



УДК 547.458.7.02 + 582.273

© 1990 г.

А. И. Усов, Е. Г. Иванова

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРОСЛЕЙ

42*. СОСТАВ И СВОЙСТВА АГАРОВ ИЗ ЧЕРНОМОРСКИХ
КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *GRACILARIA VERRUCOSA* (HUDS.)
PARENF. f. *PROCERIMA* И *GRACILARIA DURA* (Ag.) J. Ag.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Гелеобразующие галактаны извлекали из водорослей *Gracilaria verrucosa* f. *procerima* и *G. dura* тремя способами: 1) горячей водой; 2) горячим фосфатным буфером, рН 5,15; 3) горячей водой после предварительной обработки водорослей 1 М NaOH при 100°С в течение 1 ч. Последняя методика дала наилучшие результаты с точки зрения выхода и гелеобразующих свойств полисахаридов. По данным химических анализов и спектров ¹³C-ЯМР, галактаны обеих водорослей относятся к группе агара и сходны между собой по составу и строению, но полисахарид из *G. dura* содержит существенно больше остатков 6-О-метил-D-галактозы и дает более прочный гель. По гелеобразующей способности оба полисахарида превосходят бакто-агар Дифко. Эти данные позволяют считать оба вида водорослей перспективными объектами для промышленного культивирования.

Красные морские водоросли рода *Gracilaria* являются главным источником агара в мировом промышленном производстве этого полисахарида [2]. Вероятно, именно их удастся в первую очередь ввести в марикультуру, чтобы обеспечить сырьем необходимое расширение производства агара в будущем. В многочисленных работах показано [3], что полезные физико-химические свойства образцов агара, определяемые их химическим составом и строением, существенно зависят от видовой принадлежности исходной водоросли, а для конкретного вида также от возраста, генерации и таких важнейших условий роста, как температура и соленость воды, освещенность, доступность питательных веществ и т. д. В наших предыдущих сообщениях [4, 5] мы охарактеризовали полисахаридный состав двух видов *Gracilaria*, собранных в Японском море. Настоящая работа посвящена сравнительному изучению агаров, содержащихся в двух черноморских представителях этого рода: *G. verrucosa* (Huds.) Parenf. f. *procerima* (I) и *G. dura* (Ag.) J. Ag. (II) **.

На выход и качество агара может влиять способ экстракции его из водоросли. Хотя стандартным методом экстракции служит обработка исходного материала горячей водой (при 100 или даже 120°С) [6], в ряде случаев извлечение агара оказывается неполным. Более успешной может быть обработка водорослей солевыми или буферными растворами при слабокислом рН [7], однако при этом необходимо учитывать возможность деструкции агара в кислой среде. Другим распространенным подходом [6] является предварительная щелочная обработка водорослей, которая наряду с облегчением процесса экстракции и удалением нежелательных примесей приводит к химической модификации агара (отщеплению сульфатных групп из остатков 6-сульфата L-галактозы с образованием звеньев 3,6-ангидро-L-галактозы), улучшающей гелеобразующие свойства. В соответствии с этим в данной работе сравнивались результаты трех способов экстракции: 1) горячей водой; 2) горячим фосфатным буфером, рН 5,15; 3) горячей водой после предварительной щелочной обработки водорослей.

* Сообщение 41 см. [1].

** Авторы выражают глубокую благодарность канд. биол. наук Р. А. Полищук (Институт биологии южных морей АН УССР) за предоставленные образцы водорослей.

Выход и состав полисахаридных фракций

Вид водоросли	Способ экстракции полисахарида *	Полисахаридная фракция **	Выход, %	Соотношение моносахаридов ***				
				Xyl	Man	Glc	Gal	Gal 6Me
<i>Gracilaria verrucosa</i> <i>f. procerima</i> (I)	1	A	28,2	0,01	0,01	0,01	1	0,13
		Б	0,8	0,11	0,01	0,06	1	0,11
		В	0,6	0,69	0,24	1	0,14	—
		Г	4,6	0,15	0,10	0,26	1	0,09
	2	Д	32,0	0,02	0,02	1	0,86	0,07
		A	33,7	0,04	—	0,08	1	0,15
		Б	0,7	0,18	0,03	0,13	1	0,03
		В	5,0	0,05	0,14	1	0,06	—
	3	Г	2,4	0,13	0,16	0,23	1	0,05
		Д	25,3	0,05	0,14	0,60	1	0,07
		A	40,3	0,01	—	0,08	1	0,10
		Б	3,3	0,04	0,01	0,05	1	0,02
<i>Gracilaria dura</i> (II)	1	В	1,0	0,09	0,07	1	0,19	0,01
		Г	7,3	0,01	—	1	0,02	—
		Д	17,5	—	0,13	1	0,18	—
		A	22,4	0,01	0,01	0,03	1	0,94
	2	Б	1,4	0,07	0,04	0,08	1	0,09
		В	0,4	0,55	1	0,80	0,78	0,17
		Г	3,0	0,08	0,08	0,18	1	0,45
		Д	25,4	0,06	0,09	0,57	1	0,35
	3	A	38,7	0,10	0,09	0,12	1	0,86
		Б	3,0	0,17	0,04	0,02	1	0,14
		В	3,3	0,75	0,42	1	0,19	0,07
		Г	5,3	0,17	0,14	1	0,54	0,20
3	Д	20,0	—	0,23	1	0,38	—	
	A	40,0	0,09	—	0,07	1	0,80	
	Б	3,7	0,03	—	0,04	1	0,27	
	В	0,5	0,90	0,62	0,48	1	0,44	
3	Г	2,0	0,04	0,03	1	0,81	0,01	
	Д	18,7	0,01	0,19	1	0,06	—	

* Экстракция горячей водой (1), горячим фосфатным буфером, рН 5,15 (2), горячей водой после предварительной щелочной обработки (3).

** А — агар, Б — негелеобразующий кислый полисахарид, В — нейтральные полисахариды, Г — растворимые в щелочи при комнатной температуре полисахариды, Д — остаток водоросли.

*** В продуктах гидролиза (2 и H_2SO_4 , 6 ч, 100°С) по данным ГРХ в виде ацетатов полностью.

Для выделения агара (фракция А) из экстрактов мы воспользовались стандартным приемом замораживания-оттаивания гелей [6]. Из маточных растворов после отделения агара с помощью осаждения бромистым цетилтриметиламмонием [8] выделяли кислые негелеобразующие полисахариды (фракция Б) и водорастворимые нейтральные полисахариды (фракция В). Водоросли после извлечения агара дополнительно обрабатывали 1 М NaOH при комнатной температуре и после нейтрализации экстрактов и диализа получали дополнительное количество водорастворимых полисахаридов (фракция Г). Остаток водоросли промывали водой и сушили сменой растворителей, получали фракцию Д.

Как видно из табл. 1, оба вида водорослей весьма сходны по содержанию и составу фракций, получаемых в результате экстракции. Гелеобразующие полисахариды являются главными продуктами: их выход достигает до 40% при обработке водорослей по способу 3. Выход сопутствующих фракций кислых галактанов во всех случаях по меньшей мере в 10 раз ниже. Выходы фракций В и Г также невелики, а их пестрый моносахаридный состав дает основание предположить, что эти фракции представляют собой смеси различных по своей природе полисахаридов, как, например, флоридного крахмала, ксилана и маннана клеточных стенок и низкосульфатированных галактанов [9]. Учитывая высокий

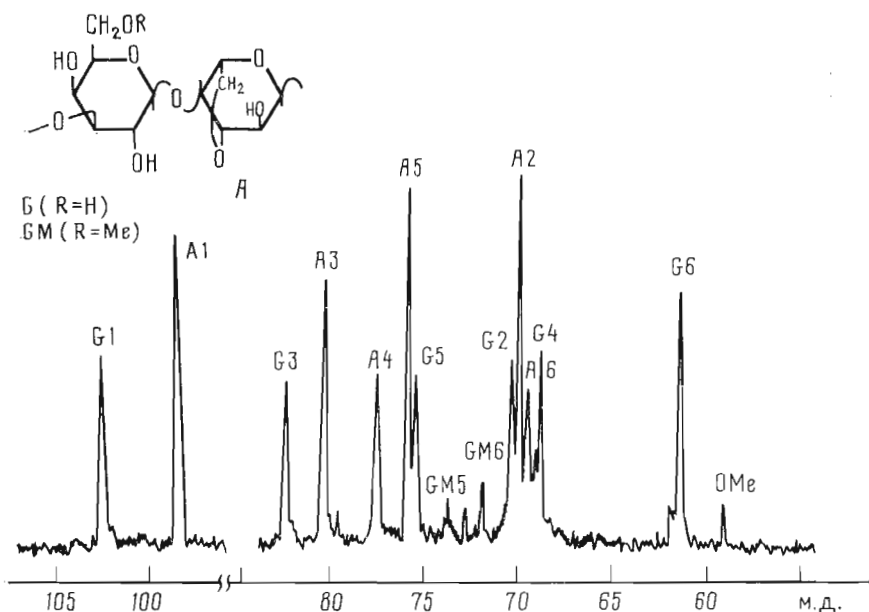


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР агара из *G. verrucosa* f. *procerima* (образец I-1)

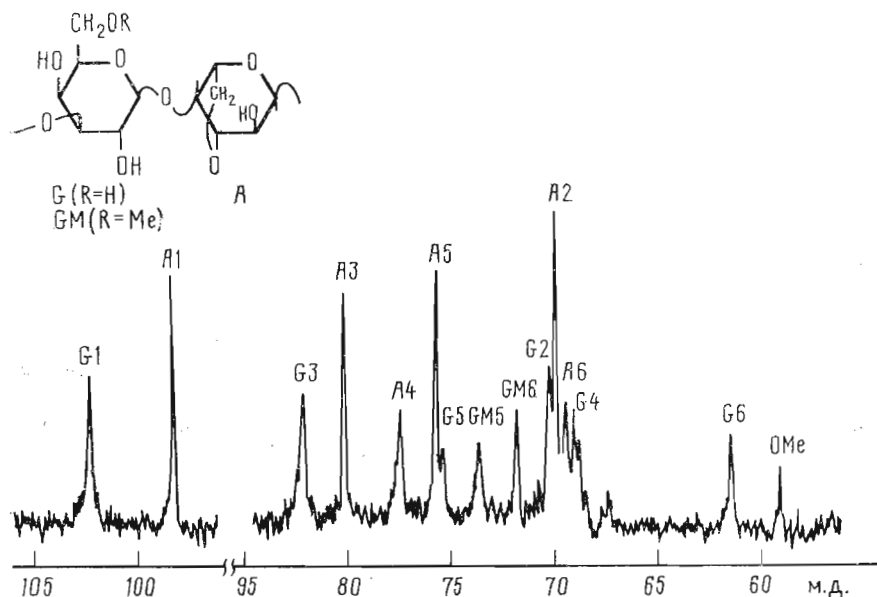


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР агара из *G. dura* (образец II-1)

выход и практическую ценность гелеобразующих фракций, мы более подробно исследовали их свойства и строение.

Принадлежность гелеобразующих полисахаридов фракции А к группе агара следует из их спектров ^{13}C -ЯМР [10, 11], которые содержат 12 характерных сигналов повторяющегося звена агаробиозы (3-О-замещенной 4-О- β -D-галактопиранозил-3,6-ангидро- α -L-галактопиранозы), а также несколько сигналов меньшей интенсивности, свидетельствующих о наличии в части D-галактозных остатков этих звеньев 6-О-метилгруппы (рис. 1, 2). Содержание 6-О-метил-D-галактозы в агаре из водоросли II существенно выше, чем в агаре из водоросли I. Спектральные данные хорошо совпадают с результатами моносахаридного анализа гелеобразующих фракций (табл. 2).

Для оценки прочности гелей мы использовали величину модуля сдвига, измеренного по модифицированной методике [12, 13]. Судя по величине

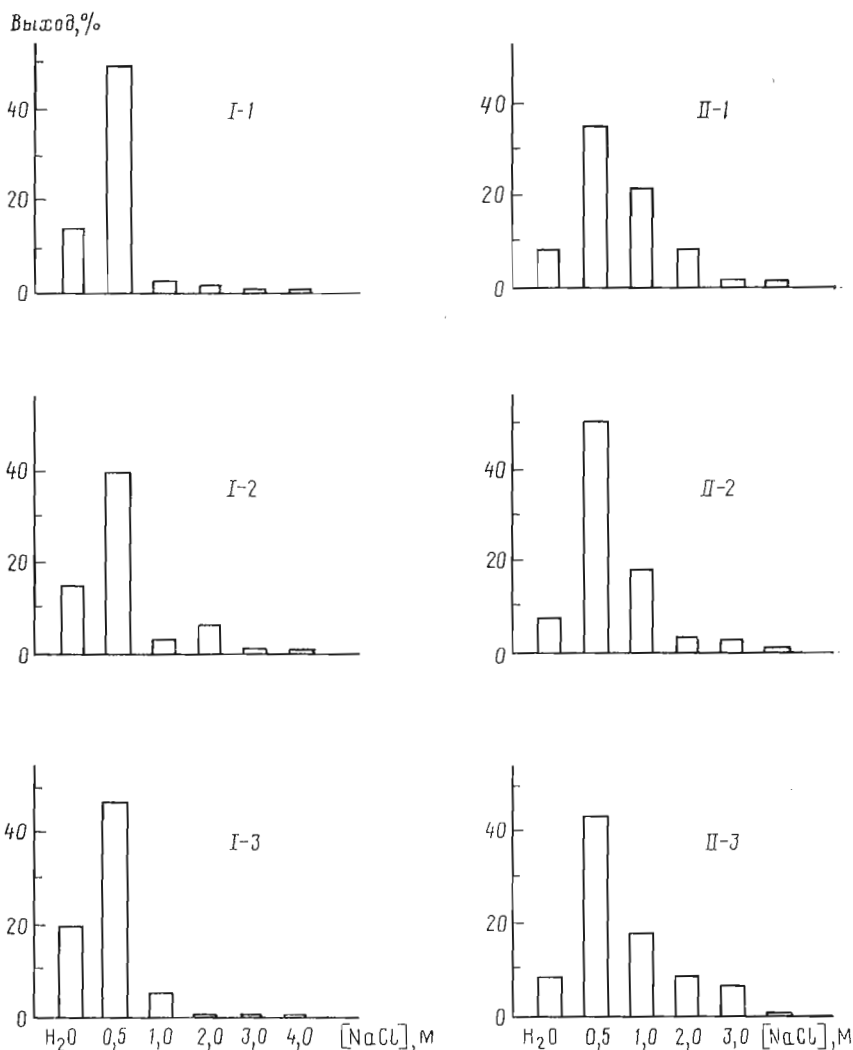


Рис. 3. Фракционирование агаров из *G. verrucosa f. procerima* (I) и *G. dura* (II), полученных по методикам 1—3 (см. «Экспер. часть»), на DEAE-сефадексе А-25 (Cl⁻-форма).

этого параметра, обе водоросли содержат агар высокого качества, превосходящий по прочности геля бакто-агар Дифко. Для извлечения агара из водорослей экстракция водой наименее эффективна. Использование фосфатного буфера приводит к увеличению выхода агара, однако одновременно несколько снижается прочность геля. Наилучшие результаты по выходу и прочности геля агара дает экстракция водой после предварительной щелочной обработки водорослей. Эта обработка в случае водоросли I приводит к снижению содержания в агаре сульфатных групп и соответствующему увеличению содержания 3,6-ангидро-*L*-галактозы. Для водоросли II также наблюдается снижение содержания сульфата в агаре в результате щелочной обработки, но количество 3,6-ангидро-*L*-галактозы при этом изменяется незначительно (табл. 2).

Фракционирование полученных препаратов агара на DEAE-сефадексе [6] показало, что способ экстракции мало влияет на содержание фракций с различной плотностью заряда. Несмотря на невысокую степень сульфатирования, нейтральная фракция (агароза) не является преобладающей и даже после щелочной обработки составляет всего около 20% в агаре I-3 и 10% в агаре II-3 (рис. 3). Главная фракция во всех шести образцах агара вымывается с DEAE-сефадекса 0,5 М NaCl и составляет 40—50% образца.

Характеристика агаров

Образец агара (Фракция А) *	Молярное соотношение Gal-3,6AnGal-SO ₃ Na	Выход агарозы, % **	Модуль сдвига для 1% геля, Па ***
I-1	1 : 0,75 : 0,10	14,5	2250
I-2	1 : 0,62 : 0,11	15,6	2000
I-3	1 : 0,81 : 0,04	19,9	2320
II-1	1 : 0,89 : 0,14	8,9	2700
II-2	1 : 0,79 : 0,16	7,8	2210
II-3	1 : 0,86 : 0,03	9,6	2630

* Римская цифра — вид водоросли, арабская — способ экстракции.

** По данным фракционирования на DEAE-сефадексе А-25 (Cl⁻).

*** Для сравнения модуль сдвига 1% геля бакто-агара Дифко равен 1735 Па.

Таким образом, черноморские красные водоросли *G. verrucosa* f. *proserima* и *G. dura* являются источниками высококачественного агара, выход которого после предварительной щелочной обработки водорослей достигает 40% от обезжиренной биомассы. С химической точки зрения полисахариды обоих видов водорослей весьма схожи, однако агар из *G. dura* отличается повышенным содержанием остатков 6-О-метил-D-галактозы и дает несколько более прочный гель. По гелеобразующей способности изученные препараты существенно превосходят полисахариды из дальневосточных видов *Gracilaria*, изученных нами ранее [4, 5]. Разработка способов культивирования черноморских представителей этого рода для промышленного получения агара представляет несомненный интерес.

Экспериментальная часть

Спектры ¹³C-ЯМР получали на приборе Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц для 1,5% растворов полисахаридов в D₂O при 80° С; внутренним стандартом служил диметилсульфоксид, 39,5 м. д. ГЖХ ацетатов полиолов выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890 А с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-1 и интегратором HP 3393 А. Общие приемы гидролиза полисахаридов, определение содержания галактозы, 3,6-ангидрогалактозы и сульфата описаны в работе [4]. Фракционирование агаров на DEAE-сефадексе проводили как описано в работах [5, 6].

Сбор и предварительная обработка водорослей. Водоросли собирали в феврале 1987 г. в окрестностях Севастополя, сортировали, заливали ацетоном и высушивали на воздухе. Затем измельчали, многократно экстрагировали смесью метанол — хлороформ — вода, 2 : 1 : 0,5 [14], и сушили в вакууме над P₂O₅.

Экстракция агара. Способ 1. 5,0 г обезжиренной биомассы заливали 300 мл воды и перемешивали 6 ч при нагревании на кипящей водяной бане. Горячую смесь центрифугировали, остаток водоросли экстрагировали еще 5 раз в тех же условиях. Водные экстракты оставляли на ночь для созревания геля, затем замораживали и оттаивали. Объединенный гель расплавляли в 0,5 л воды, охлаждали и снова замораживали и оттаивали; такую очистку геля проводили 3 раза. Очищенный гель лиофилизовали, получали фракцию А.

Способ 2. 3,0 г обезжиренной биомассы заливали 300 мл 2,5 мМ раствора NaH₂PO₄ (рН 5,15) и проводили экстракцию и очистку геля по способу 1.

Способ 3. 3,0 г обезжиренной биомассы заливали 300 мл 1 М NaOH, нагревали 1 ч на кипящей водяной бане, после охлаждения смесь нейтрализовали уксусной кислотой и водоросли тщательно промывали водой. К влажному осадку приливали 200 мл воды и проводили экстракцию по способу 1.

Выделение других полисахаридных фракций. Маточные растворы после выделения гелей из экстрактов объединяли с растворами, полученными в результате первой промывки гелей, и прибавляли 10% водный раствор бромида цетилтриметиламмония до полного осаждения кислых полисахаридов. Осадок цетавлоновых солей отделяли центрифугированием, промывали водой, растворяли в 4 М NaCl и осаждали Na-соли кислых полисахаридов, прибавляя 3 объема этанола. Осадок отделяли, растворяли в воде, раствор диализовали и лиофилизовали, получали фракцию Б кислых негелеобразующих полисахаридов. Маточный раствор, полученный после отделения цетавлоновых солей, диализовали и лиофилизовали, получали фракцию В нейтральных полисахаридов. Остаток водоросли после экстракции агара заливали 250 мл 1 М NaOH, выдерживали 3 сут при 20° С, затем нейтрализовали уксусной кислотой, осадок отделяли центрифугированием, раствор диализовали и лиофилизовали, получали фракцию Г полисахаридов, извлеченных щелочью при комнатной температуре. Остаток водорослей промывали водой, ацетоном и высушивали, получали фракцию Д. Выходы и моносахаридный состав фракций приведены в табл. 1.

Определение модуля сдвига гелей. Механические свойства 1% гелей агаров определяли на модифицированных динамометрических весах типа АДВ-200 методом пенетрации полусферического индентора радиусом 3,5 мм в режиме ползучести (1 мин, 20° С, ступенчатая нагрузка образца по 1,0 г). Расчет модуля сдвига проводили по формуле

$$\underline{G}_{(t=1)} = \frac{1}{kR^{0.5}} \cdot \frac{P}{h_{(t=1)}^{1.5}} \cdot 98,04,$$

где G — модуль сдвига, Па; k — постоянная, равная 10,14 [13]; R — радиус индентора, см; P — нагрузка на образец, г; h — глубина пенетрации, см.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Усов А. И., Иванова Е. Г., Элашвили М. Я. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1259—1267.
2. McLachlan J. // Plant and Soil. 1985. V. 89. P. 137—157.
3. Yaphé W. // Hydrobiologia. 1984. V. 116/117. P. 171—186.
4. Усов А. И., Иванова Е. Г., Макиенко В. Ф. // Биоорганич. химия. 1979. Т. 5. № 11. С. 1647—1653.
5. Усов А. И., Иванова Е. Г., Пржеменецкая В. Ф. // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1119—1124.
6. Craigie J. S., Leigh C. // Handbook of phycological methods. Physiological and biochemical methods. / Eds Hellebust J. A., Craigie J. S. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978. P. 109—131.
7. Miller I. J., Cape C. // New Zealand J. Sci. 1979. V. 22. № 3. P. 253—255.
8. Скотт Дж. Е. // Методы химии углеводов / Пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967. С. 288—293.
9. Усов А. И. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 77—96.
10. Usov A. I. // Bot. Mar. 1984. V. 27. № 5. P. 189—202.
11. Lahaye M., Yaphé W., Phan Viet M. T., Rochas C. // Carbohydr. Res. 1989. V. 190. № 2. P. 249—265.
12. Слонимский Г. Л., Алексеев В. Ф., Гринберг В. Я., Изюмов Д. В., Толстогозов В. Б. // Высокомолекул. соед. 1969. Т. 11. № 2. С. 460—463.
13. Bikbov T. M., Grinberg V. Y., Tolstoguzov V. B. // Nahrung. 1979. V. 23. № 4. P. 403—408.
14. Whyte J. N. S., Southcott B. A. // Phytochemistry. 1970. V. 9. № 5. P. 1159—1161.

Поступила в редакцию
15.XI.1989

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. 42. COMPOSITION AND PROPERTIES OF AGARS FROM THE BLACK SEA RED SEaweEDS *GRACILARIA VERRUCOSA* (HUDS.) PAPENF. F. *PRO CERIMA* AND *GRACILARIA DURA* (Ag.) J. Ag.

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

Gel-forming galactans were isolated from *Gracilaria verrucosa* f. *procerima* (and *G. dura* by three different procedures: 1) hot water extraction, 2) hot phosphate buffer pH 5,15 extraction, 3) hot water extraction after alkaline treatment with 1 M NaOH at 100° C for 1 h. The third procedure gave the best results in terms of the yield and gel-forming properties of the polysaccharides. According to chemical analyses and ¹³C-NMR spectral data, the galactans of both algae belong to the agar group and are similar in the composition and structure, but the polysaccharide of *G. dura* contains more 6-O-methyl-D-galactose residues and gives gel of a higher strength. The gel-forming properties of both polysaccharides exceed those of Difco bacto-agar. Based on the data obtained, both seaweeds may be considered as species of interest for mariculture.