



УДК 582.272-119.2.2:577.114.083

© 1994 А. И. Усов, Н. Г. Клочкова*

БУРЫЕ ВОДОРОСЛИ КАМЧАТКИ КАК ИСТОЧНИК МАННИТА

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва;
* Камчатский институт экологии и природопользования ДВО РАН,
Петропавловск-Камчатский

Ключевые слова: бурые водоросли, маннит.

Проведено количественное определение содержания маннита в 17 видах бурых водорослей, собранных в июле 1990 г. на побережье п-ова Камчатка. Показано, что большие количества маннита (порядка 20% от сухого веса биомассы) характерны для представителей родов *Laminaria*, *Alaria* и *Arthrothamnus*. Водоросль *Arthrothamnus bifidus* наряду с 26% D-маннита содержит 24% альгиновой кислоты, состоящей из остатков D-маннуриновой и L-гулуриновой кислот в соотношении 2,5:1, и может служить перспективным источником для получения как маннита, так и альгиновой кислоты.

Шестиуглеродный шестиатомный спирт D-маннит является одним из первичных продуктов фотосинтеза и резервным веществом у бурых водорослей. Его содержание в растениях определяется видом водоросли, сезоном и условиями произрастания. Наиболее богатыми источниками D-маннита считаются представители рода *Laminaria*; в период максимальной фотосинтетической активности они могут накапливать маннит в количестве до 26% от сухого веса биомассы [1]. Маннит находит разнообразное техническое и медицинское применение и производится во многих странах, включая Российскую Федерацию [2]; его получение из бурых водорослей обходится в несколько раз дешевле химического синтеза [3]. Прибрежные воды Камчатки могли бы служить практически неисчерпаемым источником бурых водорослей для промышленной переработки, но, к сожалению, в настоящее время эти ресурсы не используются и с химической точки зрения изучены недостаточно. Целью данной работы является оценка 17 видов камчатских бурых водорослей как потенциального сырья для получения маннита.

Образцы водорослей были собраны в июле 1990 г. в Авачинской губе в окрестностях г. Петропавловска-Камчатского. Виды *Laminaria*, а также *Arthrothamnus bifidus* перед сушкой разделяли на пластины и черешки, *Alaria fistulosa* — на пластины и центральную жилку, а *Alaria marginata* — на пластины, жилку,

Почтовый адрес: 117913, Москва ГСП-1, Ленинский проспект, 47, Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Усов А. И.

**Содержание маннита в биомассе бурых водорослей Камчатки
(% от сухого веса)**

Номер образца	Вид водоросли	Часть растения	Содержание маннита
1	Класс Phaeosporophyceae Порядок Ectocarpales Сем. Ectocarpaceae <i>Pylayella littoralis</i> (L.) Kjellm.	Целые растения	1,4
2	Порядок Chordariales Сем. Chordariaceae <i>Chordaria flagelliformis</i> (Mull.) Ag.	То же	1,1
3	<i>C. gracilis</i> Setch. et Gardn.	»	1,0
4	<i>Saundersella simplex</i> (Saund.) Kylin	»	0,05
5	Порядок Dictyosiphonales Сем. Dictyosiphonaceae <i>Dictyosiphon foeniculaceus</i> (Huds.) Grev.	»	1,2
6	Порядок Scytosiphonales Сем. Scytosiphonaceae <i>Petalonia fascia</i> (Mull.) Kuntze	»	1,6
7	<i>Scytosiphon lomentaria</i> (Lyngb.) J. Ag.	»	0,7
8	Порядок Desmarestiales Сем. Desmarestiaceae <i>Desmarestia intermedia</i> P. et R.	»	6,2
9	Порядок Laminariales Сем. Laminariaceae <i>Laminaria bongardiana</i> P. et R.	Пластины	13,1
10	То же	Черешки	7,5
11	<i>L. longipes</i> Bory	Пластины	22,3
12	То же	Черешки	9,1
13	<i>L. dentigera</i> Kjellm.	Пластины	21,7
14	То же	Черешки	7,2
15	<i>Agarum cribrorum</i> Bory	Целые растения	6,9
16	<i>Thalassiosphyllum clathrus</i> (Gmel.) P. et R.	То же	2,0
17	Сем. Arthrothamnaceae <i>Arthrothamnus bifidus</i> P. et R.	Пластины	26,1
18	То же	Черешки	13,2
19	Сем. Alariaceae <i>Alaria marginata</i> P. et R.	Пластины	8,8
20	То же	Спорофиллы	4,6
21	»	Жилка	17,8
22	»	Черешки	13,7
23	<i>A. fistulosa</i> P. et R.	Пластины	15,9
24	То же	Жилка	17,4
25	Класс Cyclosporophyceae Порядок Fucates Сем. Fucaceae <i>Fucus evanescens</i> Ag.	Целые растения	7,7

спорофиллы и черешки; прочие водоросли высушивали целиком. В результате для анализа на содержание маннита были приготовлены 25 образцов биомассы, перечисленные в таблице.

Для определения содержания маннита в биомассе водорослей известно несколько приемов. Методики, основанные на образовании медных комплексов [4]

и на периодатном окислении [5], хотя и используются для оценки качества сырья при промышленном получении маннита, не свободны от недостатков, главным из которых является их неспецифичность. Следует иметь в виду, что некоторые бурые водоросли содержат другие полиолы (волемит [6], альтрит [7]) и углеводы, которые могут исказить результаты, полученные этими методами. Определение *D*-маннита с помощью маннитдегидрогеназы [8] специфично, но требует приготовления необходимого фермента. Наиболее удобны и надежны хроматографические методы анализа маннита, причем для этой цели можно использовать как ВЭЖХ [9], так и ГЖХ после необходимой в этом последнем случае дериватизации образца [10]. В настоящей работе для количественного определения маннита был использован метод ГЖХ в виде ацетатов с *мио*-инозитом в качестве внутреннего стандарта.

Весьма привлекательно совмещение анализа маннита с определением моносахаридного состава легкогидролизуемых полисахаридов биомассы водорослей. Для этой цели можно проводить кислотный гидролиз биомассы, а в качестве летучих производных моносахаридов вместо широко применяемых ацетатов полиолов использовать ацетаты альдононитрилов [11], позволяющие отличить маннозу от маннита. Однако два фактора влияют на результат определения свободного маннита. Во-первых, при кислотном гидролизе освобождается маннит, который присутствует в биомассе в составе гликозидов [12] или входит в состав ламинарана [13]. Во-вторых, нами в предварительных опытах было показано, что при превращении фукозы (главного компонента фукоиданов, сложных сульфатированных полисахаридов бурых водорослей) в соответствующий ацелированный альдононитрил побочно образуется неидентифицированное вещество, площадь пика которого на хроматограмме составляет около 20% от площади пика ацетата фукононитрила, а хроматографическая подвижность является промежуточной между ацетатом инозита (внутренний стандарт) и ацетатом маннита (обычно главный компонент анализируемой смеси). Неполное разделение трех перечисленных веществ в примененных нами условиях ГЖХ приводит к искажению результатов определения маннита, которое тем сильнее, чем выше содержание фукоидана в исходной биомассе. Тем не менее мы провели кислотный гидролиз всех образцов, в результате чего были получены ориентировочные сведения о содержании маннита и о составе присутствующих в биомассе легкогидролизуемых полисахаридов (анализ полисахаридного состава этих водорослей будет предметом отдельного сообщения).

Для более точного определения маннита мы воспользовались предварительной экстракцией биомассы разбавленной кислотой (ср. [10]) с последующим ацелированием и количественной ГЖХ. В качестве экстрагента использовали 2 М трифторуксусную кислоту с заранее растворенным в ней *мио*-инозитом, выполняющим роль внутреннего стандарта. Выбранный режим экстракции обеспечивал максимальный выход маннита из всех исследованных образцов. Экстракты упаривали досуха, полученные вещества ацелировали в обычных условиях и продукты реакции освобождали от окрашенных, полярных и нелетучих примесей кратковременной обработкой силикагелем в хлороформе (ср. [14]). Результаты анализа (среднее из двух определений) приведены в таблице.

Оценивая данные этой таблицы, следует в первую очередь обратить внимание на ярко выраженную зависимость содержания маннита от вида водоросли, причем диапазон изменений этой величины весьма широк — от следовых количеств до 26%. Наименьшее содержание маннита отмечено в водоросли *Saundersella simplex* (образец 4), где для его надежного определения пришлось даже работать с увеличенными навесками биомассы. Высокие значения (13—26%), как и следовало ожидать, найдены для представителей порядка ламинариевых, хотя и среди них встречаются виды с умеренным (образец 15) и даже низким (образец 16) содержанием маннита. Наибольшее содержание маннита обнаружено в пластинах водоросли *Arthrothamnus bifidus* (образец 17); *D*-маннит из этого образца был выделен и идентифицирован в виде гексаацетата.

Другое интересное наблюдение — различия в содержании маннита в разных органах растений. В представителях родов *Laminaria* и *Arthrothamnus* пластины, где в основном происходит фотосинтез, в 2—3 раза богаче маннитом по сравнению с черешками. В представителях *Alaria* маннит, очевидно, концентрируется в проводящей системе, в результате чего наибольшее содержание его отмечено в центральной жилке; наименее богатой маннитом оказалась ткань спорофиллов (образцы 19—24).

По нашим данным, камчатские виды *Laminaria* (образцы 9, 11, 13) несколько не уступают другим дальневосточным видам этого рода, обычно рекомендуемым в качестве сырья для производства маннита [15]. Что же касается наиболее богатого маннитом вида *Arthrothamnus bifidus*, то мы не нашли в литературе сведений о содержании маннита в биомассе этой водоросли. Для близкородственного вида *A. kurilensis* приводятся умеренные значения 6—12% [15]. Отсутствует в литературе и характеристика содержащейся в *A. bifidus* альгиновой кислоты. Учитывая, что в процессе комплексной переработки биомассы должно быть предусмотрено получение из водоросли как альгината, так и маннита, мы провели препаративное выделение альгината натрия из образца 17 по методике, сходной с использованной нами ранее [16], и показали, что содержание этого полисахарида в биомассе водоросли составляет 24%. По данным спектра ^{13}C -ЯМР, соотношение *D*-маннуровой и *L*-гулуровой кислот в нем равно 2,5 : 1, и по этому параметру водоросль *A. bifidus* как источник альгината напоминает такой широко используемый в промышленности вид, как *Macrocystis pyrifera* [17].

Таким образом, камчатские бурые водоросли *A. bifidus*, *L. longipes*, *L. dentigera* и в несколько меньшей степени *A. fistulosa*, *A. marginata* и *L. bongardiana* можно рассматривать как перспективный сырьевой источник *D*-маннита. Для окончательной рекомендации необходимо изучение сезонных изменений содержания маннита в биомассе этих водорослей, что будет предметом наших дальнейших исследований.

Экспериментальная часть

Водоросли, собранные в июле 1990 г. в окрестностях Петропавловска-Камчатского, высушивали вначале на воздухе, затем в вакууме над P_2O_5 до постоянного веса и измельчали до размера частиц, не превышающего 0,1 мм.

ГЖХ проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5890А с пламенно-ионизационным детектором и интегратором 3393А с использованием капиллярной колонки Ultra-1 (25 м×0,2 мм, слой поперечно сшитого метилсиликона толщиной 0,33 мкм) в токе азота при градиенте температуры от 175 до 290° С со скоростью 10°/мин.

Спектр ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 для 2% раствора альгината натрия в D_2O , содержащей 1% этилендиаминтетраацетата натрия, при 80° С в условиях полного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами (ср. [16]).

Определение маннита. К точной навеске сухой измельченной биомассы водоросли (10—50 мг в зависимости от ожидаемого содержания маннита) приливали 1,0 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей мио-инозит в концентрации 0,9 мг/мл. После перемешивания в течение 16 ч приливали 10 мл этанола, перемешивали еще 2 ч, фильтровали, фильтрат упаривали в вакууме и из остатка удаляли следы кислоты упариванием с этанолом (3×10 мл). Остаток после упаривания оставляли на ночь в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 , затем прибавляли по 1 мл абсолютного пиридина и уксусного ангидрида, нагревали 1 ч при 100° С, после охлаждения упаривали в вакууме с толуолом (3×10 мл), к остатку прибавляли около 1 г силикагеля L (100—160 мкм, Chemapol) и 3 мл хлороформа, энергично перемешивали, фильтровали, колбу и осадок на фильтре промывали хлороформом (2×3 мл), объединенные фильтраты упаривали, остаток растворяли в 1 мл хлороформа и использовали для ГЖХ. В расчете содержания

маннита исходили из площадей пиков ацетатов маннита и инозита, определенных с помощью интегратора, и калибровочного графика для известных количеств маннита, обработанных по приведенной методике.

Препаративное выделение D-маннита и альгината натрия из пластин A. bifidus. 1,0 г биомассы (образец 17, таблица) перемешивали 6 ч с 50 мл 0,1 М HCl при комнатной температуре и оставляли на ночь. Затем приливали 200 мл этанола, перемешивали еще 6 ч, центрифугировали, полученный раствор упаривали досуха, остаток высушивали в вакууме над КОН, приливали 12,5 мл абсолютного пиридина и 12,5 мл уксусного ангидрида, нагревали 1 ч при 100° С, после чего упаривали толуолом (3×50 мл), остаток растворяли в нескольких миллилитрах хлороформа и хроматографировали на небольшой (18×2,5 см) колонке с силикагелем L (40—100 мкм, Chemapol) при промывании хлороформом. Фракции, содержащие ацетат маннита (по данным ГЖХ), объединяли, упаривали и остаток трижды перекристаллизовывали из метанола. Получали гексаацетат D-маннита с выходом 0,44 г, т. пл. 122° С, $[\alpha]_D^{20} +24^\circ$ (с 1; CHCl₃); данные [18]: т. пл. 122° С, $[\alpha]_D +24,4^\circ$ (CHCl₃).

Остаток водоросли после извлечения маннита перемешивали еще с двумя порциями по 50 мл 0,1 М HCl по 7—8 ч при комнатной температуре, после чего центрифугировали и к осадку приливали 100 мл 2% раствора Na₂CO₃. Суспензию перемешивали 5 ч при комнатной температуре, раствор отделяли центрифугированием, а осадок еще дважды обрабатывали порциями по 50 мл раствора Na₂CO₃ (последний раз при 50° С). К объединенным содовым экстрактам приливали 7,5 мл конц. HCl, оставляли на ночь, выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали 100 мл 0,1 М HCl, растворяли при осторожном прибавлении NaOH в 100 мл воды, слабощелочной раствор диализовали и лиофилизовали, получали альгинат Na (выход 0,24 г). Препарат практически не окрашен и имеет спектр ¹³C-ЯМР, типичный для альгинатов; расчет моносахаридного состава по этому спектру [16, 19] дал для соотношения D-маннуровой и L-гулуруновой кислот величину 2,5 : 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chapman V. J., Chapman D. J. Seaweeds and their Uses. L.—N. Y.: Chapman and Hall, 1980. P. 229—232.
2. Кизеветтер И. Д., Грюнер В. С., Евтушенко В. А. Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений. М.: Пищевая пром-сть, 1967. С. 343—348.
3. Durrant N. W.//Comp. Fish Rev. 1967. V. 29. № 5. P. 65—68.
4. Ссылка [2]. С. 284—286.
5. Larsen B.//Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods. Cambridge: Cambridge University Press, 1978. P. 181—188.
6. Kremer B. P.//Z. Pflanzenphysiol. 1977. В. 81. № 1. S. 68—73.
7. Wright P. J., Clayton M. N., Chudek J. A., Foster R., Reed R. H.//Phycologia. 1987. V. 26. № 4. P. 429—434.
8. Horikoshi K.//Meth. Enzym. Anal. 1984. V. 6. P. 271—275.
9. Kerby N. W., Reed R. H., Rowell P.//J. Chromatogr. 1989. V. 479. № 2. P. 353—360.
10. Rosell K.-G., Srivastava L. M.//Can. J. Bot. 1984. V. 62. № 11. P. 2229—2236.
11. Morrison I. M.//J. Chromatogr. 1975. V. 108. № 2. P. 361—364.
12. Усов А. И., Чижов А. О.//Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 2. С. 208—216.
13. Percival E., McDowell R. H.//Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. L.: Acad. Press, 1967. 219 P.
14. Усов А. И., Клоchkova N. G.//Bot. Mar. 1992. V. 35. № 5. P. 371—378.
15. Кизеветтер И. В., Суховеева М. В., Шмелькова Л. П.//Промысловые морские водоросли и травы дальневосточных морей. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. С. 41—42.
16. Усов А. И., Кошелева Е. А., Яковлев А. П.//Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 830—836.

17. McKee J. W. A., Kavalieris L., Brasch D. J., Brown M. T., Melton L. D.//J. Appl. Phycol. 1992. V. 4. № 4. P. 357—369.
18. Pacsu E., Rich F. V.//J. Amer. Chem. Soc. 1933. V. 55. № 7. P. 3018—3024.
19. Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O.//Carbohydr. Res. 1981. V. 89. № 2. P. 179—191.

Поступила в редакцию
10.XII.1993

A. I. Usov, N. G. Klochkova*

BROWN ALGAE FROM KAMCHATKA AS A SOURCE OF MANNITOL

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;
* Kamchatka Institute of Ecology and Environment, Far East Division, Russian Academy of Sciences, Petropavlovsk-Kamchatsky

Key words: brown algae, mannitol.

Quantitative determination of the mannitol content in 17 species of brown seaweeds collected in July 1990 on Kamchatka coast has been carried out. High levels of mannitol (about 20% of dry biomass) were shown to be characteristic for representatives of the genera *Laminaria*, *Alaria*, and *Arthrothamnus*. The alga *Arthrothamnus bifidus* was shown to contain, together with 26% *D*-mannitol, also 24% alginate composed of *D*-mannuronic and *L*-guluronic acid residues at a ratio of 2,5 : 1. This species may be regarded as a new promising source for the production of both alginic acid and mannitol.