



УДК 547.458.7.02+582.273

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРОСЛЕЙ

XXIX *. СРАВНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ АГАРА ИЗ РАЗЛИЧНЫХ
ГЕНЕРАЦИЙ *GRACILARIA VERRUCOSA* (HUDS.) PAPENF.

Усов А. И., Иванова Е. Г.

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

Макиенко В. Ф.

Тихоокеанский институт рыбного хозяйства и океанографии,
Владивосток

Изучен полисахаридный состав отдельных генераций красной морской водоросли *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf., перспективного объекта для искусственного культивирования. Показано, что зрелые водоросли, имеющие органы размножения и относящиеся к различным генерациям (тетраспорофит, мужской и женский гаметофиты), мало различаются по содержанию агара, его фракционному составу и свойствам. Стерильные (ювенильные) растения, напротив, дают агар с меньшим выходом и худшего качества. Гелеобразующие свойства образцов агара значительно улучшаются после обработки щелочью в контролируемых условиях.

Агар является одним из лучших природных гелеобразователей и находит все возрастающее применение в микробиологии, биохимической лабораторной технике, пищевой промышленности [2]. Однако природные запасы красных морских водорослей — источников агара ограничены, и проблема увеличения производства агара может быть решена, очевидно, только путем разведения подходящих видов водорослей в искусственных условиях.

Перспективным объектом для культивирования на Дальнем Востоке является *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (синоним *Gracilaria confervoides* (L.) Grév.). Эта водоросль дает агар, обладающий хорошими гелеобразующими свойствами, с достаточно высоким выходом и в ряде стран используется для его промышленного получения [2, 3]. Растущая в Японском море *G. verrucosa* имеет короткий вегетационный период, за три-четыре месяца роста может достигать 1,5 м в длину, оптимальными условиями для ее развития являются глубина порядка 1 м, температура воды 15—25°С и соленость 25—29‰. Природная популяция представляет собой, как правило, смесь нескольких форм развития (генераций), а именно: тетраспорофита, женского гаметофита с развившимся на нем после оплодотворения карпоспорофитом, мужского гаметофита (антеридиальная форма) и стерильных (ювенильных) растений, у которых еще не определена принадлежность к той или иной генерации [4]. Имеющиеся в литера-

* Сообщение XXVIII см. [1].

Фракции полисахаридов, полученные из различных генераций *Gracilaria verrucosa*

Номер образца	Генерация	Выход, %		
		Агар	Негелеобразующие полисахариды	
			кислый	нейтральный
1	Природная смесь	29,5	8,0	—
2	Тетраспорофит	34,9	3,0	4,1
3	Женский гаметофит с карпоспорофитом	32,8	8,4	3,2
4	Мужской гаметофит (антеридиальная форма)	35,6	3,8	4,1
5	Стерильные растения	18,1	21,0	5,9
Моносахаридный состав *		Gal, 6-O-Me-Gal, Xyl (следы)	Gal, 6-O-Me-Gal, Xyl	Glc, Gal, Xyl

* По данным БХ после кислотного гидролиза, 3,6-ангидрогалактоза полностью разрушается при кислотном гидролизе.

туре сведения о химическом исследовании агара из *G. verrucosa* относятся, по всей вероятности, к препаратам, полученным из смеси различных генераций [5]. В последние годы, по крайней мере для водорослей, содержащих полисахариды группы каррагинана, установлено, что различия в полисахаридном составе, которые прежде пытались связать с условиями обитания или возрастом, на самом деле объясняются очень резкой разницей в содержании отдельных фракций каррагинанов в гаметофитах и спорофитах [6—10]. Для водорослей, содержащих агар, подобные сведения пока отсутствуют. В то же время такие данные представляют значительную ценность при разработке способа культивирования водоросли. Поэтому настоящая работа посвящена сравнительному анализу полисахаридного состава упомянутых выше форм развития *G. verrucosa*.

Водоросли были собраны в начале вегетационного периода осенне-зимнего поколения в Японском море и разделены на генерации. Полученные пять образцов водоросли (природная смесь, три генерации и ювенильная форма) подвергались далее одинаковой обработке: фиксации, сушке, измельчению, удалению пигментов и, наконец, экстракции полисахаридов горячей водой. Содержащийся в экстрактах агар очищали замораживанием — оттаиванием [11], а остающиеся при этом в маточном растворе кислые и нейтральные негелеобразующие полисахариды разделяли с помощью осаждения цетавлоном [12]. Выходы и моносахаридный состав полученных полисахаридных фракций приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, содержание агара в трех формах зрелых водорослей (образцы 2—4) близко к 35%, в то время как молодые стерильные водоросли дают вдвое меньший выход агара; наличием ювенильных растений в смеси объясняется, очевидно, пониженный выход агара из образца 1. Интересно, что для кислых негелеобразующих полисахаридов наблюдается обратная картина, а именно резко повышенный выход этой фракции для стерильной формы. Суммарное содержание двух этих фракций — агара и кислых полисахаридов — практически постоянно для всех образцов водоросли и составляет ~40%. Содержание нейтральных полисахаридов приблизительно на порядок ниже, их наибольший выход наблюдается при экстракции стерильной формы.

Анализ моносахаридного состава выделенных фракций показал, что препараты агара и кислых полисахаридов представляют собой галактаны, тогда как главным компонентом нейтральной негелеобразующей фракции

Таблица 2

Состав гелеобразующих и негелеобразующих полисахаридов из
Gracilaria verrucosa

Номер образца	Полисахарид	Содержание, %		
		галактоза *	3,6-ангидрогалактоза	SO ₃ Na
1	Агар	49,0	22,8	6,0
	Кислый галактан	42,3	13,3	9,5
	Кислый галактан, обработанный щелочью	40,6	26,0	1,7
5	Агар	49,7	23,1	7,4
	Кислый галактан	37,7	15,5	11,6
	Кислый галактан, обработанный щелочью	36,7	26,1	2,1

* В сумме с 6-О-метилгалактозой.

является глюкан — по всей вероятности, флоридный крахмал. Гелеобразующий и негелеобразующий галактаны различаются количественным содержанием входящих в их состав компонентов — галактозы, 3,6-ангидрогалактозы и сульфата (табл. 2). Обработка кислого негелеобразующего галактана щелочью в присутствии боргидрида натрия [13] сопровождается отщеплением значительной части сульфатных групп (занимающих, очевидно, положения 6 в 4-замещенных остатках галактозы) и одновременным образованием остатков 3,6-ангидрогалактозы, в результате чего состав такого модифицированного полисахарида приближается к составу гелеобразующей фракции.

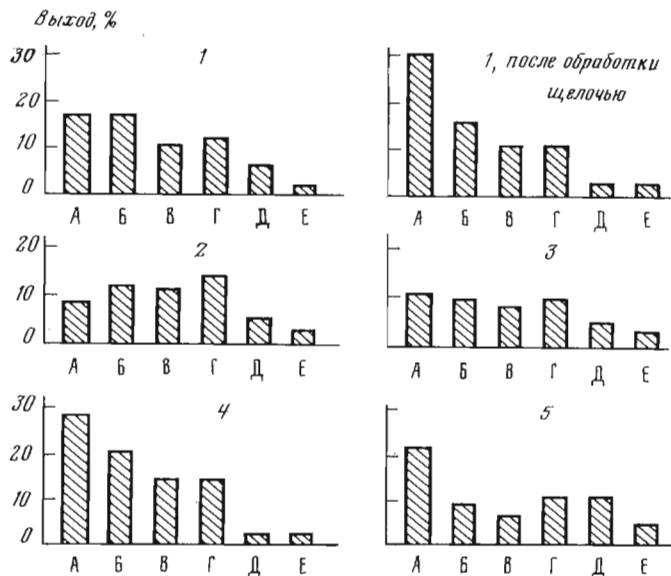
Как известно [14], природный агар представляет собой достаточно сложный полисахаридный комплекс, в котором лишь часть молекул отвечает по структуре агарозе, т. е. имеет линейное строение со строго чередующимися остатками 3-замещенной β-D-галактопиранозы и 4-замещенной 3,6-ангидро-α-L-галактопиранозы. Другие молекулы могут отличаться от агарозы наличием остатков 6-сульфата L-галактозы вместо части остатков 3,6-ангидро-L-галактозы, остатков 6-О-метил-D-галактозы вместо части остатков D-галактозы, наличием сульфатных или О-метильных групп в других положениях или кеталей пировиноградной кислоты в 4,6-м положении 3-замещенных остатков D-галактозы. Большинство отклонений такого рода от структуры агарозы приводит к ослаблению гелеобразующих свойств, которые в ряде случаев удается улучшить путем упоминавшейся выше обработки щелочью.

Результаты количественного определения основных моносахаридов и сульфата во всех пяти образцах агаров до и после щелочной обработки приведены в табл. 3. Из этих данных следует, что разные генерации водоросли дают полисахариды, которые мало различаются по составу; можно отметить лишь, что содержание 6-О-метилгалактозы в агаре из стерильной формы вдвое ниже, чем в остальных образцах. Щелочная обработка во

Таблица 3

Состав и свойства агаров, полученных из различных генераций
Gracilaria verrucosa

Номер образца	Молярные соотношения галактоза — β-О-метилгалактоза — 3,6-ангидрогалактоза — SO ₃ Na	Модуль упругости геля, Н/м ²	Номер образца	Молярные соотношения галактоза — 6-О-метилгалактоза — 3,6-ангидрогалактоза — SO ₃ Na	Модуль упругости геля, Н/м ²
				После обработки щелочью	
1	1 : 0,23 : 0,64 : 0,23	415	1	1 : 0,30 : 0,91 : 0,10	1940
2	1 : 0,25 : 0,68 : 0,22	595	2	1 : 0,26 : 0,90 : 0,13	2480
3	1 : 0,26 : 0,63 : 0,23	780	3	1 : 0,27 : 0,89 : 0,10	2640
4	1 : 0,26 : 0,68 : 0,20	980	4	1 : 0,32 : 1,04 : 0,05	2555
5	1 : 0,13 : 0,59 : 0,26	365	5	1 : 0,15 : 0,78 : 0,10	1780



Фракционирование образцов агаров из *Gracilaria verrucosa* на DEAE-сефадексе А-50 (СI-форма). Фракции получены при промывании колонки водой (А) и далее 0,2 (Б), 0,5 (В), 1 (Г), 2 (Д) и 3 М (Е) растворами NaCl

всех случаях приводит к снижению содержания сульфата и соответствующему возрастанию количества 3,6-ангидрогалактозы. К данным табл. 3 следует добавить, что в полученных образцах агаров остатки пировиноградной кислоты практически отсутствуют; судя по количеству азота, препараты содержат 3–6% белка.

Гелеобразующие свойства агаров определяются главным образом соотношением фракций агарозы и сульфатированных компонентов в данном препарате. Для определения этого соотношения мы провели фракционирование гелеобразующих полисахаридов методом ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе [14]. Этот метод уже использовался ранее для сравнения между собой полисахаридов, получаемых из различных видов *Gracilaria* [15], однако агар из *G. verrucosa* проанализирован не был. Полученные нами результаты показаны в виде диаграмм (рисунок), дающих наглядное представление о соотношении фракций с разной степенью сульфатирования в различных препаратах гелеобразующих полисахаридов (некоторое количество сульфатированных фракций теряется при фракционировании за счет необратимой адсорбции на ионообменнике [14]). Из рисунка следует, что по фракционному составу агара генерации *G. verrucosa* различаются не столь сильно, как исследованные ранее виды *Gracilaria* [15]. Самое высокое содержание агарозы найдено в образце 4; аналогичную диаграмму дает образец 1 после его обработки щелочью, что приводит к почти двукратному увеличению содержания нейтральной фракции по сравнению с исходным препаратом.

Несмотря на близость моносакхаридного состава, образцы агаров из разных генераций водоросли заметно различаются по гелеобразующим свойствам. Прочность гелей мы оценивали, определяя модуль упругости [16] (эта величина для коммерческого бакто-агара Дифко составила 3100 Н/м²). Как видно из табл. 3, наивысший модуль упругости имел образец 4, что находится в соответствии с данными о максимальном содержании в нем фракции агарозы (рисунок); однако в других образцах прямой корреляции между содержанием нейтральной фракции и величиной модуля упругости геля не наблюдается. После обработки щелочью вели-

чина модуля упругости гелей, полученных из всех полисахаридов, возрастает в 3—5 раз и для образцов 2—4 достигает ~ 2500 Н/м².

Таким образом, по количеству, составу и свойствам агара различные генерации *G. verrucosa* достаточно близки между собой; только стерильная форма дает агар с меньшим выходом и несколько худшего качества. По аналогии с наблюдением, что ювенильные гаметофиты некоторых видов *Gigartina* содержат не κ -каррагинан, как зрелые растения, а его биогенетический предшественник — μ -каррагинан [17], можно полагать, что галактан ювенильной *G. verrucosa* представляет собой «биогенетически незавершенный» агар. По мере развития водоросли в нем должны происходить структурные изменения (сульфатирование С-6 остатков *L*-галактозы с последующим замыканием 3,6-ангидроциклов и метилирование С-6 остатков *D*-галактозы), ведущие к увеличению относительного содержания гелесобразующей фракции и возрастанию прочности агарового геля. Важный в практическом отношении вывод из данной работы состоит в том, что для культивирования вполне пригодна природная смесь генераций, но сбор урожая необходимо проводить лишь после образования водорослями органов размножения. В процессе выделения полисахаридов целесообразно применять обработку щелочью для улучшения гелеобразующих свойств получаемого агара, как это рекомендовано, например, при производстве агара из *G. foliifera* [18].

Экспериментальная часть

Гидролиз полисахаридов проводили 2 н. H_2SO_4 при 100° в течение 4 ч с последующей нейтрализацией $CaCO_3$. ВХ гидролизатов выполняли следующим способом на бумаге Filtrak FN 11 в системе растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1; зоны моносахаридов обнаруживали анилинфталатом. Соотношение галактозы и 6-О-метилгалактозы определяли методом ГЖХ в виде ацетатов альдонитрилов [19] на хроматографе Руч 104 с пламенно-ионизационным детектором, колонка 0,6 × 120 см с 3% полинеопентилгликольадипината на диатомите С, 220° С, скорость N_2 50 мл/мин. Содержание 3,6-ангидрогалактозы определяли по реакции с резорцином и HCl [20], суммарное содержание галактозы и 6-О-метилгалактозы — по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 [21] с поправкой на содержание 3,6-ангидрогалактозы, сульфат — турбидиметрически по методу Доджсона [22], пировиноградную кислоту — по реакции с лактатдегидрогеназой [23].

Предварительная обработка водорослей. *G. verrucosa* собрана 13.09.77 г. в Амурском заливе Японского моря. Отделение женского гаметофита с карпоспорифитом от остальных генераций проводили визуально (цистоспоры *G. verrucosa* достигают 1,5—2 мм в диаметре и хорошо видны невооруженным глазом). Разделение тетраспорофита и мужского гаметофита (аптеридиальной формы) проводили под биноклем МБС-I при небольшом увеличении. Стерильную форму отбирали, исследуя срезы водоросли под микроскопом МБИ-II. Полученные образцы водорослей заливали ацетоном, затем сушили на воздухе, измельчали до частиц размером менее 0,25 мм, обрабатывали метанолом в аппарате Сокслета и снова высушивали на воздухе.

Выделение полисахаридов. 10 г водоросли в 500 мл воды перемешивали при 100° С в течение 3 ч, горячую суспензию центрифугировали и осадок повторно обрабатывали в тех же условиях 500 мл воды. Объединенные экстракты замораживали, затем оттаивали и полученный гель дважды очищали замораживанием — оттаиванием, растворяя в 500 мл дистиллированной воды. Очищенный гель тщательно промывали ацетоном и высушивали в вакууме над P_2O_5 . К маточным растворам прибавляли 10% раствор бромистого цетилтриметиламмония до полного выпадения осадка солей кислых полисахаридов, который отделяли, растворяли в 4 М NaCl, к раствору

прибавляли 3 объема спирта и выпавший осадок Na-солей кислых полисахаридов отделяли, растворяли в воде, диализовали и лиофилизовали. Маточный раствор после отделения осадка цетавлоновых солей кислых полисахаридов также диализовали, концентрировали и лиофилизовали, получали фракцию нейтральных полисахаридов. Выходы и моносахаридный состав фракций приведены в табл. 1.

Действие щелочи на полисахариды. 100 мг полисахарида растворяли при нагревании в 40 мл воды, охлаждали до 20° С, прибавляли 100 мг NaBH₄, через 24 ч прибавляли еще 150 мг NaBH₄ и 1,6 г NaOH, после чего нагревали 4 ч при 80° С. Охлажденную смесь осторожно нейтрализовали уксусной кислотой, диализовали, затем нагревали до полного растворения геля, горячий раствор центрифугировали и после отделения незначительного осадка концентрировали и лиофилизовали. Выходы модифицированных полисахаридов ~70%.

Фракционирование гелеобразующих полисахаридов на DEAE-сефадексе. Горячий раствор 500 мг полисахарида в 100 мл воды наносили на обогреваемую колонку, содержащую 250 мл DEAE-сефадекса А-50 (Cl⁻-форма) и нагретую до 60° С. Колонку промывали при этой температуре водой и растворами NaCl 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 и 3,0 М до полного вымывания каждой фракции (контроль по реакции элюата с фенолом и конц. H₂SO₄). Полученные элюаты концентрировали, диализовали и лиофилизовали. Выходы фракций представлены на рисунке.

Определение модуля упругости гелей. 1%-ные растворы полисахаридов готовили, перемешивая навеску агара в воде при нагревании на кипящей водяной бане в течение 0,5–1 ч. Растворы помещали в нагретые до 75° С металлические разъемные кюветы (по 2–3 для каждого раствора) с фторопластовыми вкладышами, позволяющими получить гладкую поверхность геля. Кюветы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 2–3 мин, выдерживали 4–5 ч при 20° С и оставляли на ночь при 50° С. Испытания лучших гелей проводили на приборе Instron (Англия) в следующем режиме: пенетрация полусферическим индентором с радиусом 5,5 мм при постоянной скорости деформации 0,05 см/мин, шкала нагрузок 0–10 г, температура 20° С, регистрация деформации с помощью самописца. Расчет модуля упругости проводили по формуле

$$G = 1,845 \cdot 10^4 \frac{P}{h},$$

где G — модуль упругости в Н/м², P — нагрузка на образец в г, h — коэффициент, учитывающий деформацию образца при нагрузке, выбранной для расчета [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И., Барбакадзе В. В., Яроцкий С. В., Шашков А. С. (1978) Биоорган. химия, 4, 1507–1512.
2. Sand R. E., Glickman M. (1973) in: Industrial Gums (Whistler R. L., ed.), pp. 165–175, Acad. Press, N. Y.—San Francisco—London.
3. Kim D. H. (1970) Bot. marina, 13, 140–162.
4. Маклюкко В. Ф. (1979) Тр. ВНИРО, 138, 51–59.
5. Clingman A. L., Nunn J. R., Stephen A. M. (1957) J. Chem. Soc., 197–203.
6. Chen L. C.-M., McLachlan J., Neish A. C., Shacklock P. F. (1973) J. Mar. Biol. Ass. U. K., 53, 11–16.
7. McCandless E. L., Craigie J. S., Walter J. A. (1973) Planta, 112, 201–212.
8. Pickmere S. E., Parsons M. J., Bailey R. W. (1973) Phytochemistry, 12, 2441–2444.
9. McCandless E. L., Craigie J. S., Hansen J. E. (1975) Can. J. Bot., 53, 2315–2318.
10. Waaland J. R. (1975) Phytochemistry, 14, 1359–1362.
11. Бемиллер Дж. Н. (1967) в сб.: Методы химии углеводов, пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К., с. 314–317, «Мир», М.
12. Скотт Дж. Е. (1967) в сб.: Методы химии углеводов, пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К., с. 288–293, «Мир», М.
13. Rees D. A. (1961) J. Chem. Soc., 5168–5171.
14. Duckworth M., Yaphe W. (1971) Carbohydr. Res., 16, 189–197.
15. Duckworth M., Hong K. C., Yaphe W. (1971) Carbohydr. Res., 18, 1–9.

16. Bikbov T. M., Grinberg V. Ya., Tolstoguzov V. B. (1979) *Nahrung*, **23**, 403-408.
17. Pickmere S. E., Parsons M. J., Bailey R. W. (1975) *New Zealand J. Sci.*, **18**, 585-590.
18. Matsuhashi T., Hayashi K. (1972) *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1543-1552.
19. Dmitriev B. A., Backinowsky L. V., Chizhov O. S., Zolotarev B. M., Kochetkov N. K. (1971) *Carbohydr. Res.*, **19**, 432-435.
20. Yaphe W., Arsenault G. P. (1965) *Anal. Biochem.*, **13**, 143-148.
21. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
22. Dodgson K. S., Price R. G. (1962) *Biochem. J.*, **84**, 106-110.
23. Duckworth M., Yaphe W. (1970) *Chem. and Ind.*, 747-748.

Поступила в редакцию
23.IV.1979

**POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXIX. AGAR COMPOSITION
IN DIFFERENT GENERATIONS OF *GRACILARIA
VERRUCOSA* (HUDS.) PAPANF.**

USOV A. I., IVANOVA E. G., MAKIENKO V. F.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;
Pacific Ocean Research Institute of Marine Fisheries
and Oceanography (TINRO), Vladivostok*

The polysaccharide content in relation to different life cycle stages of the red seaweed *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papanf. (species of interest for mariculture) was studied. Fertile weeds (tetrasporophyte, male and female gametophytes) were shown to have no considerable differences in the yield, fractionation pattern or properties of agar. On the contrary, sterile (juvenile) plants gave agar with lower yield and quality. The gel-forming properties of agar preparations may be substantially improved by treatment with alkali under controlled conditions.
