеров, особенно L-гулууроносовой кислоты (см., например, [15]). Из физико-химических методов наилучшие результаты дает спектроскопия  $^{13}\text{C}$ -ЯМР [16], которая и была использована в нашей работе. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР альгинатов очень наглядны и уже по характеру сигналов аномерных атомов углерода легко позволяют отличать полимеры с преобладанием L-гулууроносовой кислоты от полимеров с преобладанием D-маннуроносовой кислоты (рисунок). Поскольку известна полная интерпретация сигналов в этих спектрах [16], можно рассчитать соотношения мономеров M/G, для чего мы использовали отношения суммы интегральных интенсивностей сигналов C1—C5 остатков  $\beta$ -D-маннуроносовой кислоты к соответствующей сумме интегральных интенсивностей сигналов C1—C5 остатков  $\alpha$ -L-гулууроносовой кислоты. Эти соотношения приведены в таблице; качественно они соответствуют величинам, найденным ранее для ряда аналогичных образцов с помощью химических методов [11], но количест-

бурых водорослей Японского моря

Выходы фракций, %					M/G * для альгиновых кислот
I	II	III	IV	V	
23,5	3,7	11,0	14,3	45,8	0,97
7,0	6,5	18,4	16,5	14,0	0,89
20,5	7,2	11,5	1,1	31,8	0,75
33,0	5,0	21,6	5,3	27,5	2,39
11,0	7,5	21,0	3,0	24,0	0,89
5,5	15,4	28,0	0	20,0	0,66
15,0	4,7	32,8	3,1	41,6	0,56
39,4	19,4	7,5	0	23,4	0,47
11,0	7,9	36,5	0,6	17,5	1,13
16,0	7,9	26,3	32,0	14,9	1,31
20,0	12,0	37,0	2,0	23,0	1,55
15,0	12,3	40,0	0	26,0	3,46
19,0	5,0	35,0	0	24,0	1,27
17,0	29,0	18,0	5,0	24,0	0,79
11,0	12,0	25,0	23,0	26,0	0,47
12,0	32,0	29,0	1,0	21,0	3,20
14,0	5,0	24,0	6,0	34,0	0,69
7,0	10,0	33,0	21,0	13,0	0,75
8,0	4,0	32,0	4,0	33,0	0,58
9,3	10,1	42,6	1,1	10,0	3,71

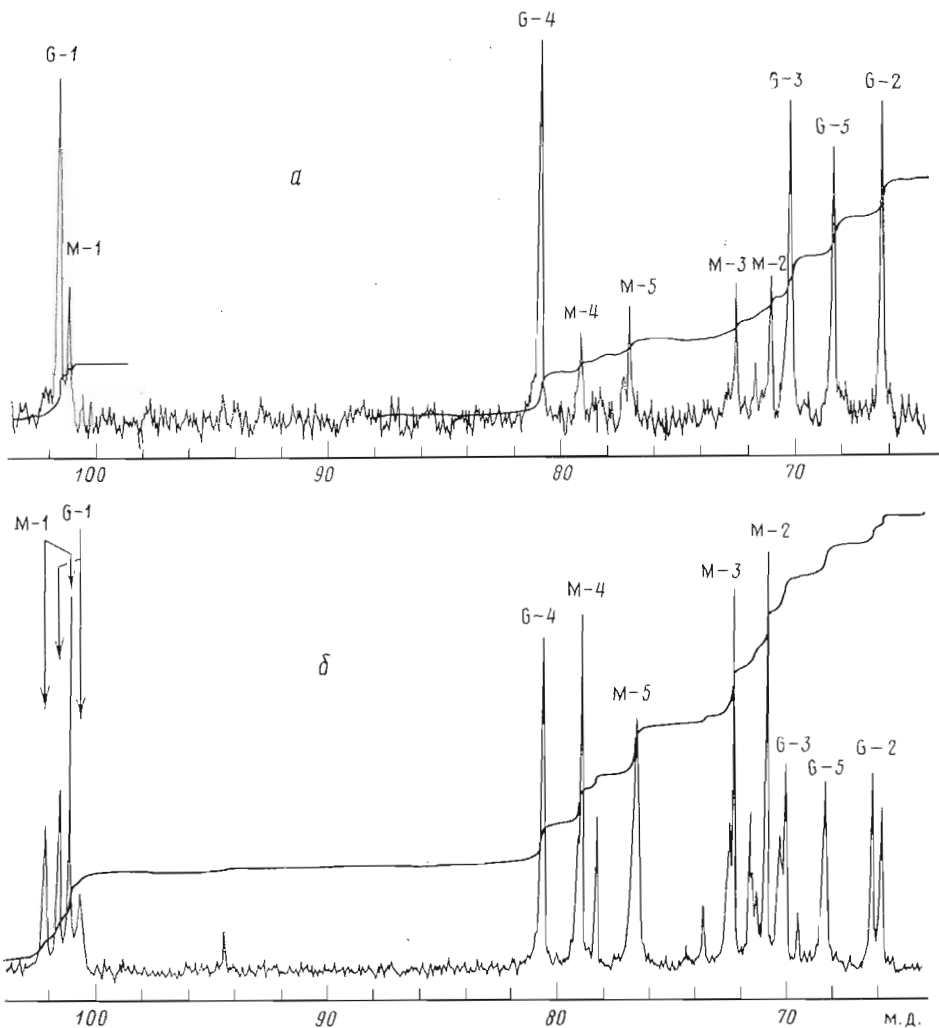
венно не совпадают с ними, на наш взгляд, за счет большей точности примененного нами неструктурного метода анализа.

Фракции V представляют собой нерастворимые водорослевые остатки, которые лишь в незначительной степени гидролизуются при нагревании с 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Основным продуктом гидролиза является глюкоза, образующаяся, по всей вероятности, из целлюлозы клеточных стенок.

Таким образом, бурые водоросли, исследованные в настоящей работе, могут служить источником разнообразных полисахаридов: альгиновых кислот с преобладанием в их составе D-маннуроновой (*Pelvetia*, *Alaria*), L-гулуруновой (*Chorda*, *Dictyopteris*) кислот или с практически одинаковым содержанием этих мономеров (*Laminaria japonica*), а также различных фуканов (*Chorda*, *Analipus*, *Cystoseira*) и ламинаранов (*Dichloria*, *Laminaria cichorioides*). Более подробному изучению некоторых из этих полисахаридов будут посвящены наши последующие сообщения.

#### Экспериментальная часть

Гидролиз образцов водорослей и полисахаридных фракций проводили 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 100° С в течение 6 ч с последующей нейтрализацией BaCO<sub>3</sub>. БХ гидролизатов выполняли нисходящим способом на бумаге Filtrak FN 11 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3; зоны



Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (область сигналов C1–C5) альгинатов из *Dictyopteria divaricata*, M/G 0,47 (а) и из *Costaria costata*, M/G 1,55 (б). Соответствующие сигналы остатков *D*-маннуроновой кислоты обозначены как M-1–M-5, *L*-гулуруоновой кислоты — как G-1–G-5

моносахаридов обнаруживали анилинфталатом. ГЖХ ацетатов полиолов [17] проводили на хроматографе Pye 104 с пламенно-ионизационным детектором (колонка  $0,6 \times 120$  см с 3% ECNSS-M, газхром Q,  $185^\circ\text{C}$ ). Определение фукозы в гидролизатах выполняли по реакции с *L*-цистеином и конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с измерением поглощения при двух длинах волн (400 и 427 нм) [18]; глюкозу в гидролизатах определяли с глюкозооксидазным реагентом Fermognost Blut-Zucker Test (ГДР).

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР получали на спектрометре Bruker-Physik WM-250 для 2% растворов полисахаридов в  $\text{D}_2\text{O}$  при  $90^\circ\text{C}$  в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами. Химические сдвиги сигналов измеряли относительно диметилсульфоксида как внутреннего стандарта и пересчитывали относительно тетраметилсилана по соотношению  $\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{DMSO}} + 39,5$  м.д.

*Сбор и предварительная обработка водорослей.* Водоросли № 1–4, 9, 10, 15, 17–20 собраны в сентябре 1977 г., а № 8 и 14 — в сентябре 1978 г. в зал. Посыета; № 11 и 13 — в августе 1978 г., № 5 — в июне 1979 г. в районе о. Попова; № 16 — в марте, № 6 — в апреле, № 7 — в июле 1978 г. в б. Рудная, № 12 — в сентябре 1978 г. на южном побережье о. Сахалин. Водоросли сушили на воздухе, измельчали, последовательно обрабатыва-

ли в аппарате Сокслета хлороформом, метанолом и ацетоном до получения бесцветных экстрактов и снова высушивали на воздухе.

**Выделение полисахаридов.** 10 г водоросли, предварительно обработанной органическими растворителями, как описано выше, перемешивали с двумя порциями по 500 мл 0,2 н.  $H_2SO_4$  в течение 6—7 ч при 20° С. Экстракты отделяли центрифугированием, нейтрализовали  $BaCO_3$ , снова центрифугировали, объединенный раствор концентрировали в вакууме до 150 мл и смешивали с 4 объемами этанола. Выпавший осадок (фракция I) отделяли центрифугированием, промывали этанолом, ацетоном и высушивали в вакууме над  $P_2O_5$ .

Остаток водоросли перемешивали в тех же условиях с тремя порциями по 500 мл 1%  $Na_2CO_3$ , экстракты отделяли центрифугированием, объединяли и прибавляли  $H_2SO_4$  до pH 1. Выпавший осадок (фракция III) отделяли, тщательно промывали водой, затем ацетоном и высушивали в вакууме над  $P_2O_5$ . Кислый маточный раствор нейтрализовали, прибавляя  $NaHCO_3$ , диализовали, концентрировали и приливали 4 объема этанола, осадок обрабатывали как описано выше, получали фракцию II.

Остаток водоросли промывали водой и экстрагировали двумя порциями по 500 мл 0,25% оксалата аммония в 0,25% щавелевой кислоте в течение 6 ч при 80° С. Нерастворившийся остаток отфильтровывали, промывали водой, ацетоном и высушивали, получали фракцию V. Экстракт диализовали, концентрировали и, прибавляя 4 объема этанола, осаждали фракцию IV.

Выходы фракций I—V для всех образцов водорослей см. в таблице.

**Очистка фракций альгиновых кислот.** 0,3 г фракции III в 100 мл 1%  $Na_2CO_3$  перемешивали 16 ч, небольшой осадок отделяли центрифугированием, к диализованному раствору приливали 100 мл 2%  $CaCl_2$ , выпавший осадок альгината кальция отделяли центрифугированием и промывали водой. Далее этот осадок перемешивали 2 ч с 300 мл 1 н.  $HCl$ , суспензию центрифугировали, осадок промывали 0,5 н.  $HCl$ , затем несколько раз водой, после чего суспендировали в воде и переводили в раствор, осторожно прибавляя 1 н.  $NaOH$ . Полученный раствор диализовали и лиофилизовали; очищенные (бесцветные) образцы альгинатов натрия использовали для получения спектров  $^{13}C$ -ЯМР.

Авторы выражают глубокую признательность Г. П. Смирновой (ИОХ АН СССР) за помощь при сборе водорослей в зал. Посыета, В. Ф. Пржеменецкой (ТИНРО, Владивосток) за предоставление образцов водорослей № 5, 11 и 13 с о. Попова, И. С. Гусаровой (Институт биологии моря ДВНЦ АН СССР) за предоставление образцов водорослей № 6, 7, 12 и 16, а также А. С. Пашкову (ИОХ АН СССР) за съемку спектров  $^{13}C$ -ЯМР альгинатов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Usov A. I., Ivanova E. G., Shashkov A. S. Bot. Mar., 1983, v. 26, № 6, p. 285—294.
2. Percival E., McDowell R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. L.: Acad. Press, 1967.
3. Abdel-Fattah A. F., Hussein M. M. D., Salem H. M. Carbohydr. Res., 1974, v. 33, № 1, p. 9—17, 19—24.
4. Larsen B., Haug A., Painter T. J. Acta chem. scand., 1966, v. 20, № 1, p. 219—230.
5. Mian A. J., Percival E. Carbohydr. Res., 1973, v. 26, № 1, p. 133—146.
6. McNeely W. H., Pettitt D. J. In: Industrial gums/Eds Whistler R. L., BeMiller J. N. N. Y.: Acad. Press, 1973, p. 49—81.
7. Оводов Ю. С., Хоменко В. А. Химия природн. соедин., 1969, № 2, с. 73—76.
8. Fujikawa T., Nakashima K. Nihon Nogeikagaku Kaishi, 1975, v. 49, № 9, p. 455—461.
9. Elyakova L. A., Zuyagintseva T. N. Carbohydr. Res., 1974, v. 34, № 2, p. 241—248.
10. Шмельцова Л. П., Митина Л. Л., Зимина Л. С. Исследования по технологии рыбных продуктов, 1968, № 4, с. 80—85.
11. Фаворов В. В. Исследование альгинов из моллюска *Littorina sp.* Дис. канд. хим. наук. Владивосток, ТИВОХ, 1974.
12. Mori H., Sasaki S. F., Nisizawa K. Bull. Jap. Soc. Phycol., 1977, v. 25, Suppl., p. 169—187.
13. Myklesstad S. In: Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods/Eds Hellebust J. A., Craigie J. S. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978, p. 133—141.

14. *Скотт Дж. Е.* В сб.: Методы химии углеводов. Пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967, с. 288—293.
15. *Haug A., Larsen B.* Acta chem. scand., 1962, v. 16, № 8, p. 1908—1918.
16. *Grasdalen H., Larsen B., Smidsrød O.* Carbohydr. Res., 1981, v. 89, № 2, p. 179—191.
17. *Слонекер Дж.* В сб.: Методы исследования углеводов. Пер. с англ. под ред. Хорлина А. Я. М.: Мир, 1975, с. 22—25.
18. *Душе З.* В сб.: Методы химии углеводов. Пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967, с. 42—44.

Поступила в редакцию  
13.XII.1984

## POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXXV. POLYSACCHARIDE COMPOSITION OF SEVERAL BROWN ALGAE OF JAPAN SEA

USOV A. I., KOSHELEVA E. A., YAKOVLEV A. P.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy  
of Sciences of the USSR, Moscow*

Yields and qualitative monosaccharide composition of polysaccharide fractions obtained from 20 species of brown algae from Japan Sea by extraction with dilute acid, aqueous sodium carbonate, and ammonium oxalate have been determined as well as quantitative content of glucose and fucose in acid hydrolyzates of the algal specimens. Additionally purified alginic acids have been characterized by *D*-mannuronic acid/*L*-guluronic acid ratio calculated from <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy data.