



УДК 582.273-119.2.088 : 577.114.5

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

41 *. ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ
НЕСКОЛЬКИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *LAURENCIA*
(CERAMIALES, RHODOPHYTA)

Усов А. И., Иванова Е. Г., Элашвили М. Я.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского
Академии наук СССР, Москва

Сульфатированные галактаны и смеси нейтральных водорастворимых полисахаридов выделены из шести образцов красных морских водорослей, относящихся к четырём видам рода *Laurencia* (литоральная и сублиторальная формы *L. nipponica* из Японского моря и черноморские эпифит и литофит *L. coronopus*, а также *L. obtusa* и *L. papillosa*). Однородность полученных галактанов охарактеризована с помощью ионообменной хроматографии. По данным химических анализов и спектров ¹³C-ЯМР, галактаны относятся к полисахаридам группы агара. Полисахариды из *L. coronopus* построены главным образом из 6-О-метилированных и 6-сульфатированных звеньев агаробиозы; прочие галактаны содержат звенья агаробиозы, ее 6-сульфата, соответствующие дисахаридные фрагменты, в которых остаток 3,6-ангидро-*L*-галактозы заменен остатком *L*-галактозы, и ряд неидентифицированных структурных элементов.

Красные водоросли рода *Laurencia* известны как богатейший источник разнообразных терпеноидов, часто весьма необычного строения [2]. Полисахариды этих водорослей исследованы значительно меньше. Как в большинстве других красных водорослей [3], в составе отдельных представителей рода *Laurencia* найдены флоридный крахмал [4] и сульфатированные галактаны. Подробное химическое изучение галактана из *L. pinatifida* [5, 6] показало, что его молекулы построены из 3-О-замещенных остатков *D*-галактозы, ее 6-метилового эфира или 2-сульфата и 4-О-замещенных остатков *L*-галактозы, 2-О-метил-*L*-галактозы, их 6-сульфатов, 3,6-ангидро-*L*-галактозы и ее 2-метилового эфира. Такой состав позволяет отнести этот полисахарид к группе агара. К этой же группе принадлежит и полисахарид из *L. undulata* [7], в котором чередование производных *D*- и *L*-галактозы в главной цепи доказано при изучении олигосахаридов, образующихся при частичном кислотном расщеплении; особенностью его строения является наличие ответвлений от главной цепи в виде единичных остатков α -*L*-галактозы, ее 4-метилового эфира и β -*D*-ксилозы. Имеющиеся в литературе сведения о полисахаридах из других видов рода *Laurencia* менее надежны. В частности, предположение о принадлежности к каррагинанам галактанов из танзанийской *L. papillosa* [8] и нескольких видов *Laurencia* Карибского бассейна [9], сделанные на основании ИК-спектров или невысокой желирующей способности растворов, выглядят неубедительными.

В наших предварительных исследованиях полисахаридного состава красных водорослей Японского моря [10] было показано наличие сульфатированного галактана в *L. nipponica*. Этот полисахарид расщеплялся β -агаразой, что позволяло отнести его к группе агара. Цель настоящей работы — более подробная характеристика полисахаридного состава *L. nipponica* и еще трех представителей рода *Laurencia*, обитающих в Черном море.

В качестве объектов исследования мы выбрали шесть образцов водорослей: две формы *L. nipponica* — литоральную и сублиторальную, сильно различающиеся по морфологическим признакам [11], две формы

* Сообщение 40 см. [1].

Выходы и моносахаридный состав полисахаридных фракций
По данным ГЖХ гидролизатов в виде ацетатов полиолов

Водоросль	Фракция *	Выход, %	Относительное содержание, моль/моль Gal				
			Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
<i>L. nipponica</i> , литоральная	I	21,0	—	0,02	Следы	—	1,0
	II	1,6	—	2,22	0,44	1,18	1,0
	III	38,5	0,08	0,08	0,37	0,35	1,0
<i>L. nipponica</i> , сублиторальная	I	23,3	—	0,06	Следы	—	1,0
	II	2,1	—	2,63	1,0	3,84	1,0
	III	42,3	1,2	0,62	0,62	0,75	1,0
<i>L. coronopus</i> , эпифит	I	19,8	—	0,47	—	—	1,0
	II	1,4	—	0,89	0,37	1,14	1,0
	III	41,1	0,5	0,25	0,11	0,06	1,0
<i>L. coronopus</i> , литофит	I	24,2	—	0,13	—	Следы	1,0
	II	2,4	—	1,67	0,75	3,6	1,0
	III	39,6	0,5	0,25	0,09	0,04	1,0
<i>L. obtusa</i>	I	19,6	—	0,09	—	—	1,0
	II	1,7	—	2,44	0,54	1,95	1,0
	III	40,5	0,32	0,11	0,39	0,34	1,0
<i>L. papillosa</i>	I	18,6	—	0,07	—	—	1,0
	II	2,0	—	0,58	0,21	0,37	1,0
	III	41,7	0,45	0,22	0,02	0,03	1,0

* Фракция III представляет собой водорослевый остаток; для нее приведен состав легко-гидролизуемой части.

Таблица 2

Состав кислых галактанов до и после модификации под действием щелочи

Водоросль	Галактан	Содержание, %			Соотношение по данным ГЖХ гидролизатов в виде ацетатов альдононитрилов			
		сахаров *	SO ₃ Na	3,6AnGal	Gal	6MeGal	3MeGal	Xyl
<i>L. nipponica</i> , литоральная	I	55,05	15,95	22,11	1	Следы	—	0,09
	I-M	56,34	15,21	23,10	1	»	—	0,10
<i>L. nipponica</i> , сублиторальная	I	51,35	14,89	19,05	1	»	—	0,02
	I-M	52,17	11,47	24,11	1	»	—	0,04
<i>L. coronopus</i> , эпифит	I	48,85	11,24	25,31	1	0,59	0,04	0,12
	I-M	53,27	12,31	26,47	1	0,56	0,04	0,13
<i>L. coronopus</i> , литофит	I	46,23	12,30	28,50	1	0,10	—	0,03
	I-M	48,28	12,52	29,21	1	0,15	—	0,05
<i>L. obtusa</i>	I	54,28	16,27	19,41	1	0,06	—	0,22
	I-M	53,75	16,48	20,05	1	0,07	—	0,26
<i>L. papillosa</i>	I	49,91	14,53	21,15	1	Следы	—	0,06
	I-M	52,37	13,98	21,40	1	»	—	0,07

* Общее содержание сахаров по реакции с фенолом и H₂SO₄ без 3,6AnGal.

L. coronopus, различающиеся способом прикрепления (эпифит и литофит), а также *L. obtusa* и *L. papillosa*. Все водоросли после сбора высушивали, измельчали и удаляли пигменты и низкомолекулярные вещества экстракцией метанолом. Далее проводили многократную экстракцию горячей водой, фракции I кислых полисахаридов осаждали из объединенных экстрактов бромидом цетилтриметиламмония (цетавлоном) и переводили в Na-соли. Из маточных растворов диализом и лиофилизацией выделяли фракции II нейтральных полисахаридов.

Все изученные образцы водорослей мало различаются по полисахаридному составу (табл. 1). Выходы кислых галактанов находятся в пределах 18,6—24,2%, выходы нейтральных полисахаридов — примерно на порядок ниже, а остатки после экстракции составляют 38,5—42,3%. Наличие галактозы в гидролизатах нейтральных фракций можно объяснить

неполным отделением низкосульфатированных молекул галактанов при осаждении цетавлоном; глюкоза, вероятно, происходит из фторидного крахмала, а ксилоза и манноза — из обычных для красных водорослей ксиланов и маннанов [3]. Указанные в табл. 1 моносахаридные компоненты водорослевых остатков относятся только к легко гидролизуемым полисахаридам, не перешедшим в раствор в процессе экстракции.

В составе кислых галактанов из разных образцов водорослей также не найдено больших различий (табл. 2). В качестве главных компонентов эти полисахариды содержали галактозу и 3,6-ангидрогалактозу, однако содержание последнего сахара ниже необходимого для построения регулярной углеводной цепи из повторяющихся дисахаридных остатков. Этой структурной особенностью объясняется, по-видимому, отсутствие у выделенных галактанов гелеобразующих свойств. Все галактаны содержат сульфатные группы (приблизительно один сульфат на 3 остатка галактозы), устойчивые к действию щелочи. Небольшое отщепление сульфата при щелочной обработке, сопровождающееся соответствующим увеличением содержания остатков 3,6-ангидрогалактозы, отмечено лишь для галактана сублитеральной *L. nipponica*. Это означает, что часть сульфатных групп в данном полисахариде занимает положения 6 в 4-О-замещенных остатках галактозы [12].

Кроме основных компонентов кислые галактаны содержат ксилозу и 6-О-метилгалактозу, а в галактане из эпифитной *L. coronopus* найдена также 3-О-метилгалактоза. Идентификация этих компонентов проведена с помощью хроматомасс-спектрометрии ацетилированных альдононитрилов [13]. Наибольшее содержание ксилозы отмечено в галактане из *L. obtusa*, 6-О-метилгалактозы — в галактане из эпифитной *L. coronopus*; в полисахаридах из обеих форм *L. nipponica* и из *L. papillosa* метилированные галактозы обнаруживаются лишь в следовых количествах.

Для оценки однородности кислых галактанов была применена ионообменная хроматография. Во всех случаях показано, что препараты полисахаридов содержат в незначительном количестве нейтральную фракцию, вымываемую водой, и один главный компонент, выходящий с колонки при градиентной элюции солевым раствором в районе 0,75—1,0 М NaCl. Точное положение главного пика на кривой элюции довольно хорошо коррелирует с содержанием в полисахариде сульфатных групп; после отщепления части сульфатных групп от галактана из сублитеральной *L. nipponica* в результате щелочной модификации главный пик на кривой элюции смещается в сторону меньших концентраций элюента (рис. 1).

Для получения сведений о строении выделенных галактанов использовали спектроскопию ^{13}C -ЯМР [14], с помощью которой была доказана принадлежность этих полисахаридов к группе агара, поскольку во всех спектрах в качестве главных пиков присутствует хорошо известная серия из 12 сигналов, относящихся к углеродным атомам звена агаробиозы. В то же время спектры ^{13}C -ЯМР свидетельствуют о наличии в молекулах галактанов своеобразных отклонений от регулярной структуры типа

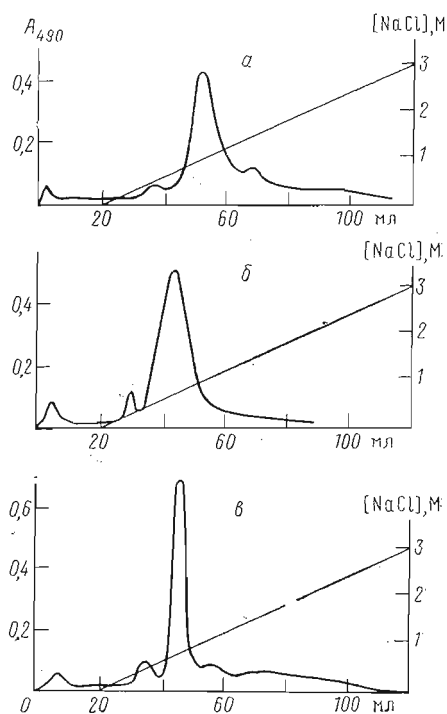


Рис. 1. Хроматография на колонке DEAE-Nucleogen 4000-7 (см. «Экспер. часть») сульфатированного галактана из сублитеральной *L. nipponica* (а), его же после модификации действием щелочи (б) и галактана из *L. coronopus* (эпифита) (в)

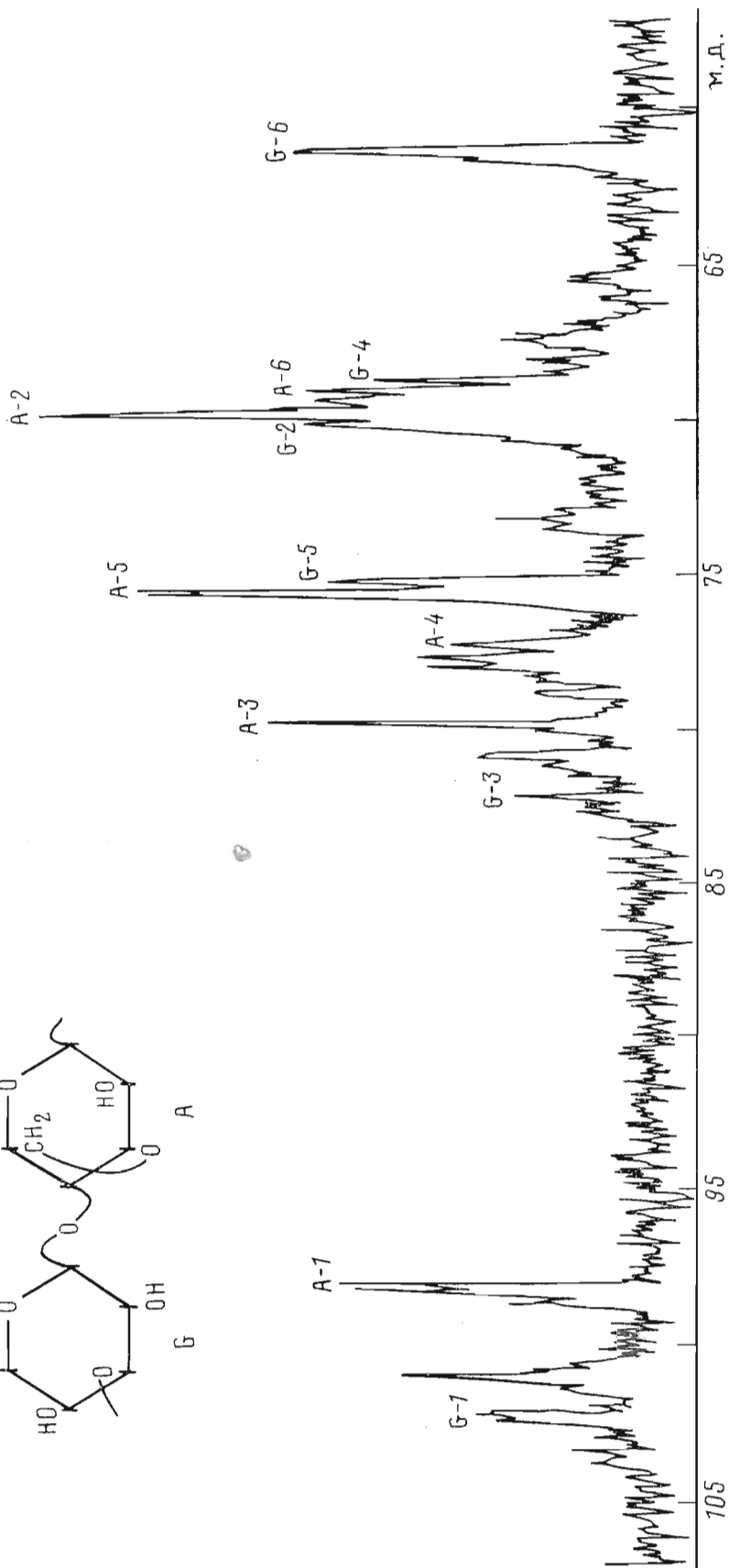
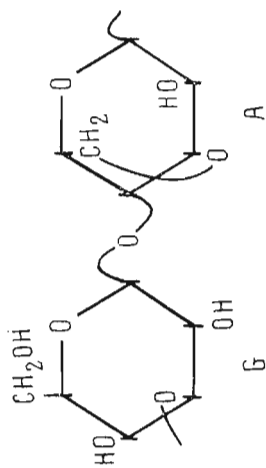


Рис. 2. Спектр ¹³С-ЯМР галактана из сублиторальной *L. pirronia*

агарозы. Так, обращает на себя внимание сложный вид аномальной области спектра полисахарида из сублиторальной *L. nipponica* (рис. 2). В этой области насчитывается не менее 8 сигналов, из которых пики при 102,4 и 102,6 м. д. относятся к остаткам *D*-галактозы в звеньях агаробиозы и 6-сульфата агаробиозы (последнему соответствуют также пики С-6 при 67,4 м. д. и С-5 при 73,2 м. д.) [15], а пики при 103,6 и 101,1 м. д. — к остаткам *D*- и *L*-галактозы соответственно в звеньях, не содержащих 3,6-ангидро-*L*-галактозы [16]. Сигнал при 98,9 м. д. принадлежит С-1 остатка 2-О-метил-3,6-ангидро-*L*-галактозы (ср. соответствующий сигнал метильной группы при 59,1 м. д.) [17]. Весьма интересен сигнал С-1 остатка 3,6-ангидро-*L*-галактозы, состоящий из двух пиков при 98,2 и 98,4 м. д., форму которого, как и природу других минорных сигналов аномальной области спектра, объяснить пока не удалось. В результате щелочной обработки этого галактана характер спектра существенно не меняется, хотя заметно улучшаются четкость и разрешение близких по химическим сдвигам сигналов (рис. 3). Сходные спектры, различающиеся лишь относительной интенсивностью отдельных пиков, имеют галактаны из литоральной *L. nipponica*, *L. obtusa*, *L. papillosa*.

Значительно более простые спектры получены для галактанов из обеих форм *L. coronopus* (рис. 4). Они соответствуют структуре агарозы, в которой большинство звеньев агаробиозы содержит в положении 6 заместитель — О-метильную или сульфатную группу, а в небольшой части повторяющихся звеньев остаток 3,6-ангидро-*L*-галактозы замещен остатком *L*-галактозы. Таким образом, эти полисахариды обнаруживают большое сходство с изученным ранее галактаном из *Polysiphonia morrowii* [15, 18].

Более детальное изучение строения сульфатированных галактанов из отдельных представителей рода *Laurencia* будет описано в следующих сообщениях.

Экспериментальная часть

Для качественного анализа моносахаридного состава 5—6 мг полисахарида в 2 мл 2 н. H_2SO_4 нагревали 6 ч при 100° С, нейтрализовали $BaCO_3$ и анализировали методом ВХ. Для количественного анализа перед нейтрализацией вносили известное количество инозита, переводили сахара в ацетаты полиолов [19] или ацетаты альдононитрилов [13] и анализировали методом ГЖХ.

ВХ выполняли нисходящим способом на бумаге Filtrak FN 11 или FN 15 в системе растворителей *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3; зоны восстанавливающих сахаров обнаруживали анилинфталатом. ГЖХ проводили на хроматографе Pye 104 с пламенно-ионизационным детектором на колонках 0,6 × 120 см с 3% ECNSS-M на газхроме Q при 180° С (для ацетатов полиолов) и с 3% OV-I на диатомите С при 180° С (для ацетатов альдононитрилов), скорость азота 50 мл/мин. Хромато-масс-спектрометрию выполняли на приборе Hitachi M-80 А (Япония) при ионизации электронным ударом, колонка с 2% OV-I на газхроме Q, скорость гелия 20 мл/мин.

Спектры ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц для 3% растворов полисахаридов в D_2O при 80° С; внутренний стандарт — диметилсульфоксид (39,5 м. д.).

Сульфат определяли после гидролиза полисахаридов турбидиметрическим методом Доджсона [20], 3,6-ангидрогалактозу — цветной реакцией с резорциновым реагентом [21], галактозу — по реакции с фенолом и серной кислотой [22] с поправкой на содержание 3,6-ангидрогалактозы.

Выделение полисахаридов. Литоральная форма *L. nipponica* собрана в сентябре 1975 г., а сублиторальная — в июне 1976 г. в зал. Посьета Японского моря. Черноморские виды собраны на Крымском побережье, в бухте Омега (*L. coronopus*, эпифит — в октябре 1979 г., литофит — в январе 1981 г., *L. papillosa* — в сентябре 1980 г.) и бухте Казачья (*L. obtusa*, неприкрепленная форма, — в июне 1980 г.). Водоросли высу-

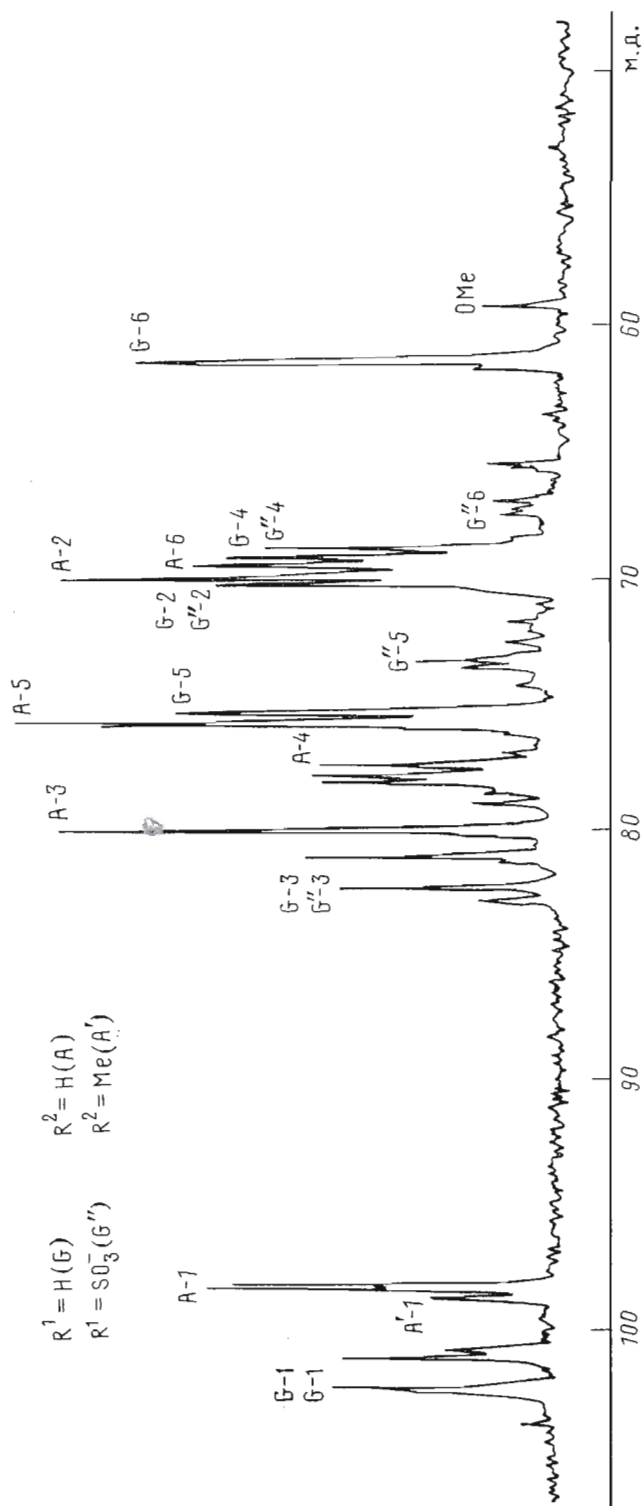
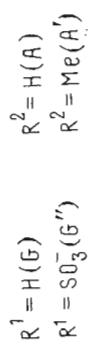
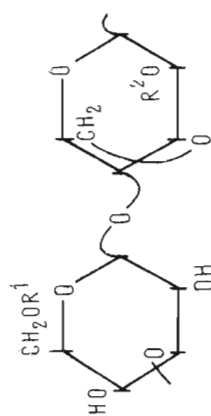
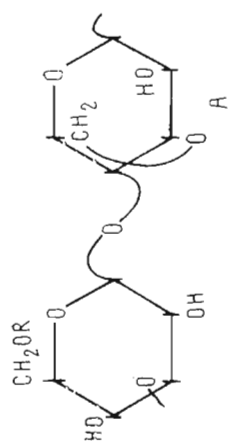


Рис. 3. Спектр ^{13}C -ЯМР галактана из сублигированной *L. mirrois*, модифицированного действием щелочи



$R = H (G) \quad R = Me (G') \quad R = SO_3^- (G'')$

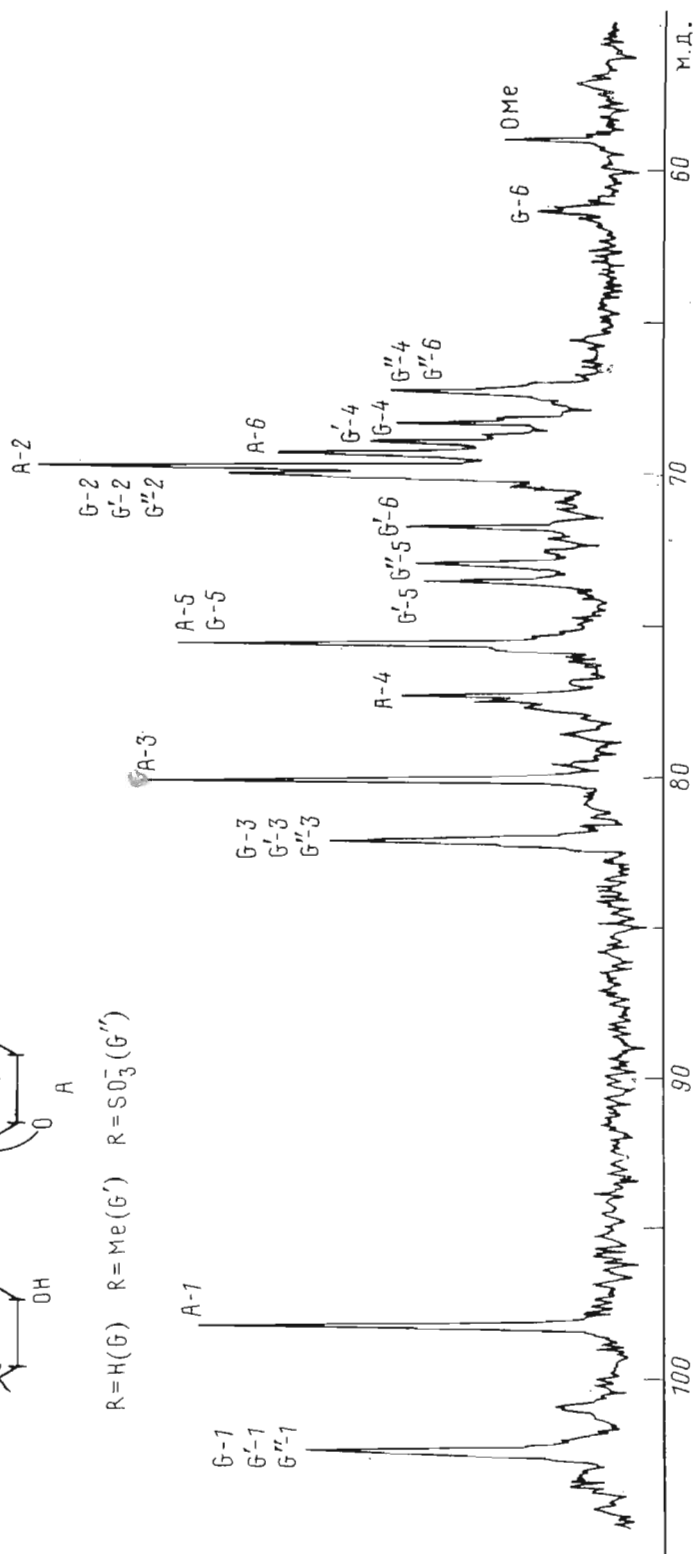


Рис. 4. Спектр ^{13}C -ЯМР галактана из *L. soganorus* (эпифита)

шивали на воздухе (образцы *L. nipponica* — после фиксации метанолом), измельчали, экстрагировали метанолом в аппарате Сокслета до получения бесцветных экстрактов и снова высушивали. Выходы в табл. 1 рассчитаны на полученный обезжиренный материал.

5 г обезжиренной водоросли и 200 мл воды перемешивали при нагревании на кипящей водяной бане 6 ч, горячую смесь центрифугировали, остаток водоросли еще 4 раза обрабатывали водой в тех же условиях, все экстракты объединяли и прибавляли 10% водный раствор бромиды цетилтриметиламмония до полного осаждения кислых полисахаридов. Осадки отделяли, промывали водой, растворяли в 200 мл 4 М NaCl при перемешивании и нагревании до 50—60° С, к полученным растворам прибавляли 3 объема этанола, выпавшие осадки отделяли, промывали этанолом, растворяли в воде, диализовали и лиофилизовали, получали фракции I кислых галактанов. Водные растворы после отделения цетавлоновых солей концентрировали в вакууме, диализовали и лиофилизовали, получали фракции II нейтральных полисахаридов. Остатки водорослей после экстракции промывали водой, ацетоном и высушивали в вакууме, получали фракции III. Выходы и моносахаридный состав фракций I—III см. в табл. 1.

Щелочная обработка полисахаридов. 1 г галактана I растворяли при нагревании в 200 мл воды, прибавляли 200 мг NaBH₄, оставляли на ночь, затем вносили 600 мг NaBH₄, приливали 100 мл 3 М NaOH, нагревали 6 ч при 80° С, после охлаждения осторожно нейтрализовали AcOH, диализовали и лиофилизовали, получали модифицированные галактаны с выходом 60—80% (см. табл. 2).

Ионообменная хроматография полисахаридов. Раствор 2 мг полисахарида в 200 мкл воды наносили на колонку (6 × 125 мм) DEAE-Nucleogen 4000-7 (Macherey-Nagel, ФРГ), которую промывали 20 мл воды и далее градиентом концентрации NaCl (50 мл воды + 50 мл 3 М NaCl) со скоростью 1 мл/мин. Фракции объемом 2 мл анализировали на содержание сахаров по реакции с фенолом и конц. H₂SO₄ [22] (см. рис. 1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Усов А. И., Чижов А. О. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 208—216.
2. Howard B. M., Fenical W. // Progress Phytochem. 1981. V. 7. P. 263—300.
3. Усов А. И. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 77—96.
4. Meeuse B. J. D., Andries M., Wood J. A. // J. Exp. Bot. 1960. V. 11. P. 129—140.
5. Bowker D. M., Turvey J. R. // J. Chem. Soc. C. 1968. № 8. P. 983—988.
6. Bowker D. M., Turvey J. R. // J. Chem. Soc. C. 1968. № 8. P. 989—992.
7. Hirase S., Watanabe K., Takano R., Tamura J. // XI Int. Carbohydr. Symp., Abstracts. 1982. Vancouver. P. III-12.
8. Mshigeni K. E., Nzalalila E. V. // Bot. Mar. 1977. V. 20. № 7. P. 443—447.
9. Diaz-Pijerrer M. // Marine Algae in Pharmaceutical Science / Eds Hoppe H. A., Levring T., Tanaka Y. Berlin: Walter de Gruyter, 1979. P. 149—164.
10. Усов А. И. // Журн. общ. химии. 1974. Т. 44. № 1. С. 191—196.
11. Перестенко Л. П. // Водоросли залива Петра Великого. Л.: Наука, 1980. С. 125—126.
12. Rees D. A. // J. Chem. Soc. 1961. № 12. P. 5168—5171.
13. Stortz C. A., Matulewicz M. C., Cerezo A. S. // Carbohydr. Res. 1982. V. 111. № 1. P. 31—39.
14. Усов А. И. // Bot. Mar. 1984. V. 27. № 5. P. 189—202.
15. Усов А. И., Иванова Е. Г., Шашков А. С. // Bot. Mar. 1983. V. 26. № 6. P. 285—294.
16. Lahaye M., Yaphe W., Rochas C. // Carbohydr. Res. 1985. V. 143. P. 240—245.
17. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 1. С. 74—81.
18. Усов А. И., Иванова Е. Г. // Bot. Mar. 1987. V. 30. № 5. P. 365—370.
19. Слонекер Дж. // Методы исследования углеводов // Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 22—25.
20. Dodgson K. S., Price R. G. // Biochem. J. 1962. V. 84. № 1. P. 106—110.
21. Yaphe W., Arsenault G. P. // Anal. Biochem. 1965. V. 13. P. 143—148.
22. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith. F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350—356.

Поступила в редакцию
28.II.1989

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. 41. CHARACTERIZATION
OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES FROM SEVERAL
REPRESENTATIVES OF THE GENUS *LAURENCIA*
(CERAMIALES, RHODOPHYTA)

USOV A. I., IVANOVA E. G., ELASHVILI M. Ya.

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

Sulfated galactans and mixtures of neutral water-soluble polysaccharides were isolated from six specimens of red seaweeds, belonging to four species of the genus *Laurencia*: littoral and sublittoral forms of *L. nipponica* from the Sea of Japan, as well as *L. coronopus* (epiphyte and lithophyte), *L. obtusa* and *L. papillosa* from the Black Sea. Homogeneity of galactans was characterized by anion-exchange chromatography. According to chemical analyses and ^{13}C NMR data, all the galactans belong to the agar group of polysaccharides. The substances from *L. coronopus* are built mainly of 6-O-methyl-agarobiose and agarobiose 6-sulfate residues. Other galactans contain agarobiose and agarobiose 6-sulfate residues, as well as corresponding disaccharide fragments with *L*-galactose instead of 3,6-anhydro-*L*-galactose residues, and several non-identified structural elements.