



УДК 547.458.7.02+582.273

© 1992 г. А. И. Усов, Е. Г. Иванова

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ
46*. ИЗУЧЕНИЕ АГАРА ИЗ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ
GELIDIELLA ACEROSA

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

Показано, что красная водоросль *Gelidiella acerosa* содержит агар, выход которого превышает 40% от сухой биомассы и практически не зависит от способа экстракции (горячей водой, горячим фосфатным буфером, pH 5,15, или горячей водой после предварительной обработки водоросли 1 М NaOH). По данным анализа химического состава и спектроскопии ^{13}C -ЯМР, отличительными особенностями агара являются низкая степень сульфатирования, практическое отсутствие звеньев типа порфирана (соотношение производных 3,6-ангидро-*L*-галактозы и *D*-галактозы 0,93 : 1) и высокое содержание метилированных сахаров (соотношение 6-О-метил-*D*-галактозы и *D*-галактозы ~1 : 1, а 2-О-метил-3,6-ангидро-*L*-галактозы и 3,6-ангидро-*L*-галактозы ~1 : 2). При фракционной экстракции биомассы с незначительным выходом получены фракции агара с еще более высокой степенью метилирования. При частичном восстановительном гидролизе биомассы водоросли получены восстановленные дисахаридные фрагменты молекул агара — агаробии и его 2-О-метил-, 6'-О-метил- и 2,6'-ди-О-метилпроизводные, строение которых подтверждено методом ГЖХ-МС их ацетатов.

Красная водоросль *Gelidiella acerosa* (Forssk.) Feld. et Hamel широко распространена в тропических водах Мирового океана и предложена в качестве сырья для получения агара в Индии [2, 3], на Тайване [4] и во Вьетнаме [5]. Агар, извлекаемый из этой водоросли, дает высокоплавкий гель, поэтому для его экстракции применяют обработку водорослей водой при повышенных температуре и давлении. Высокая точка плавления геля может объясняться большим количеством остатков 6-О-метил-*D*-галактозы в составе полисахарида [6]. Действительно, повышенное содержание метилированных сахаров было отмечено нами при анализе агара, выделенного из образца *G. acerosa* с о. Куба [7, 8]. Целью данной работы было исследование состава и свойств агара из партии *G. acerosa*, собранной у берегов Филиппинских островов весной 1990 г. и предназначенной для промышленной переработки. Для характеристики полисахарида мы использовали три подхода: 1) предложенный недавно восстановительный гидролиз биомассы как способ обнаружения и определения состава агара без его выделения из водоросли [9]; 2) сравнение нескольких способов экстракции для выбора наилучшего пути получения суммарного препарата агара [10]; 3) фракционную экстракцию водоросли [11] как возможный способ разделения высокосульфатированных и высокометилированных фракций полисахарида.

Ориентировочные сведения о полисахаридном составе водоросли были получены при полном восстановительном гидролизе биомассы с последующим количественным анализом компонентов гидролизата методом ГЖХ [9]. Этим методом было установлено, что в биомассе содержится 0,9% ксилозы, 7,1% 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы, 13,6% 6-О-метилгалакто-

* Сообщение 45 см. [1].

Таблица 1

Масс-спектры ацетатов агаробинита (IV) и его метиловых эфиров (I-III)

m/z	Интенсивность, % от максимального пика			
	I	II	III	IV
561	—	—	—	0,5 ($M-59$)
560	—	—	—	1,2 ($M-60$)
547	—	1,4 ($M-45$)	—	—
533	—	—	1,3 ($M-59$)	—
501	—	—	—	1,3 ($M-59-60$)
475	—	—	2,8	16
447	2	5	—	—
427	—	5,5 ($M-45-60-60$)	—	—
417	0,1 ($M-45-60-42$)	—	—	—
399	0,5 ($M-45-60-60$)	—	—	—
385	—	1,2 ($M-45-60-102$)	—	—
361	—	2,6	—	3,5
333	1	—	—	—
331	—	—	10	20
319	—	5,3	—	6
303	6	18	—	—
291	1	—	5	—
289	—	—	—	1
273	—	41	—	85
259	—	45	6	70
245	11	—	20	—
243	—	—	—	20
242	—	—	—	14
217	—	—	—	3
215	—	15	—	—
212	—	12	4	35
200	—	—	—	15
183	5	13	—	—
171	5	—	—	—
170	—	18	—	—
169	—	—	47	100
153	—	32	—	68
145	—	—	10	—
141	40	80	15	28
129	—	22	—	—
127	—	—	—	36
117	92	—	100	—
111	—	29	—	50
109	—	—	30	58
98	—	13	13	35
87	8	17	—	—
81	—	—	25	66
69	15	33	36	70
58	6	—	24	—
43	100	100	82	80

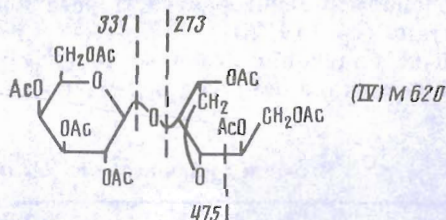
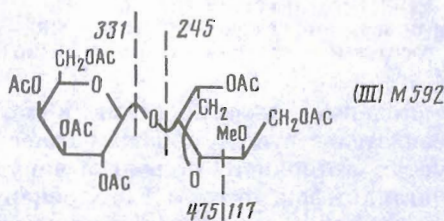
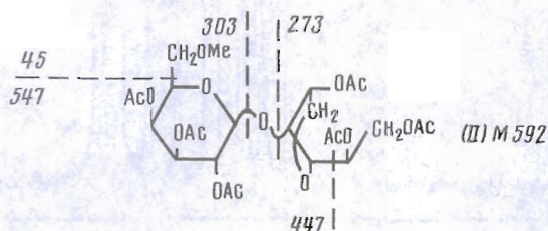
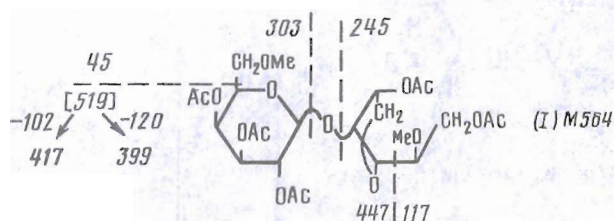
зы, 14,2% 3,6-ангидрогалактозы, 1,6% 2-О-метилгалактозы, 8,9% глюкозы и 22,0% галактозы. Такой состав гидролизата указывал на весьма высокое содержание галактана (свыше 58%) при умеренном содержании фло-ридного крахмала и низком содержании ксилана. Молекулы галактана ха-рактеризовались довольно большим количеством 3,6-ангидросахаров (моль-ное отношение производных 3,6-ангидрогалактозы и галактозы 0,57 : 1) и высокой степенью метилирования, причем метильные группы были обна-ружены главным образом в положении 6 остатков галактозы (соотношение 6-О-метилгалактозы и галактозы 0,62 : 1) и в положении 2 остатков 3,6-ангидрогалактозы (соотношение 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы и 3,6-ангидрогалактозы 0,5 : 1). Впоследствии эти соотношения были уточнены при анализе выделенного агара (в биомассе водоросли часть галактозы мож-жет входить в состав низкомолекулярных галактозидов).

Частичный восстановительный гидролиз биомассы водоросли [9] при-вел к получению 3,6-ангидро-4-О-β-*D*-галактопиранозил-*L*-дульцита (ага-робиита (IV)), идентифицированного в виде ацетата методом ГЖХ, что доказало *L*-конфигурацию остатков 3,6-ангидрогалактозы и, следователь-но, агароподобную природу содержащегося в водоросли галактана. Наряду с ацетатом агаробиита в ацетилованных продуктах частичного гидроли-за были обнаружены еще три вещества (I—III) с несколько большей хро-матографической подвижностью. Исходя из высокой степени метилирова-ния галактана, можно было предположить, что эти вещества являются ме-тиловыми эфирами агаробиита с различным числом или расположением метильных групп. Это предположение было подтверждено при хромато-масс-спектрометрическом исследовании ацетилованных продуктов ча-стичного восстановительного гидролиза. Масс-спектры не оставляют со-мнения (см. схему и табл. 1), что наиболее подвижное из рассматриваемой группы веществ представляет собой ацетат 2,6'-ди-О-метилагаробиита (I), а два следующих за ним — ацетаты 6'-О-метил- (II) и 2-О-метилагаробиита (III). Наибольшую структурную информацию дают пики ионов, образу-ющихся за счет разрыва связей C2—C3 в остатке 3,6-ангидро-*L*-дульцита, связей C—O по обе стороны гликозидного мостика и при отщеплении CH_2OCH_3 от молекулярного иона в соединениях, содержащих остатки 6-О-метил-*D*-галактозы.

В соответствии с методикой анализа продуктов частичного восстано-вительного гидролиза [9] образование веществ (I)—(IV) доказывает стро-гое чередование производных *D*-галактозы и 3,6-ангидро-*L*-галактозы на достаточно протяженных участках молекул галактана и незначительную степень сульфатирования этих участков. Соотношение площадей пиков ацетатов (I)—(IV) на хроматограмме (8 : 26 : 17 : 25) приблизительно со-ответствует неупорядоченному распределению метилированных сахаров в участках молекул полисахарида, расщепляющихся при частичном гидро-лизе.

Для извлечения галактана из водоросли было использовано три спо-соба экстракции: горячей водой (А), горячим фосфатным буфером, рН 5,15 (Б), и горячей водой после предварительной обработки водорослей щелочью (В); из экстрактов гелеобразующий полисахарид выделяли стан-дартным приемом замораживания-оттаивания (ср. [10]). Остаток водо-росли после экстракции промывали водой, затем ацетоном и высушивали в вакууме.

Как видно из табл. 2, суммарный выход гелеобразующего полисахари-да превышает 40% от сухой биомассы водоросли, а способ извлечения не оказывает существенного влияния на выход и состав полисахарида, хотя слабкокислая среда (условия Б) и особенно предварительная щелочная обработка (условия В) способствуют набуханию частиц биомассы, уско-ряют процесс экстракции и уменьшают выход водорослевого остатка.



Принадлежность гелеобразующего галактана к группе агара следует из данных спектра ^{13}C -ЯМР (рис. 1), в котором наблюдаются серии сигналов, относящиеся к повторяющимся звеньям агаробиозы, 6'-О-метилагаробиозы и 2-О-метилагаробиозы. Полная интерпретация спектра не вызывает затруднений, поскольку основывается на обширном литературном материале по спектроскопии ^{13}C -ЯМР агарозы и ее производных [12–17], в том числе на прямом сравнении со спектрами фракций, в которых метилированы практически все положения 6 остатков *D*-галактозы или все положения 2 остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы [11], а также оба эти положения одновременно [18]. Из соотношения интегральных интенсивностей соответствующих сигналов следует, что в агаре из *G. acerosa* молярное отношение производных 3,6-ангидро-*L*-галактозы и *D*-галактозы близко к единице (0,93 : 1), причем отношение 2-О-метил-3,6-ангидро-*L*-галактозы и 3,6-ангидро-*L*-галактозы равно 0,47 : 1, а отношение 6-О-метил-*D*-галактозы и *D*-галактозы составляет 1,02 : 1.

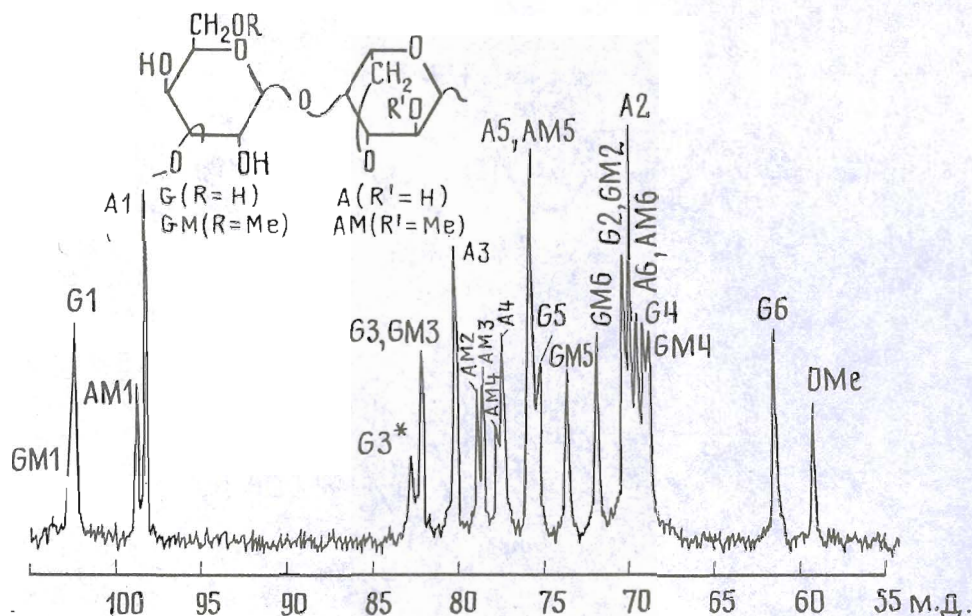


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР агара из *Gelidiella acerosa*. Цифра у символа сахарного остатка отвечает номеру его углеродного атома; G3* – сигнал G3 остатка D-галактозы, соседнего с остатком 2-O-метил-3,6-ангидро-L-галактозы

Невысокая степень сульфатирования и большое содержание 3,6-ангидросахаров свидетельствуют о хорошем качестве нефракционированного агара. В продуктах его полного гидролиза наряду с ожидаемыми галактозой и 6-O-метилгалактозой методом ГЖХ обнаружены небольшие количества глюкозы и ксилозы, что может объясняться наличием в препарате незначительных примесей глюкана (фторидного крахмала) и ксилана, хотя не исключено, что некоторая часть остатков ксилозы входит в состав молекул галактана (ср. [19, 20]).

Высокая точка плавления агаровых гелей, обусловленная повышенным содержанием в галактане остатков 6-O-метил-D-галактозы, обычно не пре-

Таблица 2

Выход и состав агара из *G. acerosa*

Характеристика	Способ экстракции		
	А	Б	В
Количество обработок	4	3	2
Выход агара, %	43,0	42,7	44,1
Содержание, %			
Gal*	50,5	50,0	53,0
AnGal**	38,8	36,5	40,8
сульфат	1,43	1,45	1,35
Мольное отношение Gal* : AnGal** : сульфат	1 : 0,86 : 0,05	1 : 0,82 : 0,05	1 : 0,87 : 0,04
Выход остатка водоросли, %	40,0	35,6	19,5

* Сумма галактозы и ее метиловых эфиров по реакции с фенолом в конц. H_2SO_4 .

** Сумма 3,6-ангидрогалактозы и 2-O-метил-3,6-ангидрогалактозы по реакции с резорцином — HCl .

Фракционная экстракция агара из *Gelidiella acerosa*

Номер фракции	Экстрагент	Выход, %	SO ₃ Na, %	Мольное отношение *		2MeAnGal : AnGal
				Gal+6MeGal : AnGal+2MeAnGal	6MeGal : Gal	
1	H ₂ O, 20° С	1,2	0,78	1 : 0,84	2,82 : 1	0,86 : 1
2	95% EtOH, кипячение	1,8	1,52	1 : 0,30	0,29 : 1	0,58 : 1
3	80% EtOH, »	1,0	0,93	1 : 0,94	2,63 : 1	0,63 : 1
4	60% EtOH, »	8,9	0,95	1 : 0,96	1,24 : 1	0,40 : 1
5	40% EtOH, »	7,1	2,43	1 : 1,00	0,61 : 1	0,36 : 1
6	20% EtOH, »	3,5	3,70	1 : 0,80	0,45 : 1	0,36 : 1
7	H ₂ O, 95° С	3,9	2,57	1 : 0,73	0,40 : 1	0,40 : 1

* Определение методом ГЖХ после полного восстановительного гидролиза [9].

пятствует применению агара в пищевой технологии, но может быть нежелательной при использовании его в микробиологии и биотехнологии. Используя методику фракционной экстракции агароподобных полисахаридов из водорослей водно-этанольными смесями [11], мы попытались разделить суммарный агар на фракции, различающиеся степенью сульфатирования и метилирования. С этой целью измельченную и обезжиренную биомассу водоросли экстрагировали вначале водой при комнатной температуре, а затем обрабатывали при кипячении последовательно 95, 80, 60, 40 и 20% этанолом и наконец горячей водой. Выходы и состав полученных при этом фракций агара приведены в табл. 3. Все перечисленные фракции были также охарактеризованы спектрами ¹³C-ЯМР.

Исследования показали, что, вопреки ожиданиям, экстракция водой при комнатной температуре не дает вещества, обогащенного сульфатными группами; фракция 1, выделенная с небольшим выходом, по составу напоминает фракцию 3, полученную при экстракции кипящим 80% этанолом. Обе эти фракции отличались весьма высоким содержанием 6-О-метил-D-галактозы и несколько повышенным содержанием 2-О-метил-3,6-ангидро-L-галактозы (табл. 3, рис. 2). При дальнейшей обработке водоросли водно-этанольными смесями с понижающейся концентрацией этанола и далее водой были получены фракции с постепенно уменьшающимся содержанием 6-О-метил-D-галактозы, но с практически постоянным содержанием 2-О-метил-3,6-ангидро-L-галактозы. Фракция 2 выпадает из этой последовательности, так как содержит значительное количество неуглеводных примесей и представляет собой, по всей вероятности, смесь сравнительно низкомолекулярных олигосахаридов.

Таким образом, водоросль *G. acerosa* является источником высококачественного агара, выход которого превышает 40% от сухой биомассы. Этот агар содержит мало сульфатных групп и практически лишен звеньев типа порфирана, поэтому для его выделения можно применять экстракцию водой без стадии щелочной обработки. Отличительная особенность агара — сравнительно высокая степень метилирования. Метильные группы расположены в положении 6 остатков D-галактозы и в положении 2 остатков 3,6-ангидро-L-галактозы, причем распределены в молекулах галактана достаточно равномерно: хотя фракционная экстракция позволяет получить фракции агара со степенью метилирования, существенно превышающей среднее значение, выход этих фракций незначителен.

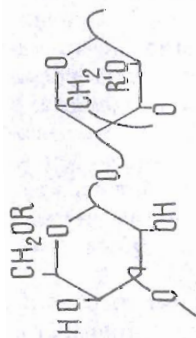


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР фракции 3, полученной при фракционной экстракции *G. aserosa* 80% этанолом

Экспериментальная часть

Количественное определение сульфата проводили турбидиметрическим методом после гидролиза полисахаридов в 1 н. HCl [21], 3,6-ангидрогалактозы — колориметрическим методом по реакции с резорцином и конц. HCl [22], галактозы — по реакции с фенолом и конц. H₂SO₄ [23] с поправкой на содержание производных 3,6-ангидрогалактозы.

ГЖХ ацетатов полиолов и ацетатов альдононитрилов выполняли на хроматографе Hewlett—Packard 5890 А с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-1 и интегратором HP 3393 А. Полный моносахаридный анализ образцов методом ГЖХ с применением восстановительного гидролиза для предотвращения деструкции 3,6-ангидрогалактозы выполняли, как описано в работе [9]. Частичный восстановительный гидролиз биомассы водоросли и анализ ацетилированных продуктов методом ГЖХ также проводили по методу, описанному в работе [9]; полученные соединения (I—IV) с временами удерживания относительно гексаацетата инозита 2,38, 2,61, 2,73 и 3,02 характеризовали масс-спектрами (см. схему и табл. 1). Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе М-80 А (Hitachi, Япония), для хроматографирования использовали колонку с 2% OV-1 на газхроме Q при программируемой температуре 200—280° С со скоростью 6°/мин.

Спектры ¹³C-ЯМР получали на приборе Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц для 2% растворов полисахаридов в D₂O при 80° С, внутренним стандартом служил диметилсульфоксид (39,5 м. д.).

Экстракция агара

Способ А. 3,0 г измельченной сухой биомассы водоросли заливали 300 мл воды, оставляли на ночь и затем перемешивали 6 ч при нагревании на кипящей водяной бане. Горячую смесь центрифугировали, остаток водоросли еще трижды обрабатывали порциями по 250 мл воды в тех же условиях. Водные экстракты оставляли на ночь при комнатной температуре для образования геля, после чего замораживали, оттаивали на ткани, гель промывали водой, затем расплавляли в 0,5 л воды, снова замораживали и оттаивали; очищенный гель лиофилизовали.

Способ Б. 3,0 г измельченной сухой биомассы заливали 300 мл 0,025 М раствора NaH₂PO₄ (рН 5,15) и проводили экстракцию этим раствором и очистку геля, как описано в способе А (три обработки).

Способ В. 3,0 г измельченной сухой биомассы заливали 300 мл 1 н. NaOH, нагревали 1 ч на кипящей водяной бане, после охлаждения смесь нейтрализовали AcOH и водоросль тщательно промывали водой. К влажному осадку приливали 250 мл воды и экстрагировали агар, как описано в способе А (две обработки).

Фракционная экстракция. Измельченную биомассу перемешивали с несколькими порциями ацетона до получения бесцветных экстрактов и высушивали над P₂O₅. 10 г обезжиренной биомассы заливали 1 л воды, перемешивали 5 ч при комнатной температуре, центрифугировали, остаток водоросли еще дважды экстрагировали водой в тех же условиях, объединенные экстракты концентрировали в вакууме, диализовали и лиофилизовали, получали фракцию 1.

Остаток водоросли промывали 95% этанолом, а затем перемешивали с 300 мл 95% этанола при кипячении в течение 3 ч. Смесь центрифугировали, осадок еще дважды обрабатывали в тех же условиях, экстракты объединяли, концентрировали в вакууме, диализовали и лиофилизовали, получали фракцию 2. Далее водоросль обрабатывали последовательно 80, 60, 40 и 20% этанолом при кипячении, а затем водой при 95° С, как опи-

сано выше, получали фракции 3–7. Выходы и состав фракций 1–7 см. в табл. 3.

Авторы приносят глубокую благодарность сотрудникам ВНИРО Н. И. Рехиной и Ю. Г. Вороновой за предоставленный образец водоросли *G. acerosa* и сотруднику НИИ сельскохозяйственной биотехнологии ВАСХНИЛ В. Л. Садовской за проведение хроматомасс-спектрометрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Usov A. I., Klochkova N. G. // Bot. Mar. 1992. In Press.
2. Doshi Y. A., Rao P. S. // Res. Ind. 1969. V. 14. № 2. P. 71–73.
3. Doshi Y. A., Rao A. V. // J. Sci. Ind. Res. 1980. V. 39. № 7. P. 364–371.
4. Su H.-M., Young K. S. // T'ai-wan Shui Ch'an Hsueh Hui K'an. 1977. V. 6. № 1. P. 1–11. C. A. 1979. V. 90. № 13. 100139d.
5. Ho P. H., Kinh L. C. // Ann. Fac. Sci. Univ. Saigon. 1962. P. 351–354. C. A. 1965. V. 62. № 3. 2950a.
6. Guiseley K. B. // Carbohydr. Res. 1970. V. 13. № 2. P. 247–256.
7. Эсте́вес М. Л. Исследование полисахаридов некоторых красных морских водорослей Кубы. Дис. ... канд. хим. наук. М.: ИОХ АН СССР, 1981. С. 1–78.
8. Usov A. I., Yarotsky S. V., Estevez M. L. // Rev. Cubana Quim. 1986. V. 2. № 3. P. 30–35.
9. Усов А. И., Элашвили М. Я. // Биоорг. химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 839–848.
10. Усов А. И., Иванова Е. Г. // Биоорг. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1545–1551.
11. Lahaye M., Rochas C., Yaphe W. // Can. J. Bot. 1986. V. 64. № 3. P. 579–585.
12. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 1. С. 74–81.
13. Usov A. I., Ivanova E. G., Shashkov A. S. // Bot. Mar. 1983. V. 26. № 6. P. 285–294.
14. Usov A. I. // Bot. Mar. 1984. V. 27. № 5. P. 189–202.
15. Lahaye M., Rochas C., Yaphe W. // Carbohydr. Res. 1985. V. 143. P. 240–245.
16. Rochas C., Lahaye M., Yaphe W., Phan Viet M. T. // Carbohydr. Res. 1986. V. 148. № 2. P. 199–207.
17. Lahaye M., Yaphe W., Phan Viet M. T., Rochas C. // Carbohydr. Res. 1989. V. 190. № 2. P. 249–265.
18. Furneaux R. H., Miller I. J., Stevenson T. T. // Hydrobiologia. 1990. V. 204/205. P. 645–654.
19. Furneaux R. H., Stevenson T. T. // Hydrobiologia. 1990. V. 204/205. P. 615–620.
20. Usov A. I., Elashvili M. Ya. // Bot. Mar. 1991. V. 34. № 6. P. 553–560.
21. Dodgson K. S., Price R. G. // Biochem. J. 1962. V. 84. № 1. P. 106–110.
22. Yaphe W., Arsenault G. P. // Anal. Biochem. 1965. V. 13. № 1. P. 143–148.
23. 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
4.II.1992

A. I. USOV, E. G. IVANOVA

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. 46. STUDIES ON AGAR FROM THE RED SEAWEED *GELIDIELLA ACEROSA*

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

The red seaweed *Gelidiella acerosa* from Philippines was shown to contain an agar, the yield (over 40% of dry biomass) being almost independent on the extraction procedure (treatment with hot water, hot phosphate buffer pH 5.15, or hot water after pretreatment of the alga with 1 M NaOH). According to the chemical analyses and ¹³C NMR spectral data, the main features of the agar preparation were low degree of sulfation, very low content of porphyran type units (as followed from the molar proportion of 3,6-anhydro-*L*-galactose to *D*-galactose derivatives, 0.93:1) and high content of methylated monosaccharides (the 6-*O*-methyl-*D*-galactose to *D*-galactose ratio about 1:1, and 2-*O*-methyl-3,6-anhydro-*L*-galactose to 3,6-anhydro-*L*-galactose about 1:2). Fractional extraction of biomass gave several agar fractions with higher degrees of methylation, their yields being rather low. Partial reductive hydrolysis of the biomass in the presence of 4-methylmorpholine – borane afforded reduced disaccharide fragments of the agar molecules, namely, agarobitol and its 2-*O*-methyl-, 6'-*O*-methyl-, and 2,6'-di-*O*-methyl derivatives. Their structures were confirmed by GLC-MS of the corresponding acetates.