



УДК 547.458.702 + 582.273

© 1991 г.

А. А. Лапина, Е. Г. Иванова*, Э. А. Титлянов,
А. И. Усов*

АГАР ИЗ ПРИМОРСКОЙ НЕПРИКРЕПЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ
GRACILARIA VERRUCOSA (HUDS.) PAPENF.

Институт биологии моря ДВО АН СССР, Владивосток;

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Из неприкрепленной формы приморской красной водоросли *Gracilaria verrucosa* экстракцией горячей водой до или после обработки 1 М NaOH получены гелеобразующие галактаны, которые, по данным химических анализов и спектров ¹³C-ЯМР, являются типичными представителями полисахаридов группы агара. Нативный галактан содержит около 13% агарозной фракции и несколько уступает бакто-агару Дифко по прочности геля. Модификация водоросли щелочью приблизительно в 1,5 раза увеличивает выход и прочность геля, а содержание агарозы в полисахариде возрастает до 50%. Полученные данные позволяют рассматривать неприкрепленную форму *G. verrucosa* как потенциальное сырье для получения агара и перспективный объект для промышленного культивирования.

В мировом производстве агара красные водоросли рода *Gracilaria* занимают ведущее место [1]. Качество извлекаемого из них агара зависит прежде всего от вида водоросли, возраста ее талломов, генерации и условий роста растений [2]. Из работ, посвященных изучению полисахаридного состава водорослей рода *Gracilaria* Черноморского бассейна [3] и Японского моря [4, 5], следует, что эти водоросли содержат высококачественный агар и в принципе могли бы использоваться в качестве сырья для его промышленного получения. К сожалению, в морях Советского Союза грацилярия не образует больших скоплений, поэтому практическое использование изученных видов требует разработки технологии их крупномасштабного культивирования.

Недавно на юге Приморского края были обнаружены значительные скопления новой для Советского Дальнего Востока неприкрепленной формы *G. verrucosa* [6]. Место обитания грацилярии бородавчатой представляет собой систему лагун глубиной от 0,1 до 0,6 м, постоянно сообщаемых с морем небольшой узкой протокой. Грунт илисто-песчаный с большим количеством остатков органического происхождения, соленость воды — 18—34‰, температура в летний сезон колеблется от 18 до 28°С. В этих лагунах грацилярия образует пласты толщиной до 0,2 м, талломы достигают в длину 15—40 см, свободно лежат на иле или частично погружены в него. Размножается она только вегетативным путем, активно растет с апреля по сентябрь. Данная работа посвящена изучению полисахаридного состава этой водоросли, собранной в июне в период ее активного роста.

Известно, что метод извлечения агара существенно влияет на выход и качество продукта [7], поэтому в данной работе были использованы два наиболее распространенных приема: экстракция из обезжиренной водоросли горячей водой (способ I) и метод предварительной щелочной обработки водорослей с последующей экстракцией горячей водой (способ II). Полученные водные экстракты содержат смесь нескольких полисахаридов, разделение которых проводили следующим образом: для получения гелеобразующих полисахаридов (фракция 1) использовали стандартный прием замораживания-оттаивания гелей [7]; кислые негелеоб-

Полисахаридный состав неприкрепленной формы *Gracilaria verrucosa*

Способ экстракции полисахаридов *	Номер фракции	Полисахаридная фракция	Выход, %	SO ₂ Na, %	Соотношение моносахаридов **				
					Gal	Glc	Man	Xyl	Ara
I	1	Агар	38,8	3,9	1	0,09	—	—	—
II			55,0	0,9	1	0,06	—	—	—
I	2	Негелеобразующий кислый галактан	2,7	11,8	1	0,13	—	0,03	—
II			1,5	10,4	1	—	—	0,11	—
I	3	Нейтральные полисахариды	7,3	—	0,17	1	0,24	0,04	0,08
II			2,9	—	0,08	1	0,01	0,04	0,01
I	4	Остаток водоросли	9,1	—	1	0,34	0,08	0,07	0,02
II			7,2	—	0,01	1	0,03	0,01	—

* I — горячей водой из нативной водоросли, II — горячей водой из водоросли, предварительно обработанной 1 М NaOH (1 ч, 100° С).

** По площади пиков ГЖХ продуктов полного кислотного гидролиза (2 н. H₂SO₄, 6 ч, 100° С) в виде ацетатов полиолов.

Таблица 2

Характеристика агаров неприкрепленной формы *G. verrucosa*

Шифр агара	[Gal]*/3,6AnGal/SO ₂ Na моль/моль	Соотношение Gal/6MeGal по данным ГЖХ	Модуль сдвига 1% геля **, Па	Содержание агарозы ***, %
I-1	1 : 0,72 : 0,13	1 : 0,30	1560	12,9
II-1	1 : 0,90 : 0,03	1 : 0,28	2630	49,8

* [Gal] — сумма галактозы и 6MeGal.

** Для бакто-агара Дифко 1790 Па.

*** По данным фракционирования агаров на DEAE-сефадексе А-50 (Cl⁻).

разующие полисахариды (фракция 2) выделяли из маточных растворов адсорбцией на DEAE-сефадексе А-50 (Cl⁻); нейтральные водорастворимые полисахариды (фракция 3) осаждали, прибавляя спирт. Водоросли после экстракции горячей водой высушивали ацетоном и получали остаток (фракция 4). Выходы и моносахаридный состав гидролизатов полученных фракций 1—4 представлены в табл. 1.

Как видно из этой таблицы, основной полисахарид водоросли — гелеобразующий галактан, выход которого колеблется от 38,8 до 55,0% в зависимости от способа экстракции. Количество сульфатных групп в нем невелико (от 3,9 до 0,9%) и зависит от метода выделения. В негелеобразующем галактане (фракция 2) содержание сульфата значительно выше (11,8 и 10,4%), хотя выход этого полисахарида низкий. Основной моносахаридный остаток гидролизатов фракций 1 и 2 — галактоза, а в качестве примеси присутствует небольшое количество глюкозы. Моносахаридный состав фракции 3 свидетельствует о том, что главным компонентом ее является флоридный крахмал, а галактан и некоторые другие полисахаридные компоненты клеточных стенок присутствуют в качестве примесей. Из данных моносахаридного состава легкогидролизуемой части остатка водорослей (фракция 4) следует, что экстракция галактана из нативной водоросли (способ I) частично затруднена, в то время как его извлечение по способу II проходит практически полностью.

Из всех выделенных фракций наибольший практический интерес представляет гелеобразующий полисахарид, и дальнейшие исследования были посвящены установлению его строения и характеристике физико-химических свойств.

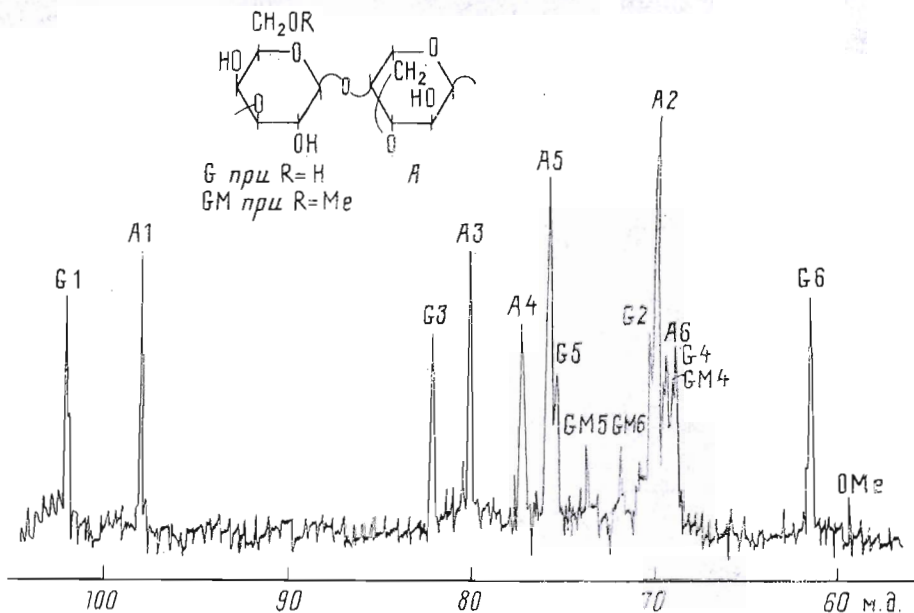


Рис. 1. Спектр ^{13}C -ЯМР агара I-1 из красной водоросли *Gracilaria verrucosa*

На рис. 1 приведен спектр ^{13}C -ЯМР гелеобразующего полисахарида I-1. Двенадцать сигналов максимальной интенсивности, соответствующих углеродным атомам повторяющегося дисахаридного звена агаробиозы (3'-O-замещенной 4-O- β -D-галактопиранозил-3,6-ангидро- α -L-галактопиранозы), указывают на принадлежность этого полисахарида к группе агара [8—10].

Кроме того, в спектре наблюдается серия сигналов (68,6 (C4), 73,2 (C5), 71,8 (C6) и 59,1 (OMe) м. д.) свидетельствующая о наличии в агаре остатков 6-O-метил-D-галактозы; их отношение к остаткам галактозы, по данным ГЖХ, равно 0,30—0,28 : 1 (табл. 2). Спектр агара после щелочной обработки имеет тот же набор сигналов, разрешение близких по значению сигналов несколько увеличивается.

Из данных табл. 2 следует, что соотношение главных компонентов агаров I-1 и II-1 существенно зависит от способа их извлечения. При щелочной обработке происходит химическая модификация агара, связанная с отщеплением сульфатных групп из остатков 6-сульфата L-галактозы (от 0,13 моль в I-1 до 0,04 — в II-1) и образованием соответствующего количества звеньев 3,6-ангидро-L-галактозы (от 0,72 до 0,90 моль соответственно).

Важной характеристикой для оценки качества агаров является прочность гелей, которая в нашей работе определяется величиной модуля сдвига [11, 12] и равняется 1560 Па (I-1) и 2630 Па (II-1). Эти данные свидетельствуют о высоком качестве выделенных нами агаров, хотя агар (I-1), полученный из нативной водоросли, несколько уступает по прочности геля бакто-агару Дифко (1790 Па), зато агар II-1 превосходит эту величину, что связано с более низким содержанием сульфатных групп в нем и высоким содержанием остатков 3,6-ангидрогалактозы.

Результаты фракционирования агаров на DEAE-сефадексе [7] также подтверждают, что способ экстракции существенно влияет на состав агара. На рис. 2 представлено соотношение фракций агаров в зависимости от плотности заряда. В агаре (I-1) из нативной водоросли главная фракция (53%) вымывается с сефадекса 0,5 М раствором NaCl, а нейтральная агарозная фракция составляет \sim 13%. В агаре (II-1) после щелочной модификации содержание сульфатных групп падает с 3,9 до 0,9%, а главной фракцией является агароза (\sim 50%). Увеличение содержания агарозы и прочности геля, очевидно, объясняется тем, что сульфатные группы в нативном галактане занимают преимущественно положения 6 в 4-O-за-

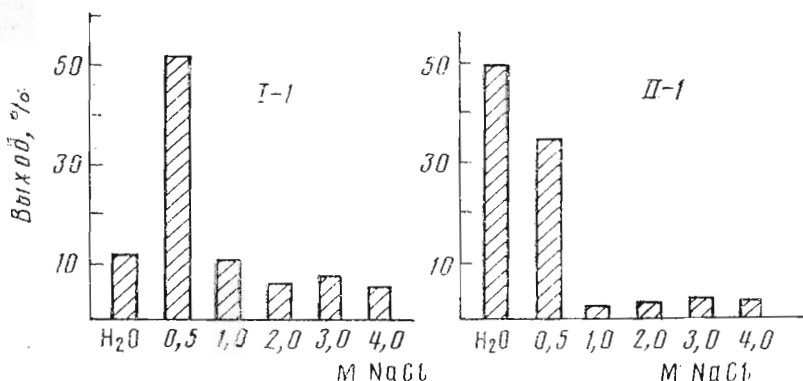


Рис. 2. Результаты фракционирования на DEAE-сефадексе А-50 (Cl^-) агаров, выделенных из нативной (I-1) и предварительно обработанной щелочью водорослей (II-1)

мещенных остатках α -L-галактозы и способны отщепляться под действием щелочи с образованием остатков 3,6-ангидро- α -L-галактозы, что в свою очередь приводит к углеводным цепям с меньшей плотностью заряда и с более регулярной структурой.

Таким образом, неприкрепленная форма приморской *G. verrucosa* представляет несомненный интерес как источник для промышленного получения высококачественного агара, причем предварительная щелочная обработка водоросли не только значительно увеличивает выход агара, но и химически модифицирует его, в результате чего заметно улучшаются гелеобразующие свойства агара.

Экспериментальная часть

Общее содержание сахаров определяли по реакции с фенолом и конц. H_2SO_4 [13], содержание 3,6-ангидрогалактозы — по реакции с резорцином и HCl [14], галактозу рассчитывали по общему содержанию сахаров, за вычетом 3,6-ангидрогалактозы. Сульфат определяли турбидиметрическим методом по Доджсону [15] после гидролиза 1 н. HCl в течение 6 ч при 100°C .

ГЖХ ацетатов полиолов [16] проводили на хроматографе Hewlett-Packard 5890 А с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-1 и интегратором HP 3393 А.

Спектры ^{13}C -ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 с рабочей частотой по углероду 62,9 МГц для 2% растворов полисахаридов в D_2O при 80°C ; внутренний стандарт — диметилсульфоксид (39,5 м. д.).

Сбор и предварительная обработка водорослей. Водоросли собирали в июне 1989 г. в солоноватых лагунах Хасанского района на глубине 0,3—0,5 м, сортировали, высушивали на воздухе, затем измельчали, многократно экстрагировали смесью этанол — хлороформ — вода (2 : 1 : 0,5) и сушили в шкафу при 50°C .

Экстракция агара. Способ I. 3,0 г обезжиренной биомассы заливали 300 мл H_2O и перемешивали 6 ч при нагревании на кипящей водяной бане. Горячую смесь центрифугировали, остаток водоросли экстрагировали еще 2 раза в тех же условиях. Водные экстракты оставляли на ночь для созревания геля, затем замораживали-оттаивали, полисахарид сушили при 50°C .

Способ II. 3,0 г обезжиренной биомассы заливали 300 мл 1 М NaOH , нагревали на кипящей водяной бане 1 ч, после охлаждения смесь нейтрализовали уксусной кислотой и водоросли тщательно промывали водой, к влажному осадку приливали 200 мл воды и проводили экстракцию, как описано в способе I.

Выделение других полисахаридов. Маточные растворы после отделения геля упаривали до 100 мл, прибавляли 20 г набухшего DEAE-сефадекса А-50 (Cl^-), нагревали 1 ч при 70°C , фильтровали, промывали сефадекс

водой, фильтраты упаривали, прибавляли 3 объема спирта, осадок фильтровали и высушивали, получали фракцию нейтральных полисахаридов. Сефадекс промывали 3 М раствором NaCl при нагревании до 70° С, раствор диализовали и лиофилизировали, получали фракцию кислых негелеобразующих полисахаридов.

Остаток водоросли после горячей водной экстракции промывали ацетоном и высушивали, получали фракцию 4.

Выходы и состав полученных полисахаридных фракций представлены в табл. 1.

Определение модуля сдвига гелей. Механические свойства гелей 1% растворов агаров определяли на модифицированных динамометрических весах типа АДВ-200 [11] методом пенетрации полусферического индентора радиусом 3,5 мм в режиме ползучести в течение 1 мин при 20° С и ступенчатой нагрузке по 1,0 г.

Расчет модуля сдвига производился по формуле

$$G_{(t=1)} = \frac{1}{k \cdot R^{0,5}} \cdot \frac{P}{h^{1,5} (t=1)} \cdot 98,04 = 16,343 \cdot \frac{P}{h^{1,5}},$$

где G — модуль сдвига в паскалях; k — постоянная, равная 10,14; R — радиус индентора в сантиметрах; P — нагрузка на образец в граммах; h — глубина пенетрации в сантиметрах.

Фракционирование агара на DEAE-сефадексе А-50 (Cl⁻). 10 мл 1% раствора агара помещали в коническую колбу, прибавляли 10 г набухшего сефадекса, реакционную смесь доводили до 100 мл водой. Колбу нагревали 1 ч при 70° С, затем фильтровали, получали водный элюат. Сефадекс отмывали горячей водой и заливали 0,5 М раствором NaCl. Смесь снова нагревали 1 ч при 70° С, фильтровали и получали элюат 0,5 М NaCl. Последовательной обработкой в тех же условиях растворами NaCl различной концентрации получали элюаты 1, 2, 3 и 4 М NaCl.

Затем в исходном растворе агара и полученных элюатах определяли общее содержание сахаров по реакции с фенолом и конц. H₂SO₄ (рис. 2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacLachlan J. // Plant and Soil. 1985. V. 89. P. 137—157.
2. Yaphe W. // Hydrobiologia. 1984. V. 116/117. P. 171—186.
3. Усов А. И., Иванова Е. Г. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1545—1551.
4. Усов А. И., Иванова Е. Г., Макиенко В. Ф. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 11. С. 1647—1653.
5. Усов А. И., Иванова Е. Г., Пржеменецкая В. Ф. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 8. С. 1119—1124.
6. Титлянова Т. В., Титлянов Э. А., Козьменко В. Б. // Биология моря. 1990. № 4. С. 45—50.
7. Craigie J. S., Leigh G. // Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods / Eds Hellebust J. A., Craigie J. S. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978. P. 109—131.
8. Usov A. I. // Bot. Mar. 1984. V. 27. № 5. P. 189—202.
9. Усов А. И. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 77—96.
10. Lahaye M., Yaphe W., Phan Viet M. T., Rochas C. // Carbohydr. Res. 1989. V. 190. № 3. P. 249—265.
11. Слонимский Г. Л., Алексеев В. Ф., Гринберг В. Я., Изюмов Д. В., Толстогузов В. Б. // Высокомолекуляр. соедин. 1969. Т. 11. № 2. С. 460—463.
12. Vikbov T. M., Grinberg V. Y., Tolstogusov V. B. // Die Nahrung. 1979. V. 23. № 4. P. 403—408.
13. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350—356.
14. Yaphe W., Arsenault G. P. // Anal. Biochem. 1965. V. 13. P. 143—148.
15. Dodgson K. S., Price R. G. // Biochem. J. 1962. V. 84. № 1. P. 106—110.
16. Слонекер Дж. // Методы исследования углеводов / Пер. с англ. под ред. Хорлина А. Я. М.: Мир, 1975. С. 22—25.

Поступила в редакцию
5.V.1991

A. A. LAPSHINA, E. G. IVANOVA *, E. A. TITLYANOV, A. I. USOV *
AGAR FROM THE UNATTACHED FORM OF GRACILARIA VERRUCOSA
(HUDS.) PAPENF. OF PRIMORSKI TERRITORY

*Institute of Marine Biology, Far East Division, Academy of Sciences of
the USSR, Vladivostok; * N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Gel-forming galactans were isolated from the Far East red seaweed *Gracilaria verrucosa* (unattached form) by the hot water extraction before or after treatment with 1 M sodium hydroxide. According to chemical evidence and ^{13}C NMR spectroscopy, the polysaccharides are typical representatives of the agar group. The native galactan contains about 13% of neutral agarose fraction and is somewhat inferior to the Difco bacto-agar in gel strength. The yield and gel strength of the polysaccharide are increased 1.5 fold upon the alkaline modification, which increases the agarose content from 13 to 50%. Based on these data, the unattached form of *G. verrucosa* may be a potential source for the agar production and an object of interest for mariculture.