



УДК 547.458.7.02+582.273

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРОСЛЕЙ.

XXXI *. ФЕРМЕНТАТИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ АГАРОПОДОБНОГО
ПОЛИСАХАРИДА ИЗ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ
RHODOMELA LARIX (TURN.) C. AG.

Усов А. И., Иванова Е. Г.

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

Изучено расщепление гелеобразующего полисахарида из *Rhodomela larix* под действием β -агаразы. Показано, что в результате ферментативного гидролиза около половины исходного материала превращается в смесь нейтральных олигосахаридов, главными компонентами которой являются неоагаробиоза, неоагаротетраоза и их аналоги, содержащие 2-О-метильную группу в остатке 3,6-ангидро-*L*-галактозы. Получены сведения о составе и строении фракции сульфатированных олигосахаридов и высокомолекулярной фракции, также образующихся в результате ферментативного расщепления полисахарида.

Экстракция водоросли *Rhodomela larix* горячей водой дает два полисахарида — гелеобразующий галактан (А) с низкой степенью сульфатирования и более высоко сульфатированный негелеобразующий галактан (Б). Несмотря на разницу в физических свойствах, эти два полисахарида сходны по моносакхаридному составу [2], оба они при частичном метанолизе дают производные агаробиозы [3] и, следовательно, относятся к группе агара (см. обзор [4]). Различия между этими веществами сводятся главным образом к содержанию остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы и сульфатных групп. Данная работа посвящена изучению строения гелеобразующего полисахарида А с помощью ферментативного расщепления.

Гидролиз агара под действием бактериальной β -агаразы был впервые изучен Араки и Араи [5, 6], которые из гидролизата агарозы выделили и идентифицировали олигосахариды ряда неоагаробиозы. Тем самым было установлено, что ферменты этого типа специфически гидролизуют β -*D*-галактозидные связи в участках молекул агароподобных полисахаридов, построенных из регулярно чередующихся остатков 3-замещенной β -*D*-галактозы и 4-замещенной 3,6-ангидро-*L*-галактозы, так что образующиеся олигосахариды состоят из четного числа моносакхаридных остатков с *D*-галактозой на восстанавливающем и 3,6-ангидро-*L*-галактозой на невосстанавливающем конце. Позже действие β -агаразы использовалось для получения информации о структуре порфирана [7, 8]. Оказалось, что сульфатные группы препятствуют ферментативному гидролизу ближайших β -*D*-галактозидных связей. В работе Дакуорта и Яфе [9] описано применение ферментативного расщепления для исследования не только нейтральных, но и заряженных участков молекул агароподобных полисахаридов, содержащих 1-карбокситилиденовые или сульфатные группы. Мы использовали ряд экспериментальных приемов, рекомендованных в этой последней работе.

* Сообщение XXX см. [1].

При действии агаразы на гелеобразующий галактан А из *R. larix* при 37° С гидролиз заканчивается через 72 ч и приводит к разрыву ~10% гликозидных связей. Смесь продуктов гидролиза разделяли на три фракции: полимерный остаток (I) осаждали прибавлением к раствору 3 объемов этанола, а остающиеся в супернатанте олигосахариды освобождали от солей гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-10 и далее с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефадексе А-25 (Cl⁻-форма) получали кислую (II) и нейтральную (III) фракции олигосахаридов. Выходы и моносахаридный состав этих фракций, а также состав исходного полисахарида А и (для сравнения) кислого негелеобразующего полисахарида Б представлены в табл. 1.

Основным продуктом ферментативного расщепления является фракция III нейтральных олигосахаридов (44,5%). Эту фракцию разделяли гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-25 на пять зон (рис. 1, табл. 2). Компоненты зон 1 и 2 (высшие олигосахариды), а также зоны 5 (по данным БХ — галактоза) далее не исследовались, тогда как олигосахариды зон 3 и 4 были выделены препаративной хроматографией на бумаге.

В соответствии с высоким содержанием в полисахариде А, наряду с 3,6-ангидро-*L*-галактозой, ее 2-О-метилпроизводного [2, 3], при ферментативном гидролизе образуются два дисахарида (схема): неоагаробиоза (IV) и 2-О-метил-3,6-ангидро- α -*L*-галактопиранозил-(1→3)-*D*-галактопираноза (V). Оба вещества содержались в зоне 4 и после препаративной БХ были получены в индивидуальном состоянии. Константы неоагаробиозы удовлетворительно совпали с описанными в литературе [5, 6]; дисахарид (V), насколько нам известно, получен впервые. Строение дисахаридов было подтверждено следующим образом: боргидридным восстановлением показано, что на восстаивающемся конце обоих соединений расположен остаток галактозы. При окислительном гидролизе по методу [10] из дисахарида (IV) была получена 3,6-ангидрогалактоновая кислота, а из (V) — 2-О-метил-3,6-ангидрогалактоновая кислота, идентифицированные сравнением с заведомыми образцами по БХ.

Из зоны 3 были выделены два тетрасахарида (табл. 2), строение которых установлено на основании хроматографической подвижности, анализа моносахаридного состава до и после боргидридного восстановления и окислительного гидролиза. Менее подвижный тетрасахарид оказался неоагаротетраозой (VI), а второе вещество — ее 2²-О-метилизированным (VII). Положение этой метильной группы доказано результатами частичного метанолиза соединения (VII), в продуктах которого найден диметилацеталь 2-О-метилагаробиозы. Эти данные не позволяют, однако, утверждать, что препарат (VII) не содержит в качестве примеси некоторого количества изомерного тетрасахарида с метильной группой в другом остатке 3,6-ангидро-*L*-галактозы.

Таким образом, при действии агаразы на гелеобразующий галактан А из *R. larix* около половины исходного материала превращается в набор нейтральных олигосахаридов ряда неоагаробиозы, в котором главной является тетрасахаридная фракция. Следовательно, участки молекул поли-

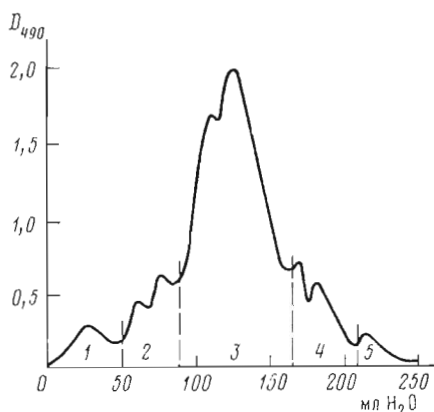


Рис. 1. Гель-фильтрация смеси нейтральных олигосахаридов (300 мг) на колонке (4×45 см) с сефадексом G-25. Анализ фракций реакцией с фенолом и H₂SO₄. Пунктиром показано разделение элюата на 5 зон

Состав полисахаридов из *R. larix* и продуктов ферментативного расщепления полисахарида А

Вещество	Степень ферментативного гидролиза, %	Выход, %	D-Gal, %	L-Gal, %	L-3,6-AnGal, % *	Мольное отношение D : L	SO ₃ Na, %	Привитоград-ная криво-линия, %
Гелеобразующий галактан (А)	10,0	—	43,2	4,0	33,6	1 : 0,97	6,4	0,13
Негелеобразующий галактан (Б)	0,5	—	31,8	18,4	8,0	1 : 0,86	20,6	0,50
Кислая высокомолекулярная фракция (I)	1,8	11,5	28,0	17,7	5,7	1 : 0,86	20,1	0,53
Фракция кислых олигосахаридов (II)	—	26,0	38,9	2,7	28,6	1 : 0,90	13,2	0,27
Фракция нейтральных олигосахаридов (III)	—	44,5	—	—	42,7	—	0,0	—

* 3,6-Ангидро-L-галактоза вместе с ее 2-О-метилпроизводным.

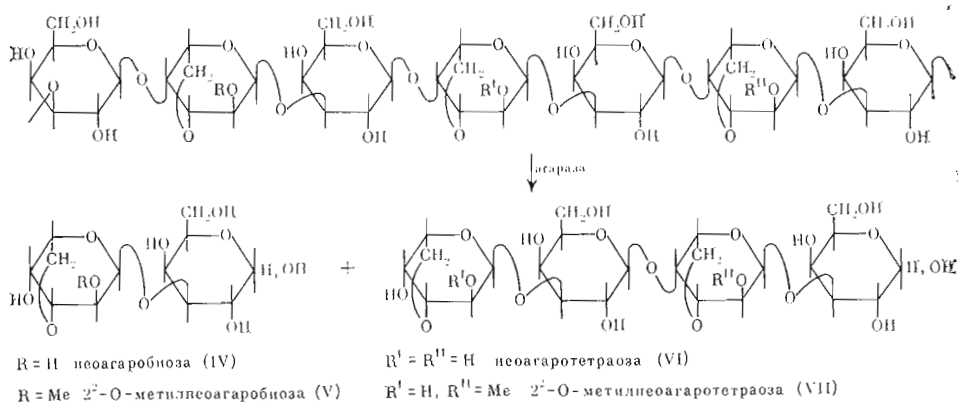
Таблица 2

Характеристика нейтральных олигосахаридов, выделенных из фракции III

Зона при гель-хроматографии (рис. 1)	Выход, % от фракции III	R _{Gal} (система 1)	Вещество	Константы
1	15,0	0,10; 0,15; 0,27; 0,35	Неоагаротетраоза (VI)	Т. пл. 198–200° С, $[\alpha]_D^{20} -3,7^\circ \rightarrow -5,6^\circ$ (24 ч, с 0,6, вода). Лит. [6]: т. пл. 214–218° С (разл.), $[\alpha]_D -3,9^\circ$ (вода) $[\alpha]_D^{21} -1,9^\circ$ (с 0,5, вода)
2	13,3	0,42; 0,46; 0,54		
3	48,3	0,80		
4	11,7	1,30	2 ² -О-Метил-неоагаротетраоза (VII) Неоагаробиоза (IV)	Т. пл. 190–192° С, $[\alpha]_D^{21} +33,6^\circ \rightarrow +25,2^\circ$ (24 ч, с 0,7, вода). Лит. [5]: т. пл. 207–208° С, $[\alpha]_D +34,4^\circ \rightarrow +20,3^\circ$ (вода) $[\alpha]_D^{20} +23,5^\circ \rightarrow +17,4^\circ$ (24 ч, с 1,3, вода)
		1,50	2 ² -О-Метил-неоагаробиоза (V)	
5	5,0	1,00	Галактоза	

сахарида, которые подвергаются такому расщеплению, по структуре сходны с агарозой. Разница заключается лишь в том, что наличие в полисахариде А остатков 2-О-метил-3,6-ангидро-L-галактозы приводит к более сложному набору олигосахаридов, в котором наряду с неоагаробиозой и ее олигомергомологами находятся еще и аналоги этих веществ, метилированные по С2-гидроксильной группе остатков 3,6-ангидро-L-галактозы. Однако эта особенность полисахарида, по-видимому, не сказывается существенно на ходе ферментативного расщепления.

Выше уже упоминалось, что наряду с нейтральными олигосахаридами из продуктов ферментативного гидролиза была выделена фракция II кислых олигосахаридов. Выход фракции II составил приблизительно четвертую часть исходного материала. Моносахаридный состав этой фракции не очень сильно отличается от состава полисахарида А, но содержание сульф-



Ферментативное расщепление нейтральных участков молекулы полисахарида А

фата в ней увеличено более чем вдвое и соответствует одному остатку серной кислоты на тетрасахаридный фрагмент (табл. 1). Поскольку сульфатные группы препятствуют расщеплению ближайших галактозидных связей под действием агаразы, можно предположить, что средняя степень полимеризации фракции II должна быть существенно выше, чем фракции III. Разделение такой смеси сульфатированных олигосахаридов на индивидуальные компоненты является чрезвычайно сложной задачей. В работе, специально посвященной анализу продуктов ферментации агара [11], удалось найти условия удовлетворительного хроматографического разделения только для нейтральных фрагментов и кислых олигосахаридов, содержащих остатки пировиноградной кислоты (присоединенные 4,6-кетальной связью к 3-замещенным остаткам галактозы), но не для сульфатированных олигосахаридов. В нашем случае содержание кеталей пировиноградной кислоты в олигосахаридах невелико (исходный полисахарид А содержит всего 0,13% пирувата). В соответствии с этим при ТСХ на порошкообразной целлюлозе в системе 1 (см. «Экспериментальную часть») [11] фракция II дает несколько зон (R_{Gal} 0,77; 0,60; 0,43), которые могут соответствовать пируватосодержащим олигосахаридам, но главная часть вещества обладает меньшей подвижностью, свойственной сульфатированным олигосахаридам. Электрофорез на бумаге при pH 6,0 или 2,0 выявляет во фракции III несколько зон, каждая из которых, по данным БХ, в свою очередь является смесью 3–4 соединений.

Из этих данных следует, что фракция II представляет собой сложную смесь сульфатированных олигосахаридов, различающихся по плотности заряда, а также, вероятно, по степени полимеризации и соотношению остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы и ее 2-О-метилпроизводного. Мы попытались получить данные о строении кислых олигосахаридов без выделения индивидуальных соединений. Об агароподобной структуре углеводной цепи этих олигосахаридов свидетельствует спектр ^{13}C -ЯМР* (рис. 2), во многом напоминающий приведенный в литературе [12] спектр неоагаротетраозы. В области резонансов аномерных атомов углерода (90–105 м.д.) наблюдаются сигналы концевого восстанавливающего остатка *D*-галактозы (C-1 α , 92,9 м.д. и C-1 β , 96,9 м.д.), концевого невосстанавливающего остатка 3,6-ангидро-*L*-галактозы (98,2 м.д.) и расположенных в цепи остатков *D*-галактозы (102,5 м.д.), 3,6-ангидро-*L*-галактозы (98,4 м.д.) и ее 2-О-метилпроизводного (98,7 м.д.). Соотношение интенсивностей этих сигналов позволяет определить среднюю степень полимеризации смеси сульфатированных олигосахаридов, рав-

* Авторы приносят глубокую благодарность канд. хим. н. А. С. Шашкову за получение спектров ^{13}C -ЯМР и большую помощь в их интерпретации.

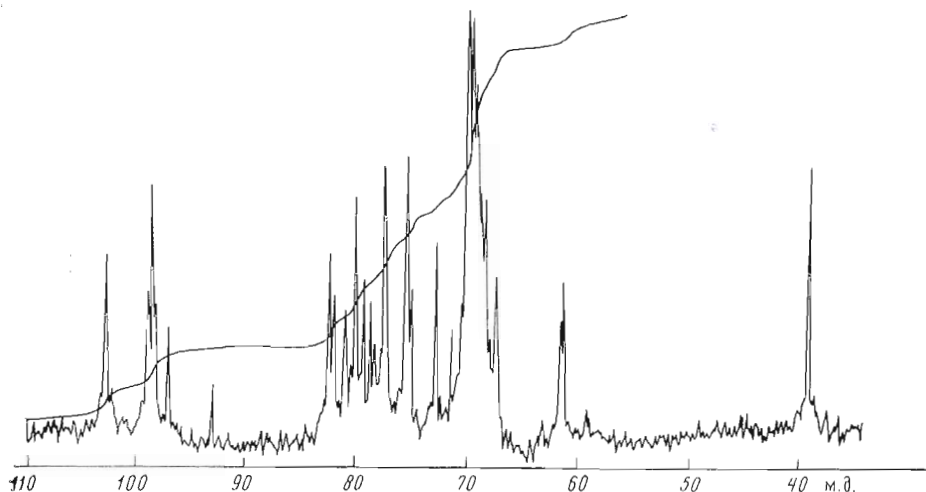


Рис. 2. Спектр ^{13}C -ЯМР смеси кислых олигосахаридов фракции II, полученных при ферментативном гидролизе полисахарида А из *R. larix* (температура съемки 60°C , количество накоплений 70 000)

ную 7. В остальной части спектра, пользуясь данными работы [13], легко найти сигналы всех остальных атомов углерода перечисленных выше типов моносахаридных остатков. Так, наиболее интенсивные сигналы при 70,1; 80,2; 77,6; 75,6 и 69,8 м.д. отвечают резонансу атомов С2—С6 находящихся в цепи 4-замещенных остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы, а сигналы при 70,1; 82,1; 69,8; 75,2 и 61,4 м.д. соответствуют атомам С2—С6 расположенных в цепи 3-замещенных остатков *D*-галактозы. В спектре имеется ряд сигналов небольшой интенсивности, отвечающих, по всей вероятности, атомам углерода, несущим сульфатные группы. Например, сигналы при 72,95 и 67,4 м.д. могут отвечать атомам С5 и С6 3-замещенных остатков 6-сульфата *L*-галактозы. Однако сделать однозначные выводы о расположении остатков сульфата только по спектру ^{13}C -ЯМР достаточно трудно.

Строение сульфатированных олигосахаридов было исследовано также методом метилирования. Фракцию II восстанавливали NaBH_4 , а затем метилировали по методу Куна [14]. Продукт метилирования гидролизовали, восстанавливали боргидридом натрия и ацетилировали; полученную смесь ацетатов частично метилированных дуглицитов анализировали с помощью ГЖХ и отдельные компоненты идентифицировали сравнением с заведомыми образцами и методом хроматомасс-спектрометрии. Для обнаружения производных 3,6-ангидрогалактозы применяли окислительный гидролиз метилированной фракции II. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы о строении сульфатированных олигосахаридов. Восстанавливающим концевым остатком в них является, очевидно, 3-О-замещенная галактоза, что подтверждается обнаружением 3-О-ацетил-1,2,4,5,6-пента-О-метилдуглицита среди производных полиолов. При окислительном гидролизе найдены только 2,4-ди-О-метил- и 2-О-метил-3,6-ангидрогалактоновая кислота, из чего следует, что остатки 3,6-ангидрогалактозы либо расположены на невозстанавливающем конце олигосахаридов, либо гликозилированы в положение 4, а сульфатные группы в положениях 2 этих остатков практически отсутствуют. Среди три-О-метилдуглицитов резко преобладает 2,4,6-три-О-метилпроизводное, которое происходит из остатков галактозы, гликозилированных в положение 3; содержание 2,3,6-три-О-метильного изомера мало и приблизительно соответствует наличию *L*-галактозы в составе фракции II (табл. 1). Среди ди-О-метилпроизводных основными являются 4,6-, 2,6- и 2,4-ди-О-метилдуглициты в соотношении

2 : 1 : 1. Очевидно, эти вещества происходят из остатков галактозы, гликозилированных в положение 3 и дополнительно сульфатированных в положение 2 (преимущественное), 4 и 6 соответственно. Такое расположение сульфатных групп обеспечивает их устойчивость к щелочи, что согласуется с данными о незначительном отщеплении сульфатных групп при обработке полисахарида А щелочным боргидридом [3]. Таким образом, данные метилирования не противоречат представлению о том, что олигосахариды фракции II имеют углеводные цепи, построенные по обычному типу агароподобных полисахаридов, но защищенные от дальнейшего ферментативного расщепления наличием сульфатных групп и, вероятно, частичным нарушением регулярности за счет включения остатков 4-замещенной *L*-галактозы вместо 3,6-ангидро-*L*-галактозы.

Интересно образование при ферментализе высокомолекулярной фракции I. Вещество этой фракции слабо атакуется ферментом при повторной обработке и по составу сильно отличается от исходного полисахарида А, зато весьма близко к пегелеобразующему галактану Б (табл. 1). Сходство фракции I и полисахарида Б прослеживается и по данным гель-хроматографии этих полимеров, и при анализе их спектров ¹³C-ЯМР. Хотя спектры слишком сложны и не могут быть полностью интерпретированы, в них имеются группы сигналов, соответствующие фрагментам агароподобной структуры (ср. [13]). Предположение о том, что препарат полисахарида А содержит примесь полисахарида Б, опровергается данными повторного фракционирования полисахарида А до обработки ферментом, при котором не удалось получить дополнительных количеств полисахарида Б. По всей вероятности, фрагменты молекул полисахарида А, дающие фракцию I в результате ферментативного гидролиза, химически связаны с участками молекул, чувствительными к действию агаразы.

Таким образом, гелеобразующий полисахарид А из *R. larix* можно считать своеобразным представителем полисахаридов группы агара, молекулы которого имеют блочное строение: примерно наполовину они состоят из участков, структура которых совпадает со структурой агаразы (с точностью до *O*-метильных групп при С2 остатков 3,6-ангидро-*L*-галактозы); устойчивые к агаразе участки молекул, отличающиеся от агаразы наличием сульфатных групп или остатков *L*-галактозы вместо 3,6-ангидро-*L*-галактозы, имеют размеры как сравнительно коротких, так и достаточно протяженных цепей.

Экспериментальная часть

Аналитическую БХ выполняли нисходящим способом на бумаге «Filtrak FN-11» (ГДР) в системах растворителей бутанол-1 — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 2 (система 1), бутанол-1 — пиридин — вода, 6 : 4 : 3 (система 2), этилацетат — уксусная кислота — муравьиная кислота — метилэтилкетон — вода, 17 : 3 : 1 : 15 : 5 (система 3). Препаративную БХ проводили на бумаге «Filtrak FN-18» в системе 2. Электрофорез выполняли на бумаге «Filtrak FN-11» в 0,1 М пиридиний-ацетатном буфере, рН 6,0, при 28 В/см или в 0,1 М формиатно-ацетатном буфере, рН 2,0, при 33 В/см. Восстанавливающие сахара на бумаге обнаруживали анилинфталатом, 3,6-ангидросахара — *o*-аминофенольным реагентом [15], альдоновые кислоты — анилином с ксилозой. ТСХ проводили на пластинках с целлюлозным порошком «Ватман СС41» в системе 1; вещества обнаруживали нафторезорциновым реагентом [11].

ГЖХ проводили на хроматографе «Руе 104» (Англия), колонки с 3% SE-30 на диатомите С при 250° С (условия 1) и с 3% полинеопентилгликольдипината на диатомите С при 205° С (условия 2); скорость азота 50 мл/мин. Хроматомасс-спектрометрию проводили на приборе «Varian MAT 111»; масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Varian MAT СН-6». Спектры ¹³C-ЯМР получали на спектрометре «Bruker-Physik WP-60»

для 5% растворов веществ в D_2O с диметилсульфоксидом в качестве внутреннего стандарта (ср. [16]). Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin-Elmer 141».

Общее содержание сахаров определяли по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 [17], 3,6-ангидросахаров — по реакции с резорцином и HCl [18], сульфата — турбидиметрическим методом по Доджсону [19], пировиноградной кислоты — после кислотного гидролиза по реакции с лактацдегидрогеназой [20], а *D*-галактозы — по реакции с *D*-галактозооксидазой [21].

Полисахариды А и Б получали из водоросли *R. larix*, как описано ранее [3].

Ферментативное расщепление полисахарида А. Полисахарид А (2,0 г) растворяли в 200 мл воды при нагревании на кипящей водяной бане, раствор охлаждали до 37° С и прибавляли 150 мг агаразы (Calbiochem) и несколько капель толуола. Смесь инкубировали 72 ч при 37° С до постоянного значения восстанавливающей способности, определяемой по реакции с динитросалициловым реагентом [22]. Затем реакционную смесь нагревали 30 мин при 100° С, концентрировали до 150 мл, фильтровали и выливали в 3 объема спирта. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали спиртом и высушивали, получали фракцию I с выходом 0,23 г. Маточный раствор упаривали, сироп (1,8 г) растворяли в небольшом объеме воды, прибавляли несколько кристаллов $NaCl$ и наносили на колонку (2×46 см) с сефадексом G-10, которую промывали водой. Фракции по 5 мл контролировали на присутствие сахаров и хлор-иона, смешанные фракции упаривали и подвергали повторной хроматографии на той же колонке. Фракции, содержащие сахара и свободные от солей, объединяли, упаривали, получали сироп (выход 1,56 г), который растворяли в воде и наносили на колонку (3×40 см) с DEAE-сефадексом A-25 (Cl^- -форма). Колонку промывали водой до отрицательной реакции на сахара (0,5 л), элюат концентрировали и лиофилизовали, получали фракцию III с выходом 0,89 г. Затем колонку промывали 0,5 л 2 н. $NaCl$, элюат концентрировали, олигосахариды отделяли от солей на колонке с сефадексом G-10, как описано выше, и раствор лиофилизовали, получали фракцию II с выходом 0,52 г. Состав фракций I—III см. в табл. 1.

Выделение и характеристика нейтральных олигосахаридов из фракции III. Раствор 300 мг фракции III в небольшом объеме воды наносили на колонку (4×45 см) с сефадексом G-25, промывали водой и отбирали 85 фракций по 3 мл (рис. 1). Полученный элюат разделяли на 5 зон, упаривали и анализировали методом БХ. Препаративной БХ из третьей и четвертой зон выделяли олигосахариды (IV)–(VII), константы которых приведены в табл. 2. Образцы олигосахаридов (5 мг) восстанавливали $NaNH_2$; после их жесткого гидролиза (2 н. H_2SO_4 , 100° С, 4 ч) методом БХ обнаруживали галактозу. После такого же гидролиза восстановленных олигосахаридов (IV) и (V) обнаруживали дульцит, а после гидролиза олигосахаридов (VI) и (VII) — галактозу и дульцит. В результате окислительного гидролиза (0,5 н. H_2SO_4 , избыток Br_2 , 17 ч, 60° С по методу [10] с последующим жестким гидролизом) вещества (IV) и (VI) дали 3,6-ангидрогалактоновую кислоту (БХ в системе 3, R_f 0,30), вещество (V) — 2-О-метил-3,6-ангидрогалактоновую кислоту (R_f 0,48), а вещество (VII) — обе эти кислоты.

5 мг олигосахариды (VII) в 10 мл 0,5% HCl в абс. метаноле кипятили 2 ч, нейтрализовали $PbCO_3$, раствор упаривали, остаток переводили в триметилсилильные производные и исследовали ТЖХ в условиях 1, как описано в работе [3]. Сравнением с заведомыми образцами триметилсилильных производных диметилацеталей агаробиозы и 2¹-О-метилагаробиозы в исследуемой смеси обнаружено (наряду с производными моносахаридов) триметилсилильное производное диметилацетала 2¹-О-метилагаробиозы.

Метилирование фракции II. Фракцию II (250 мг) растворяли в воде, прибавляли избыток NaBH_4 и оставляли на ночь, затем нейтрализовали уксусной кислотой, упаривали, остаток растворяли в 50 мл сухого диметилформамида, прибавляли 10 г Ag_2O , 10 мл CH_3I и перемешивали 4 сут при 60°C , через каждые сутки прибавляли по 1 г Ag_2O . Далее реакционную смесь разбавляли 200 мл ацетона, осадок отфильтровывали, а раствор упаривали в вакууме. По данным ИК-спектра, в полученных метилированных олигосахаридах резко снижена интенсивность полосы поглощения гидроксильных групп. Часть вещества нагревали 6 ч с 2 н. H_2SO_4 при 100°C , нейтрализовали BaCO_3 , полученную смесь метилированных моносахаридов восстанавливали NaBH_4 , ацетиловали и исследовали ГЖХ [23] в условиях 2, применяя для идентификации сравнение с известными образцами и хроматомасс-спектрометрию [24]. Среди производных полиолов найдены ацетаты 1,2,4,5,6-пента-, 2,3,4,6-тетра- (небольшое количество), 2,3,6-три- (небольшое количество), 2,4,6-три- (главный компонент), 4,6-ди-, 2,6-ди- и 2,4-ди-О-метилдальциты.

При окислительном гидролизе метилированного препарата по методу, описанному выше, методом БХ в системе 3 сравнением с известными образцами идентифицированы 2-О-метил- и 2,4-ди-О-метил-3,6-аугидрогалактоновая кислота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И., Архипова В. С. Полисахариды водорослей. XXX. Метилирование полисахаридов типа κ -каррагинанов из красных водорослей *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr., *Furcellaria fastigiata* (Huds.) Lam. и *Phyllophora nervosa* (De Cand.) Grév.—Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 3, с. 385—390.
2. Усов А. И., Лотов Р. А., Кочетков П. К. Полисахариды водорослей. VII. Предварительное исследование полисахаридов красной водоросли *Rhodomela larix* (Turn.) C. Ag.—Ж. общ. химии, 1971, т. 41, с. 1154—1160.
3. Усов А. И., Иванова Е. Г. Полисахариды водорослей. XIX. Частичный метанолиз сульфатированных полисахаридов красной водоросли *Rhodomela larix* (Turn.) C. Ag.—Биоорганическая химия, 1975, т. 1, с. 665—671.
4. Усов А. И. Сульфатированные полисахариды красных морских водорослей.—Успехи биол. химии, 1979, т. 20, с. 169—191.
5. Araki C., Arai K. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XVIII. Isolation of a new crystalline disaccharide by enzymatic hydrolysis of agar-agar.—Bull. Chem. Soc. Japan, 1956, v. 29, p. 339—345.
6. Araki C., Arai K. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XX. Isolation of a tetrasaccharide by enzymatic hydrolysis of agar-agar.—Bull. Chem. Soc. Japan, 1957, v. 30, p. 287—293.
7. Duckworth M., Turvey J. R. The action of a bacterial agarase on agarose, porphyran and alkali-treated porphyran.—Biochem. J., 1969, v. 113, p. 637—642.
8. Duckworth M., Turvey J. R. The specificity of an agarase from a *Cytophaga* species.—Biochem. J., 1969, v. 113, p. 693—696.
9. Duckworth M., Yaphe W. The structure of agar. Part II. The use of a bacterial agarase to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar.—Carbohydr. Res., 1971, v. 16, p. 435—445.
10. Anderson N. S., Dolan T. C. S., Rees D. A. Carrageenans. Part III. Oxidative hydrolysis of methylated κ -carrageenan and evidence for a masked repeating structure.—J. Chem. Soc. (C), 1968, p. 596—601.
11. Duckworth M., Yaphe W. Thin-layer chromatographic analysis of enzymic hydrolysates of agar.—J. Chromatogr., 1970, v. 49, p. 482—487.
12. Hamer G. K., Bhattacharjee S. S., Yaphe W. Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by ^{13}C -n.m.r. spectroscopy.—Carbohydr. Res., 1977, v. 54, p. C7—C10.
13. Usov A. I., Yarolsky S. V., Shashkov A. S. ^{13}C -NMR spectroscopy of red algal galactans.—Biopolymers, 1980, v. 19, p. 977—990.
14. Kuhr R., Trischmann H., Löw J. Zur Permethylierung von Zuckern und Glykosiden.—Angew. Chem., 1955, B. 67, S. 32.
15. Hirase S., Araki C., Nakanishi S. New spraying reagent for the detection of reducing sugars on the paper chromatograms.—Bull. Chem. Soc. Japan, 1953, v. 26, p. 183—184.
16. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. Полисахариды водорослей. XXIV. Применение спектроскопии ^{13}C -ЯМР для анализа структуры полисахаридов группы агара.—Биоорганическая химия, 1978, т. 4, с. 74—81.
17. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.—Anal. Chem., 1956, v. 28, p. 350—356.

18. *Yaphe W., Arsenault G. P.* Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides.— *Anal. Biochem.*, 1965, v. 13, p. 143—148.
19. *Dodgson K. S., Price R. G.* A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides.— *Biochem. J.*, 1962, v. 84, p. 106—110.
20. *Duckworth M., Yaphe W.* Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides.— *Chem. and Ind.*, 1970, p. 747—748.
21. *Amaral D., Kelly-Falcoz F., Horecker B. L.* Galactose Oxidase of *Polyporus circinatus*.— In: *Methods in Enzymology*. New York and London: Acad. Press, 1966, v. IX, p. 87—92.
22. *Fischer E. H., Stein E. A.* Amylase from human saliva.— *Biochem. preparations*, 1961, v. 8, p. 27—29.
23. *Джонс Г. Дж.* Газожидкостная хроматография метилированных сахаров.— В кн.: *Методы исследования углеводов*. М.: Мир, 1975, с. 26—37.
24. *Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S.* Gasliquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides.— *Angew. Chem. (Internat. Edition)*, 1970, v. 9, p. 610—619.

Поступила в редакцию
23.XII.1980

**POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXXI. ENZYMIC HYDROLYSIS OF AGAR-LIKE
POLYSACCHARIDE FROM THE RED SEAWEED *RHODOMELA LARIX*
(TURN.) C. Ag.**

USOV A. I., IVANOVA E. G.

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

The action of β -agarase on the gel-forming polysaccharide from *Rhodomela larix* was studied. As a result about half of the starting material was transformed into the mixture of neutral oligosaccharides, the main components being neoagarobiose, neoagarotetraose and their analogs with 2-O-methyl group in the 3,6-anhydro-*L*-galactose residues. The composition and structure of sulfated oligosaccharides and of high-molecular weight fraction, isolated from the enzymolysis products, were also investigated.