



УДК 547.458.7+582.272

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРОСЛЕЙ. 55. ПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ НЕКОТОРЫХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ КАМЧАТКИ

© 2001 г. А. И. Усов*, Г. П. Смирнова*, Н. Г. Клочкова**

* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
119991, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., 47;

** Камчатский институт экологии и природопользования РАН, Петропавловск-Камчатский
Поступила в редакцию 19.01.2001 г. Принята к печати 12.02.2001 г.

С помощью специально разработанной методики спектрофотометрического анализа экстрактов биомассы определено содержание фукоидана и альгината в 17 видах бурых водорослей, собранных на побережье полуострова Камчатка. Кроме того, проведен количественный анализ нейтральных моносахаридов и маннита в гидролизатах биомассы исследованных образцов водорослей. Показано, что полисахаридный состав биомассы существенно зависит от вида водоросли. Наибольшее содержание альгинатов отмечено в *Alaria marginata*; удобными источниками этих полисахаридов могут служить также все другие представители порядка *Laminariales*. В то же время водоросли этого порядка характеризуются низким содержанием фукоиданов. Наибольшее количество фукоидана найдено в *Saundersella simplex*, однако с практической точки зрения более удобными источниками фукоиданов являются *Chordaria flagelliformis* и *Fucus evanescens*; последняя водоросль благодаря ее доступности и углеводному составу наиболее пригодна для комплексной переработки с целью получения маннита, фукоидана и альгиновой кислоты.

Ключевые слова: бурые водоросли; альгиновые кислоты; фукоиданы; ламинараны.

ВВЕДЕНИЕ

Бурые водоросли существенно отличаются по структуре веществ углеводной природы от водорослей других отделов и от наземных растений [2]. Резервным материалом в них служат маннит и сравнительно низкомолекулярные β -1,3-1,6-глюканы – ламинараны. В клеточных стенках и межклеточном пространстве содержатся соли альгиновых кислот – альгинаты – и сложные сульфатированные полисахариды, называемые фукоиданами, поскольку их главным моносахаридным компонентом обычно является *L*-фукоза.

Альгиновые кислоты представляют собой линейные полимеры, молекулы которых построены из 1,4-связанных остатков β -D-маннуроновой и α -L-гулероновой кислот. Альгинаты разного происхождения могут существенно различаться как соотношением этих двух мономеров, так и распределением их вдоль полимерной цепи. Оба эти параметра оказывают определяющее влияние на свойства полисахаридов, особенно на важную в практическом отношении способность к гелеобразованию и на избирательное взаимодействие с двухвалентными катионами. Альгиновые кислоты и альгинаты находят широкое применение в пищевой промышленности, биотехнологии и медицине. Химическая переработка бурых водорослей, направленная на получение этих полисахаридов, – одно из главных направлений их практического использования, которое осуществляется в широком масштабе [3]. В отдельных случаях при этом получают одновременно и маннит – также для медицинских целей [4].

Ламинараны и фукоиданы пока не нашли широкого практического использования. Из этих полисахаридов наибольший интерес представляют фукоиданы, которые проявляют многочисленные важные биологические эффекты, связанные с их способностью модифицировать свойства клеточной поверхности. Считается, что они могут найти применение при разработке новых медицинских препаратов противовирусного, противовоспалительного, противоопухолевого, иммуномодулирующего, контрацептивного и антикоагулянтного действия [5–8]. Биологическую активность фукоиданов относят в первую очередь к высокой степени сульфатирования их молекул, хотя очевидно, что тонкие детали структуры и молекулярно-массовое распределение также существенно влияют на биологические свойства препаратов [5, 9, 10]. Однако большие трудности, с которыми сопряжено установление строения этих разветвленных и высокосульфатированных полисахаридов, не

Сообщение 54 см. [1].

* Автор для переписки (тел.: (095) 137-67-91; факс: (095) 135-53-28; эл. почта: usov@ioc.ac.ru).

позволяют пока непосредственно связать проявление той или иной активности с определенными деталями структуры их молекул.

Прибрежные воды Камчатки могли бы служить практически неисчерпаемым источником бурых водорослей для промышленной переработки. К сожалению, в настоящее время эти ресурсы не используются и с химической точки зрения изучены недостаточно. В одной из предыдущих статей [11] мы привели сведения о содержании маннита в 25 образцах бурых водорослей Камчатки (17 видов). Целью данной работы является оценка содержания фукоидана и альгината в тех же образцах водорослей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа полисахаридного состава биомассы применяют несколько различных подходов. Например, можно использовать методику фракционной экстракции с последующим гравиметрическим определением отдельных фракций. Недостаток способа – большая длительность и трудоемкость процесса. Другим приемом является кислотный гидролиз биомассы с последующим хроматографическим определением отдельных моносахаридов. Такой подход позволяет оценить содержание ламинарана по выходу глюкозы, фукоидана – по выходу фукозы, одновременно определить маннит, но, к сожалению, не дает надежных сведений о содержании альгиновых кислот вследствие их устойчивости к гидролизу [12]. Оба эти метода были применены нами ранее для характеристики полисахаридного состава некоторых бурых водорослей Японского моря [13]. Гидролиз биомассы и определение нейтральных моносахаридов с помощью ГЖХ проводились и в данной работе (таблица)*, однако необходимость получения сведений о содержании альгинатов заставила нас обратиться к разработке более универсальной методики анализа.

Наиболее простым и надежным способом определения фукоиданов может служить спектрофотометрия, основанная на специфической цветной реакции фукозы с L-цистеином и серной кислотой. Эту реакцию дают и другие 6-дезоксигексозы, но в биомассе бурых водорослей они, как правило, отсутствуют, а влияние прочих сахаров можно исключить, проводя измерение при двух длинах волн [14]. Именно такая процедура рекомендована в известном практическом руководстве по биохимии водорослей [15], хотя, как правило, ее применению препятствует сильная собственная окра-

ска кислых водных экстрактов биомассы, содержащих фукоидан. Чтобы исключить влияние окраски, в цитируемой методике предлагается проводить фракционное осаждение фукоидана этанолом в присутствии солей магния, что сильно усложняет анализ и часто неэффективно. Аналогично альгинаты удобнее всего было бы определять спектрофотометрически по одной из цветных реакций, характерных для уроновых кислот, но щелочные экстракты биомассы, содержащие альгинаты, обычно окрашены имеющимися в водоросли пигментами еще более интенсивно, чем кислые экстракты, содержащие фукоидан.

Мы показали, что помехи для спектрофотометрического анализа, связанные с собственной окраской экстрактов, можно устранить, применив обесцвечивание кислых экстрактов действием небольших добавок хлорита натрия, а щелочных экстрактов – действием брома [16]. Полученные бесцветные растворы после удаления неорганических солей диализом пригодны для спектрофотометрического определения фукоидана и альгината. С помощью этой методики были получены количественные данные, приведенные в таблице (разработка методики анализа описана в отдельной статье [17]).

Анализируя данные таблицы, рассмотрим вначале информацию, полученную с помощью гидролиза биомассы. Количество определение маннита в кислотном гидролизате методом ГЖХ дало результаты, в большинстве случаев весьма близкие к данным с использованием предварительной исчерпывающей экстракции маннита из биомассы [11]. Существенное завышение отмечено только для образца 4, что объясняется большим содержанием фукоидана в этой водоросли (ранее уже отмечалось [11], что при дериватизации фукозы образуется неидентифицированное соединение, пик которого на хроматограмме может частично накладываться на пик гексаацетата маннита). Содержание ламинаранов следует из выхода глюкозы при гидролизе. Как видно из таблицы, в большинстве образцов этот полисахарид содержится в количестве около 1%. Заметным исключением служит только *Alaria marginata*, где содержание ламинарана превышает 6% в спорофиллах и 10% в черешках. Содержание фукоиданов следует из выхода фукозы. Наиболее богатым источником фукоидана является *Sandersella simplex* (4), далее идут *Chordaria flagelliformis* (2), *C. gracilis* (3), *Dictyosiphon foeniculaceus* (5) и *Fucus evanescens* (25). Представители порядка ламинариевых весьма бедны фукоиданами, однако интересным исключением являются спорофиллы *A. marginata* (20), содержащие в несколько раз больше фукозы, чем другие части этого растения (образцы 19, 21, 22). Выход прочих нейтральных моносахаридов (ксилозы, маннозы и галактозы) при гидролизе биомассы всех исследованных водорослей

* Необходимо иметь в виду, что в работе [13] результаты выражены в % от биомассы, из которой предварительно были удалены низкомолекулярные вещества, тогда как в данной статье, как и в работе [11], водоросли подвергались только высушиванию и измельчению.

Углеводный состав биомассы бурых водорослей Камчатки (% от сухого веса)

Номер образца	Вид водоросли	Часть растения	Полисахариды (по данным спектрофотометрии)		Моносахариды в гидролизате биомассы (по данным ГЖХ)					
			альгинат	фукоидан	Xyl	Fuc	Man	Glc	Gal	Man-ol
1	<i>Pylayella littoralis</i> (L.) Kjellm.	Весь таллом	9.2	1.2	1.7	1.4	0.7	1.3	2.0	1.4
2	<i>Chordaria flagelliformis</i> (Mull.) Ag.	»	17.1	14.3	0.3	10.7	0.9	0.9	1.9	0.7
3	<i>C. gracilis</i> Setch. et Gardn.	»	19.0	9.0	0.3	8.3	1.1	1.0	2.9	1.1
4	<i>Saundersella simplex</i> (Saund.) Kylin	»	11.0	20.4	1.5	12.8	0.9	1.7	1.8	2.4
5	<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i> (Huds.) Grev.	»	10.2	6.0	1.6	5.4	0.8	0.9	1.5	1.4
6	<i>Petalonia fascia</i> (Mull.) Kuntze	»	17.0	0.6	0.6	1.2	0.6	1.0	1.6	1.6
7	<i>Scytoniphon lomentaria</i> (Lyngb.) J.Ag.	»	26.3	2.8	1.2	3.1	1.0	1.2	2.3	0.6
8	<i>Desmarestia intermedia</i> P. et R.	»	22.9	0.4	0.6	1.4	0.9	3.1	1.2	4.7
9	<i>Laminaria bongardiana</i> P. et R.	Пластины	28.7	1.0	0.5	1.5	0.5	0.4	1.1	12.6
10	»	Черешки	29.8	1.2	0.9	1.9	0.7	0.4	0.6	6.9
11	<i>L. longipes</i> Bory	Пластины	27.0	2.4	0.5	2.2	0.6	0.2	0.6	17.7
12	»	Черешки	23.7	1.1	1.2	1.8	0.9	0.4	0.5	7.7
13	<i>L. dentigera</i> Kjellm.	Пластины	26.8	0.4	0.3	0.8	0.4	0.3	0.7	20.5
14	»	Черешки	23.2	0.7	0.3	0.9	0.4	0.4	0.5	5.8
15	<i>Agarum cibrosum</i> Bory	Весь таллом	21.6	1.2	0.6	1.7	0.8	0.6	1.1	5.7
16	<i>Thalassiothlyllum clathrus</i> (Gmel.) P. et R.	»	23.3	1.2	0.5	1.5	0.9	0.6	1.2	1.2
	Сем. Arthrothamnaceae									
17	<i>Arthrothamnus bifidus</i> P. et R.	Пластины	28.8	0.4	0.2	0.8	0.4	0.4	0.6	23.5
18	»	Черешки	26.4	1.0	0.6	1.3	0.7	0.4	0.6	10.5
	Сем. Alariaceae									
19	<i>Alaria marginata</i> P. et R.	Пластины	34.1	1.4	0.6	1.4	0.7	1.7	0.9	7.5
20	»	Спорофиллы	22.0	6.7	0.2	3.5	0.4	6.2	2.6	4.2
21	»	Жилка	28.3	0.6	0.4	0.7	0.5	0.6	0.6	18.6
22	»	Черешки	27.2	0.6	0.6	1.0	0.5	10.4	0.5	12.6
23	<i>A. fistulosa</i> P. et R.	Пластины	26.5	1.1	0.3	1.9	0.5	0.3	1.1	15.4
24	»	Жилка	26.0	0.5	0.1	0.7	0.3	0.5	0.5	19.1
	Класс Cyclosporophyceae									
	Порядок Fucales									
	Сем. Fucaceae									
25	<i>Fucus evanescens</i> Ag.	Весь таллом	17.3	7.7	0.8	4.4	0.5	5.3	0.7	8.0

сравнительно невелик. По всей вероятности, они служат компонентами сложных сульфатированных гетерополисахаридов, родственных фукоиданам [2].

Главное преимущество спектрофотометрического анализа – возможность получения сведений о количественном содержании альгинатов. Как видно из таблицы, этот показатель очень существенно за-

висит от таксономического положения водоросли. Наиболее перспективны для практического получения альгинатов все представители порядка ламинариевых, в числе которых наивысшее содержание этого полисахарида найдено в пластинах *A. marginata* (образец 19). Интересно отметить, что спорофиллы этой водоросли (образец 20) содержат значительно меньше альгината, чем другие части растения (образцы 19, 21 и 22). Во всех остальных случаях, когда были проанализированы морфологически различные части растений (образцы 9–14, 17 и 18, 23 и 24), такой большой разницы в содержании альгинатов отмечено не было.

При спектрофотометрическом анализе фукоиданов, в соответствии с примененной методикой экстракции (см. "Эксперимент. часть"), определяется только часть фукозосодержащих полисахаридов, легко растворимая в разбавленных кислотах. Поэтому содержание фукоидана, найденное этим способом, как правило, ниже, чем содержание, рассчитанное из выхода фукозы при гидролизе биомассы (для пересчета выход фукозы умножают на 2, исходя из условного среднего содержания фукозы в фукоидане, равного 50% [15]). Однако именно эти легко растворимые фракции фукоиданов представляют собой полисахариды с наиболее высоким содержанием фукозы и сульфата (ср., например, [18]), особенно интересные как биологически активные соединения. Поэтому данные спектрофотометрических измерений позволяют непосредственно оценить исследованные образцы в качестве возможного источника биологически активных фукоиданов. Очевидно, что ламинариевые водоросли, богатые альгинатами, содержат слишком мало фукоиданов и не могут служить удобным сырьем для их получения. Спектрофотометрический анализ подтвердил данные ГЖХ о наивысшем содержании фукоидана в *S. simplex*, но эта водоросль не доступна в больших количествах. Ограниченной доступностью характеризуются также сравнительно богатые фукоиданами виды рода *Chordaria* и *D. foeniculaceus*.

Как источник полисахаридов с практической точки зрения особенно привлекателен *F. evanescens*. Этот вид имеет обширный ареал распространения, растет на мелководье и легко доступен. Его биомасса содержит одновременно достаточно большие количества альгината, фукоидана и маннита, так что все эти вещества можно получать из нее при соответствующей комплексной переработке. Молекулы альгината этой водоросли, по данным спектра ^{13}C -ЯМР, построены из остатков маннуроновой (M) и гулуроновой (G) кислот в соотношении 5 : 2 ($M/G = 2.5$) и близки по этому показателю многим альгинатам из других бурых водорослей, находящим разнообразное практическое применение. Химической характеристике фукоидана из *F. evanescens* будет посвящено одно из наших последующих сообщений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Водоросли, собранные в июле 1990 г. в Авачинской губе в окрестностях г. Петропавловска-Камчатского, высушивали вначале на воздухе, затем в вакууме над фосфорным ангидридом до постоянного веса и измельчали до размера частиц, не превышающего 0.1 мм.

ГЖХ проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5890A, снабженном пламенно-ионизационным детектором и интегратором 3393A, с использованием капиллярной колонки HP Ultra-2 в токе азота при градиенте температуры от 175 до 290°C со скоростью 10°/мин. Для кислотного гидролиза к навескам биомассы (20–30 мг) приливали 1 мл 2 М трифтторуксусной кислоты, содержащей мио-инозит (0.9 мг/мл), нагревали 8 ч при 100°C, кислоту отгоняли в вакууме с этанолом. Перевод освободившихся нейтральных моносахаридов в ацетаты альдоонитрилов и количественный анализ методом ГЖХ проводили по методике [19].

Спектры ЯМР ^{13}C снимали на спектрометре Bruker AM-300, для спектрофотометрических измерений использовали Ultraspec 4050 (LKB Biochrom).

Спектрофотометрическое определение фукоидана и альгината. Навеску сухой измельченной биомассы водоросли (около 150 мг) помещали в центрифужный стакан на 50 мл, приливали 25 мл 0.2 М HCl и перемешивали на магнитной мешалке 1 ч при 70°C. Экстракт отделяли центрифугированием, к остатку водоросли приливали 25 мл 0.1 М HCl и экстрагировали еще раз в тех же условиях. Кислые экстракты объединяли, вносили 75 мг хлорита натрия, перемешивали до полного растворения соли, выдерживали 1 ч при комнатной температуре, диализовали в течение 3 сут против дистиллированной воды, раствор переносили в мерную колбу на 100 мл, доводили до метки водой, при необходимости фильтровали через бумажный фильтр и определяли содержание фукоидана в аликвотах по 0.5 мл по реакции фукозы с хлоргидратом *L*-цистеина и концентрированной серной кислотой [14]. Для построения калибровочного графика в интервале 0–75 мкг фукозы в пробе использовали раствор очищенного фукоидана из *Laminaria saccharina* [20], 300 мкг/мл, или раствор фукозы, 150 мкг/мл (в последнем случае результат определения удваивали, исходя из среднего содержания фукозы в фукоиданах, равного 50%, ср. [15]).

Остаток водоросли перемешивали с 25 мл 3% раствора карбоната натрия в течение 1 ч при 70°C, экстракт отделяли центрифугированием, а осадок еще дважды обрабатывали в тех же условиях. К объединенному соловому экстракту при комнатной температуре прибавляли 5 капель (110 мг, 0.035 мл) брома, перемешивали несколько мин до полного растворения брома и оставляли на ночь. Обесцвеченный раствор диализовали 3 сут про-

тив дистиллированной воды, переносили в мерную колбу на 500 мл, доводили до метки водой, при необходимости фильтровали через бумажный фильтр и определяли содержание альгината в аликвотах по 0.5 мл по реакции с 3,5-диметилфенолом и серной кислотой [21]. Для построения калибровочного графика в интервале 0–50 мкг альгината в пробе использовали раствор альгината натрия (BDH, Англия), 100 мкг/мл.

Характеристика альгината из *F. evanescens*. Обесцвеченный раствор альгината, полученный по описанной выше методике, лиофилизовали, остаток растворяли в $^2\text{H}_2\text{O}$ и использовали для получения спектра ЯМР ^{13}C в условиях, описанных в работе [22], в соответствии с которой проводили отнесение сигналов и расчет относительного содержания маннуроновой и гулуроновой кислот (M/G = 2.5).

Работа поддержана грантом РГНТП Научного совета "Химия и технология переработки возобновляемого растительного сырья" ХТРС 8.1.14.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Khatuntseva E.A., Usov A.I. // Carbohydr. Res. 1999. V. 320. P. 108–119.
- Painter T.J. // The Polysaccharides. V. 2 / Ed. G.O. Aspinall. N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 195–285.
- Clare K. // Industrial Gums. Polysaccharides and Their Derivatives / Eds R.L. Whistler, J.N. BeMiller. N.Y.: Acad. Press, 1993. P. 105–143.
- Кизеветтер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А. Переработка морских водорослей и других промышленных водных растений. М.: Пищевая пром-сть, 1967. С. 343–348.
- Nagumo T., Nishino T. // Polysaccharides in Medicinal Applications / Ed. S. Dumitriu. N.Y.: Marcel Dekker. Inc., 1996. P. 545–574.
- Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., Clark G.F. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 21770–21776.
- Preobrazhenskaya M.E., Berman A.E., Mikhailov V.I., Ushakova N.A., Mazurov A.V., Semenov A.V., Usov A.I., Nifant'ev N.E., Bovin N.V. // Biochem. Mol. Biol. International. 1997. V. 43. P. 443–451.
- Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Нифантьев Н.Э., Усов А.И., Почекуева Т.В., Галанина О.Е., Бовин Н.В. // Вопросы мед. химии. 1999. Т. 45. С. 375–383.
- Chevolot L., Foucault A., Chaubet F., Kervarec N., Sinquin C., Fisher A.-M., Boisson-Vidal C. // Carbohydr. Res. 1999. V. 319. P. 154–165.
- Chaubet F., Chevolot L., Jozefonvich J., Durand P., Boisson-Vidal C. // Bioactive Carbohydrate Polymers / Ed. B.S. Paulsen. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 59–84.
- Усов А.И., Клочкива Н.Г. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 1236–1241.
- Усов А.И. // Успехи химии. 1999. Т. 68. С. 1051–1061.
- Усов А.И., Кошелева Е.А., Яковлев А.П. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. С. 830–836.
- Dische Z., Shettles L.B. // J. Biol. Chem. 1948. V. 175. P. 595–603.
- Larsen B. // Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods / Eds J.A. Hellebust, J.S. Craigie. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978. P. 151–156.
- Смирнова Г.П., Усов А.И. // Всероссийская конф. "Химия и технология растительных веществ". Тез. докл. Сыктывкар, 2000. С. 137.
- Usov A.I., Smirnova G.P. // Proc. 17th Int. Seaweed Symp. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001 (in press).
- Усов А.И., Кирьянов А.В. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 1342–1348.
- Morrison I.M. // J. Chromatogr. 1975. V. 108. P. 361–364.
- Усов А.И., Смирнова Г.П., Билан М.И., Шашков А.С. // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. С. 437–445.
- Usov A.I., Bilan M.I., Klokchova N.G. // Bot. Mar. 1995. V. 38. P. 43–51.
- Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O. // Carbohydr. Res. 1981. V. 89. P. 179–191.

Polysaccharides of Algae. 55. Polysaccharide Composition of Several Brown Algae from Kamchatka

A. I. Usov**, G. P. Smirnova*, and N. G. Klokchova**

Phone: +7 (095) 137-6791, fax: +7 (095) 135-5328, e-mail: usov@ioc.ac.ru

*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, GSP-1 Moscow, 119991 Russia

**Kamchatka Institute of Ecology and Natural Resources, Russian Academy of Sciences, Petropavlovsk-Kamchatskii, 683602 Russia

A new spectrophotometric procedure was developed for the quantitative determination of fucoidan and alginic acid and used for their analysis in extracts from biomass of 17 species of brown algae collected in coastal waters of the Kamchatka peninsula. In addition, neutral monosaccharides and mannitol were determined in the hydrolysis products of the alga biomass samples. The polysaccharide composition was shown to substantially depend on the algal species. The alginic acid content was maximal in the *Alaria marginata* blades; all the other representatives of the order Laminariales are also useful sources of the polysaccharides. At the same time, the fucoidan content is rather low in Laminariales. The highest content of fucoidan was found in *Saundersella simplex*, but *Chordaria flagelliformis* and *Fucus evanescens* are more practical fucoidan sources; the available supplies and the sugar composition make the latter alga the most suitable for the complex processing to prepare mannitol, fucoidan, and alginic acid. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: alginic acid, brown algae, fucoidans, laminarans