



УДК 577.114.5:582.273

## ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ

XXXVI \*. СОСТАВ И СВОЙСТВА АГАРА ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЙ *Gracilaria* sp.

Усов А. П., Иванова Е. Г., Пржемянецкая В. Ф. \*

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

\*Тихоокеанский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии, Владивосток

Изучен полисахаридный состав двух генераций (тетраспорофита и карпоспорофита) *Gracilaria* sp., представителя красных морских водорослей, обнаруженного недавно в Амурском заливе Японского моря. Показано, что этот вид содержит гелеобразующие полисахариды, относящиеся к группе агара. Тетраспорофит дает агар с меньшим выходом, но с большей гелеобразующей способностью, чем карпоспорофит; прочность геля обоих образцов агара возрастает после обработки щелочью в контролируемых условиях. Полученные данные позволяют считать *Gracilaria* sp. перспективным объектом для искусственного культивирования.

Около 60% мирового производства агара обеспечивается за счет красных морских водорослей рода *Gracilaria* [2]. Наиболее широко распространенный вид *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf., произрастающий также и у берегов советского Дальнего Востока, считается весьма перспективным для культивирования в этом районе [3]. Сравнительному изучению образцов агара из различных генераций зрелой водоросли (гаметофита, тетраспорофита, карпоспорофита) и ювенильных талломов *G. verrucosa* посвящено одно из наших предыдущих сообщений [4]. Впоследствии при сборе массового материала для морфологического изучения *G. verrucosa* в Амурском заливе Японского моря был обнаружен другой вид грацилярии (*Gracilaria* sp.), слоевица которой более яркой окраски и крупного размера принимались раньше за обрывки слоевищ неприкрепленной формы *G. verrucosa* [3]. Помимо некоторых морфологических отличий от *G. verrucosa* этот вид показал в лабораторных экспериментах более высокую скорость роста (до 20% в сутки против 10–12% для *G. verrucosa*), что делает его предпочтительным для марикультуры при условии, что он, как и *G. verrucosa*, содержит агар высокого качества. Настоящая работа посвящена выделению и характеристике полисахаридов из отдельных генераций *Gracilaria* sp.

В природных популяциях *Gracilaria* sp. подобно *G. verrucosa* в середине – конце лета представлена смесью тетраспорофита и карпоспорофита, развившегося после оплодотворения на женском гаметофите. Ни мужского гаметофита, ни стерильных образцов в это время обнаружить не удается. Для изучения полисахаридного состава *Gracilaria* sp. материал был собран в июле 1979 г. в Амурском заливе Японского моря (конкретно в зал. Угловом, курорт Садгород). В это время в прибрежной зоне устанавливаются оптимальные для развития грацилярии температура (22–23°С) и соленость (25‰) воды. Крупные (1,5–2,0 м длиной) слоевица *Gracilaria* sp. отделяли от встречающейся здесь же *G. verrucosa*, карпоспорофит и тетраспорофит тщательно разделяли и далее изучали параллельно. Оба образца водоросли подвергали одинаковой фиксации, сушке, измельчению, удалению пигментов и низкомолекулярных соединений. Полученный материал обрабатывали горячей водой, агар (фракцию I) выделяли из экстрактов и очищали многократным замораживанием-оттаиванием геля [5], а остающиеся в маточном растворе кислые негелеобразующие полисахариды (фракция II) отделяли от нейтраль-

\* Сообщение XXXV см. [1].

Характеристика полисахаридных фракций *Gracilaria* sp.

Фракция	Выход, %		Состав гидролизата			
	Тетра-спорофит	Карпо-спорофит	Gal	Gal6Me	Glc	Man
I	22,8	40,7	+++	+		
II	8,9	8,8	+++	Следы		
III	1,5	1,0	+++	»		
IV	1,9	4,1	++		+	
V	19,7	17,8	+		++	+

Таблица 2

Характеристика гелеобразующих полисахаридов из *Gracilaria* sp.

Образец	Gal * : 3,6AnGal : SO <sub>3</sub> Na, моль/моль	Модуль упругости 2%-ного геля, Н/м <sup>2</sup> **
ГПТ	1 : 0,68 : 0,14	3280
ГПТМ	1 : 0,81 : 0,02	6110
ГПК	1 : 0,69 : 0,13	2270
ГПКМ	1 : 0,68 : 0,07	3060

\* Вместе с Gal6Me; аббревиатура сахаров дана в соответствии с рекомендациями номенклатурной комиссии IUPAC-IUB (см. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 7, p. 3347—3351).

\*\* Для сравнения модули упругости 2%-ных гелей модифицированных щелочью образцов агара из *G. verrucosa*, описанных в работе [4], находятся в пределах 7750—11 500 Н/м<sup>2</sup>, а модуль упругости 2%-ного геля бактоагара Дифко равен 13 500 Н/м<sup>2</sup>.

ных (фракция III) в виде нерастворимых цетавлоновых солей [6]. Остаток водоросли дополнительно экстрагировали 1 н. NaOH при комнатной температуре, полисахариды (фракция IV) выделяли из экстракта диализом и лиофилизацией; нерастворимую в щелочи фракцию V промывали и высушивали. Выходы фракций приведены в табл. 1.

Как следует из этой таблицы, обе генерации водоросли весьма сходны по составу и содержанию всех фракций, за исключением главной фракции I: выход гелеобразующего полисахарида из тетраспорифита (ГПТ) почти вдвое ниже, чем из карпоспорифита (ГПК). Поскольку гелеобразующая фракция представляет наибольший практический интерес, подробно изучались только препараты ГПТ и ГПК.

Как известно, агароподобные полисахариды построены из производных галактозы. Типичным представителем этой группы веществ является агароза — линейный регулярный полимер, построенный из строго чередующихся остатков 3-О-замещенной β-D-галактопиранозы и 4-О-замещенной 3,6-ангидро-α-L-галактопиранозы [7]. Другие агароподобные полисахариды имеют углеводные цепи, построенные по тому же плану, но могут содержать в различных положениях О-метильные и сульфатные группы, часть остатков 3,6-ангидро-α-L-галактозы может быть замещена остатками 6-сульфата α-L-галактозы, а остатки β-D-галактозы могут нести в положениях 4 и 6 О-(1'-карбоксо)этилиденные группы [8]; накопление ионогенных группировок приводит к уменьшению гелеобразующей способности полисахарида. Для отнесения неизвестного полисахарида к группе агара чрезвычайно удобно использовать спектры <sup>13</sup>C-ЯМР, позволяющие с уверенностью отличать производные агарозы от других полисахаридов красных водорослей [9, 10].

Полисахаридные препараты ГПТ и ГПК практически совпадают друг с другом по содержанию основных компонентов — галактозы, 3,6-ангидро-галактозы и сульфата (табл. 2). Оба вещества дают практически идентичные спектры <sup>13</sup>C-ЯМР (см. рис. 1), во многом аналогичные спектрам других агароподобных полисахаридов [11]. Так, 12 наиболее интенсивных сигналов в этих спектрах соответствуют 12 углеродным атомам повто-

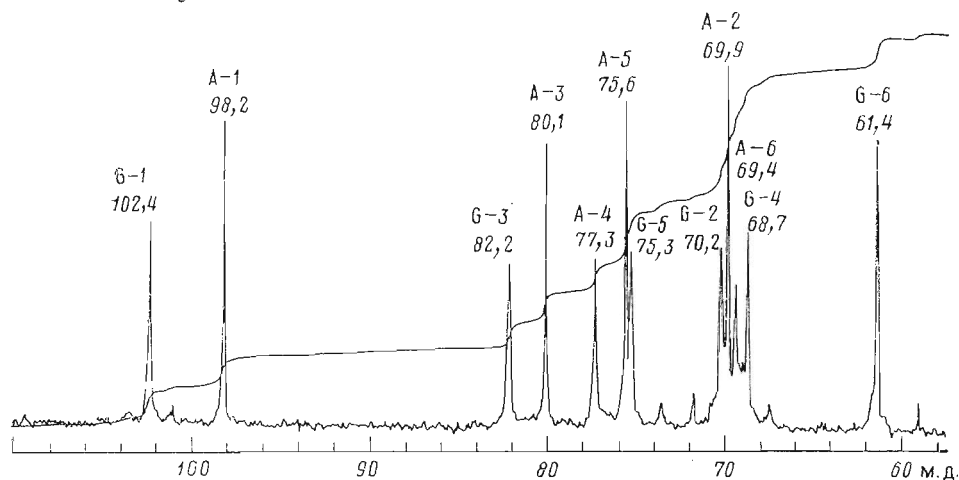
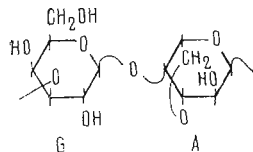


Рис. 1. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ГПК (отнесение минорных сигналов см. в тексте)

ряющегося звена агаробиозы, и, следовательно, полисахариды являются близкими аналогами агарозы. Сигналы небольшой интенсивности с химическими сдвигами 101,2 и 67,5 м.д. относятся, по всей вероятности, соответственно к С-1 и С-6 остатков 6-сульфата  $\alpha$ -L-галактопиранозы, которыми в молекулах полисахаридов заменена часть остатков 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопиранозы. Другая группа сигналов небольшой интенсивности ( $\text{ОСН}_3$  — 59,1, С-6 — 71,8, С-5 — 73,6 м.д.) свидетельствует о том, что часть остатков  $\beta$ -D-галактопиранозы метилирована по С-6. Этот факт подтверждается химическими данными: при гидролизе обоих препаратов наряду с галактозой образуется 6-O-метилгалактоза в соотношении 1:0,11 для ГПТ и 1:0,09 для ГПК (по данным ГЖХ). В то же время, несмотря на сходство по составу, ГПТ и ГПК почти в 1,5 раза различаются по величине модуля упругости геля, что можно объяснить различным расположением сульфатных групп вдоль цепи полимеров. Действительно, при модификации под действием щелочи в условиях, когда сульфатные группы в положении 6 4-O-замещенных остатков  $\alpha$ -L-галактопиранозы отщепляются с образованием звеньев 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопиранозы, а прочие сульфатные группы устойчивы [12], два полисахаридных препарата ведут себя несколько различно. Если ГПК теряет примерно половину сульфата, а модуль упругости геля возрастает при этом менее чем в 1,5 раза, то в случае ГПТ сульфат отщепляется практически полностью, соответствующим образом возрастает содержание в полисахариде 3,6-ангидрогалактозы, а модуль упругости геля увеличивается вдвое и приближается по значению к модулям упругости гелей, образуемых модифицированными щелочью образцами агара из *G. verrucosa* [4].

Различное расположение сульфатных групп в полисахаридах ГПТ и ГПК следует и из данных фракционирования этих препаратов и модифицированных щелочью полисахаридов ГПТМ и ГПКМ на DEAE-сепадексе [13] (рис. 2). До модификации оба полисахарида распределяются по фракциям в соответствии с содержанием ионогенных групп практически одинаковым образом, однако после модификации щелочью содержание вымываемой водой нейтральной фракции (агарозы) значительно выше в ГПТМ, чем в ГПКМ; этим, очевидно, и объясняется более высокая прочность геля ГПТМ.

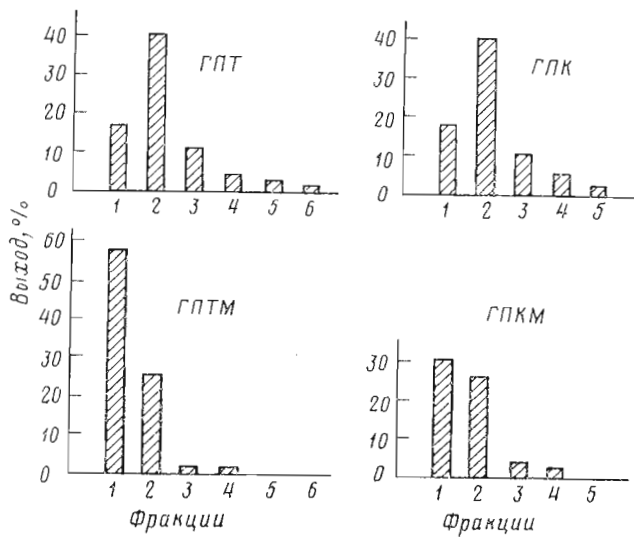


Рис. 2. Фракционирование образцов агара из *Gracilaria* sp. на DEAE-сефадексе А-50 (Cl<sup>-</sup>-форма); содержание сахаров в водном элюате (1), в 0,5 (2), 1,0 (3), 2,0 (4), 3,0 (5) и 4,0 М (6) растворах NaCl

Таким образом, *Gracilaria* sp. можно рассматривать как еще один источник агароподобных полисахаридов. При этом тетраспорофит по сравнению с карпоспорофитом дает агар с меньшим выходом, но зато более высокого качества. Гелеобразующие свойства агаров, содержащихся как в тетраспорофите, так и в карпоспорофите, улучшаются после щелочной обработки, но остаются несколько ниже соответствующих характеристик полисахаридов из *G. verrucosa* [4]. С практической точки зрения, однако, этот недостаток вполне может компенсироваться более быстрым накоплением биомассы *Gracilaria* sp. Поэтому разработка условий культивирования этого вида грацилярии, на наш взгляд, представляет несомненный интерес.

### Экспериментальная часть

Общие приемы БХ, ГЖХ, гидролиза полисахаридов и определение содержания галактозы, 3,6-ангидрогалактозы и сульфата описаны в работе [4].

**Сбор и предварительная обработка водорослей.** *Gracilaria* sp. собрана 23 июля 1979 г. в окрестностях курорта Садгород на глубине 1 м. Водоросль тщательно сортировали, тетраспорофит от карпоспорофита отделяли визуально (цистокарпы хорошо видны невооруженным глазом). Полученные образцы водорослей заливали ацетоном, затем сушили на воздухе, измельчали до частиц размером менее 0,25 мм, исчерпывающе экстрагировали метанолом в аппарате Сокслета и снова высушивали на воздухе.

**Выделение полисахаридов.** 5 г водоросли в 250 мл воды нагревали на кипящей водяной бане при интенсивном перемешивании в течение 6 ч, горячую смесь центрифугировали, экстракт отделяли, а остаток водоросли обрабатывали еще два раза водой в тех же условиях. Объединенные экстракты замораживали, затем оттаивали и полученный гель трижды очищали замораживанием-оттаиванием. Очищенный гель лиофилизировали, получали фракцию I. К маточным растворам, полученным после отделения геля, прибавляли 10% водный раствор бромистого цетилтриметиламмония до полного выпадения осадка солей кислых полисахаридов; этот осадок отделяли, растворяли в 4 М NaCl, к раствору прибавляли 3 объема этанола и вынавший осадок Na-солей кислых поли-

сахаридов отделяли, растворяли в воде, диализовали и лиофилизировали, получали фракцию II. Маточный раствор после отделения осадка цетавлоновых солей кислых полисахаридов также диализовали и лиофилизировали, получали фракцию III. Остаток водоросли после водной экстракции обрабатывали 250 мл 4 М NaOH в течение 3 сут при 20°С, суспензию нейтрализовали уксусной кислотой, центрифугировали, раствор диализовали и лиофилизировали, получали фракцию IV. Остаток после щелочной экстракции промывали водой, этанолом, эфиром и высушивали, получали фракцию V. Выходы фракций см. в табл. 1.

*Щелочная обработка гелеобразующих полисахаридов ГПТ и ГПК.* 1,0 г полисахарида ГПТ или ГПК растворяли при нагревании в 200 мл воды, прибавляли 200 мг NaBH<sub>4</sub>, выдерживали 6 ч при 60°С, затем прибавляли еще 600 мг NaBH<sub>4</sub> и 100 мл 3 М NaOH. Реакционную смесь нагревали 6 ч при 80°С, охлаждали, нейтрализовали уксусной кислотой, диализовали и лиофилизировали. Выход модифицированных полисахаридов ГПТМ 91, а ГПКМ 68%.

*Фракционирование гелеобразующих полисахаридов на DEAE-сефадексе (рис. 2).* К 10 мл набухшего в воде DEAE-сефадекса А-50 (Cl<sup>-</sup>-форма) прибавляли горячий раствор 10 мг ГПТ или ГПК в 10 мл воды и воду до общего объема 100 мл. Смесь нагревали 1 ч при 70°С при периодическом перемешивании и затем фильтровали через стеклянный фильтр, получали элюат 1 (H<sub>2</sub>O). Колбу и фильтр промывали 3×50 мл горячей воды, промывной раствор отбрасывали, сефадекс смывали с фильтра в реакционную колбу горячим 0,5 М NaCl и доводили общий объем суспензии этим же раствором до 100 мл. Далее смесь снова нагревали 1 ч при 70°С и после фильтрования получали элюат 2 (0,5 М NaCl). Последовательной обработкой в тех же условиях соответствующими растворами соли получали далее элюаты 3 (1 М NaCl), 4 (2 М NaCl), 5 (3 М NaCl) и 6 (4 М NaCl). Затем в аликвотах из этих шести элюатов (в сравнении с исходным раствором полисахарида) определяли содержание сахаров по реакции с фенолом-конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [14], которое пересчитывали на объем суспензии (100 мл). Общий выход сахаров в элюатах составил 60–84%; параллельные опыты показали высокую сходимость результатов.

*Определение модуля упругости гелей.* Механические свойства гелей исследовали для 2%-ных водных растворов полисахаридов на приборе Instron (Англия) по методике, описанной в работе [4].

*Спектроскопия <sup>13</sup>С-ЯМР.* Спектры <sup>13</sup>С-ЯМР снимали на приборе Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц для 2%-ных растворов полисахаридов в D<sub>2</sub>O при 80°С; внутренний стандарт — диметилсульфоксид, 39,5 м. л.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Усов А. И., Кошелева Е. А., Яковлева А. П. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 6, с. 830–836.
2. Whyte J. N. C., Englar J. R. Bot. Mar., 1980, v. 23, № 6, p. 277–283.
3. Макиенко В. Ф. Труды ВНИРО, 1979, т. 138, с. 51–59.
4. Усов А. И., Иванова Е. Г., Макиенко В. Ф. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1647–1653.
5. Бемиллер Дж. П. В сб.: Методы химии углеводов. Пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967, с. 314–317.
6. Скотт Дж. Е. В сб.: Методы химии углеводов. Пер. с англ. под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967, с. 288–293.
7. Araki C. In: Proc. 5th Int. Seaweed Symp./Eds Young E. G., McLachlan J. L. London: Pergamon Press, 1966, p. 3–19.
8. Duckworth M., Yaphe W. Carbohydr. Res., 1971, v. 16, № 1, p. 189–197.
9. Шашков А. С., Усов А. И., Яроцкий С. В. Биоорган. химия, 1978, т. 4, № 1, с. 74–81.
10. Usov A. I. Bot. Mar., 1984, v. 27, № 5, p. 189–202.
11. Usov A. I., Ivanova E. G., Shashkov A. S. Bot. Mar., 1983, v. 26, № 6, p. 285–294.
12. Rees D. A. J. Chem. Soc., 1961, № 12, p. 5168–5171.
13. Craigie J. S., Leigh C. In: Handbook of phycollogical methods. Physiological and biochemical methods/Eds Hellebust J. A., Craigie J. S. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978, p. 109–131.

POLYSACCHARIDES OF ALGAE. XXXVI. COMPOSITION AND PROPERTIES  
OF AGAR FROM THE FAR-EASTERN *GRACILARIA* SP.

USOV A. I., IVANOVA E. G., PRZHEMENETSKAYA V. F. \*

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

The polysaccharide content of two different life cycle stages (tetrasporophyte and carposporophyte) of *Gracilaria* sp., a representative of red seaweeds found recently in the Amur bay (Sea of Japan), has been investigated. The species was shown to contain gel-forming polysaccharides of the agar group. Tetrasporophyte gives agar with lower yield but with greater gel-forming ability than carposporophyte; the gel strength of both agar specimens is substantially improved by the alkali treatment under controlled conditions. Based on the data obtained, *Gracilaria* sp. may be regarded as species of interest for mariculture.