



УДК 582.273-119.2:547.458.7

ПОЛИСАХАРИДЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ.**49*. ВЫДЕЛЕНИЕ АЛЬГИНАТА, СУЛЬФАТИРОВАННОГО КСИЛОГАЛАКТАНА И ФЛОРИДНОГО КРАХМАЛА ИЗ ИЗВЕСТКОВОЙ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ***Bossiella cretacea* (P. et R.) Johansen (Rhodophyta, Corallinaceae)© 1996 г. А. И. Усов[#], М. И. Билан

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 117913, Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 28.06.95 г.

Из известковой красной водоросли *Bossiella cretacea* ступенчатой экстракцией с последующей очисткой выделены сульфатированный ксилогалактан, альгинат натрия и флоридный крахмал. По данным амилолиза, спектров ¹H- и ¹³C-ЯМР и свойств иодного комплекса, флоридный крахмал представляет собой разветвленный α-D-глюкопиранан амилопектинового типа со средней длиной линейных участков цепей 14 - 18 остатков глюкозы. Ксилогалактан содержит D- и L-галактозу, D-ксилозу и сульфат в соотношении, близком к эквимолекулярному; 3,6-ангидрогалактоза в полисахариде отсутствует и практически не образуется при его щелочной обработке. Альгинат натрия охарактеризован моносахаридным составом и спектром ¹³C-ЯМР; определено соотношение остатков β-D-маннуриновой и α-L-гулуриновой кислот (M/G около 0.5) и показано блочное расположение моносахаридов вдоль цепи полимера. Полученные данные являются новой иллюстрацией своеобразного полисахаридного состава известковых красных водорослей, относящихся к семейству Corallinaceae.

Ключевые слова: альгинат, *Bossiella cretacea*, красные водоросли, сульфатированный ксилогалактан, флоридный крахмал.

Для красных водорослей семейства Corallinaceae (порядок Corallinales) характерна способность откладывать в клеточных стенках значительные количества карбоната кальция в кристаллической модификации, называемой кальцитом [2, 3]. Обычно предполагают, что в процессе кальцификации принимают участие кислые полисахариды клеточных стенок, однако полисахаридный состав кораллиновых водорослей систематически не исследовался. В литературе можно найти всего несколько работ, в которых охарактеризованы полисахариды отдельных представителей этого семейства. Так, в атлантической *Corallina officinalis* L. были найдены высокоразветвленный флоридный крахмал, целлюлоза и довольно необычный для красных водорослей сульфатированный полисахарид, содержащий D- и L-галактозу и D-ксилозу, но лишенный 3,6-ангидрогалактозы [4]. Более подробные сведения о структуре сульфатированных ксилогалактанов из этой водоросли приведены в недавних работах [5, 6]. Несколько статей [7 - 10] посвящено строению, ферментативному синтезу и физиологической роли

флоридного крахмала (а также некоторых низкомолекулярных углеводов) в тихоокеанской водоросли *Serraticardia maxima* (Yendo) Silva (названной *Joculator maximus* в самой ранней работе [7]). Из этой водоросли удалось выделить вещество, способное связывать ионы кальция [11], которое впоследствии было идентифицировано как альгиновая кислота [12]. Этот результат оказался весьма неожиданным, поскольку альгиновые кислоты считались специфическими компонентами бурых водорослей [13] и кроме них были найдены только в некоторых бактериях, таких, как *Azotobacter* [14] и *Pseudomonas* [15]. В нашем предыдущем сообщении [1] на примере 20 образцов тихоокеанских водорослей, относящихся к 9 видам семейства Corallinaceae, было показано, что эти известковые водоросли обладают качественно однородным полисахаридным составом. Все без исключения образцы наряду с глюкозами и ксилогалактанами содержали полиурониды в количестве, сравнимом с количеством ксилогалактанов. Для одного образца, *Corallina pilulifera* P. et R., было проведено препаративное выделение водорастворимых полисахаридов, и полученные полимеры были охарактеризованы как Na-альгинат,

* Сообщение 48 см. [1].

Автор для переписки.

Na-соль сульфатированного ксилогалактана и фторидный крахмал. Настоящая работа посвящена аналогичному исследованию полисахаридного состава другого типичного представителя известковых водорослей Японского моря – *Bossiella cretacea* (P. et R.) Johansen.

Для препаративного выделения полисахаридов был использован образец водоросли, собранной в зал. Посъета Японского моря осенью 1977 г. Результаты предварительного анализа углеводного состава этого образца приведены в работе [1]. Интересно, что обработка биомассы водоросли спиртовым раствором триэтиламмониевой соли этилендиамина тетрауксусной кислоты по методике, рекомендованной для декальцификации минерализованных животных тканей [16], практически не привела к удалению неорганических солей. Деминерализация водоросли была проведена с помощью более жесткой обработки разбавленной соляной кислотой, при которой вместе с растворением неорганических солей происходила частичная сольubilизация полисахаридов. Кислый экстракт диализовали для удаления минеральных веществ, после чего содержащиеся в растворе кислые полисахариды осаждали в виде гексадецилтриметиламмониевых (цетавлоновых) солей и далее переводили в водорастворимые Na-соли (фракция I) обработкой этанольным раствором иодида натрия. Не осаждаемые цетавлоном полисахариды (фракцию II) выделяли из маточного раствора, прибавляя этанол. Из аналитических данных (таблица) следует, что полного разделения кислых и нейтральных полисахаридов с помощью цетавлонового осаждения достигнуть не удалось. Тем не менее можно заключить, что главным компонентом фракции I является сульфатированный ксилогалактан, а фракции II – фторидный крахмал.

Экстракция остатка водоросли 3% водным раствором карбоната натрия, осаждение поли-

урионида подкислением экстракта и последующая очистка через нерастворимую в воде Ca-соль были выполнены по методике, описанной Оказаки с сотр. [12], и привели к получению фракции III. В кислом маточном растворе после отделения полиурионида остаются довольно значительные количества фторидного крахмала и ксилогалактана (фракция IV).

Дальнейшая обработка водорослевого остатка горячей водой с последующим осаждением кислых полисахаридов цетавлоном, как описано выше, привела к получению двух новых полисахаридных фракций, из которых осажденная цетавлоном фракция V представляла собой кислый ксилогалактан с примесью фторидного крахмала, а не осажденная цетавлоном фракция VI – практически чистый фторидный крахмал.

Остаток водоросли (фракция VII) после горячей водной экстракции давал при гидролизе небольшое количество глюкозы, галактозы и ксилозы, очевидно, в результате неполного извлечения легкогидролизуемых полисахаридов, но в основном (на 67%) состоял из целлюлозы.

При характеристике полученных полисахаридных фракций главное внимание было уделено идентификации полиурионида (фракция III). Для его очистки была использована способность полисахарида подобно альгиновым кислотам из бурых водорослей давать нерастворимую в воде Ca-соль, которую затем снова переводили в водорастворимую Na-соль. Полученный препарат, по данным спектрофотометрического определения с 3,5-диметилфенолом [1], на 90% состоял из уроновых кислот. Вещество обладало высоким отрицательным удельным вращением, $[\alpha]_D - 104.2^\circ$ (с 0.3; вода), типичным для альгинатов. При кислотном гидролизе в обычных условиях фракция III давала лишь очень небольшое количество нейтральных моносахаридов (таблица). Для качественного и

Выходы и состав полисахаридных фракций, выделенных из *B. cretacea*

Фракция	Выход, % от сухой биомассы	Нейтральные моносахариды, %			Уроновые кислоты, %	SO ₃ Na, %
		ксилоза	глюкоза	галактоза		
I	0.56	13.3	..2	37.4	13.4	7.0
II	0.11	7.8	26.0	13.3	9.1	4.1
III	0.50	0.7	0.4	1.8	90.0	0.8
IV	1.58	3.6	49.9	12.1	5.5	–
V	0.25	7.2	28.6	18.4	10.8	2.2
VI	1.20	0.4	66.2	1.7	5.1	0.4
VII*	2.32	1.0	11.2	2.0	–	–

* Остаток после экстракции содержит 67.1% целлюлозы.

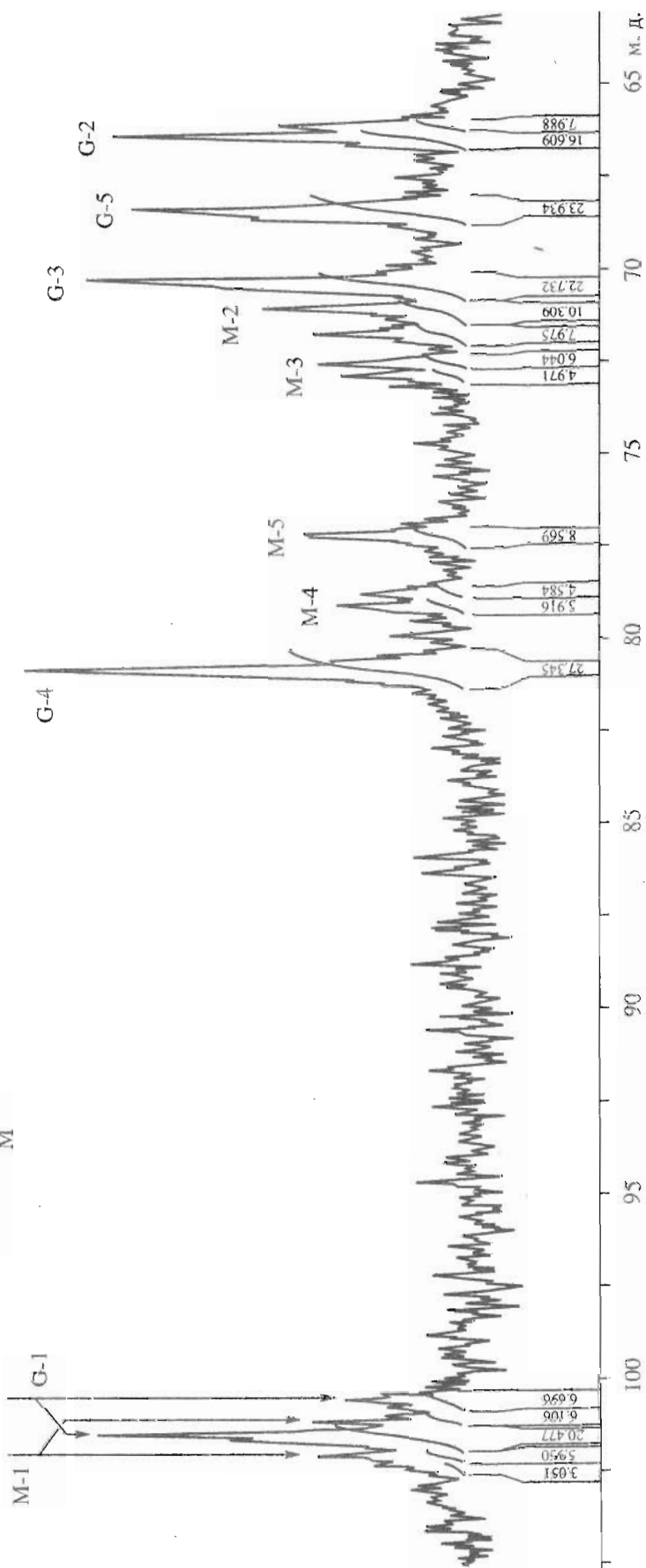
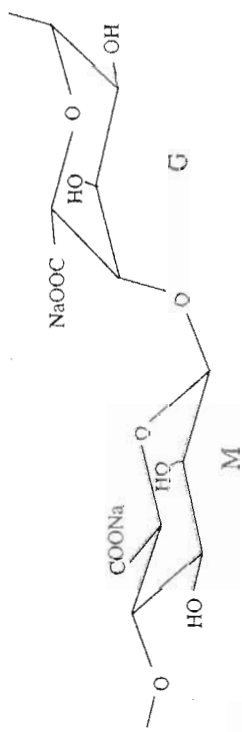
количественного определения состава уроновых кислот вместо жесткого кислотного гидролиза мы воспользовались упрощенной методикой восстановления карбоксильных групп в полимере, аналогичной процедуре, предложенной недавно для определения этерифицированных остатков галактуроновой кислоты в пектинах [17]. Этерификацию карбоксильных групп в полиурониде проводили продолжительной обработкой "магическим метанолом" (смесью метанол-хлороформ-конц. HCl, 10 : 1 : 1) [18]. Далее этерифицированный полиуронид обрабатывали большим избытком боргидрида натрия в концентрированном имидазольном буфере, pH 7, при 0°C. Гидролиз восстановленного полисахарида в обычных условиях с последующим анализом образующихся нейтральных моносахаридов методом ГЖХ в виде ацетатов альдононитрилов дал картину, чрезвычайно типичную для восстановленных альгиновых кислот, поскольку дериватизация редко встречающейся в природе гулозы приводит к появлению на хроматограммах двух весьма характеристичных пиков (ацетатов 1,6-ангидро-β-L-гулозы и L-гулононитрила), в то время как D-манноза превращается в единственное производное (ацетилованный D-маннононитрил). При этом соотношение маннуровой и гулуруновой кислот (M/G), рассчитанное по площадям пиков соответствующих производных маннозы и гулозы, составило величину 0.58.

Спектр ¹³C-ЯМР фракции III (рисунок) оказался типичным для альгинатов [19] и в сочетании с величиной оптической активности не оставлял сомнений в том, что выделенный полисахарид действительно построен из 1 → 4-связанных остатков β-D-маннуровой (M) и α-L-гулуруновой (G) кислот. Соотношение M/G, рассчитанное из интегральных интенсивностей сигналов C1 – C5 этих моносахаридных остатков в спектре ¹³C-ЯМР полимера, оказалось равным 0.48. Такие несколько заниженные значения этой величины по сравнению с данными ГЖХ после восстановления карбоксильных групп наблюдались и для других альгинатов. Поскольку аномерная область спектра ¹³C-ЯМР содержала по крайней мере четыре сигнала, моносахаридные остатки в линейной цепи полисахарида должны быть сгруппированы в блоки, как в большинстве известных альгинатов бурых водорослей [19]. Действительно, в условиях частичного кислотного гидролиза [20], при котором преимущественно расщепляются и переходят в раствор блоки с чередующейся последовательностью остатков уроновых кислот (поли-MG), сольubilизации подвергается только около 25% фракции III. Остаток представляет собой смесь гомополимерных блоков (поли-M и поли-G), не-

растворимую в разбавленных минеральных кислотах. Соотношение между этими двумя типами блоков, рассчитанное из спектра ¹H-ЯМР их смеси [20], составило 0.34.

Нейтральные полисахариды, полученные при экстракции водоросли горячей водой (фракция VI), давали при полном кислотном гидролизе глюкозу с небольшими примесями галактозы и ксилозы. После дополнительной очистки от кислых полисахаридов на колонке с DEAE-сефацелом эта фракция показала высокое положительное удельное вращение, $[\alpha]_D +175.6^\circ$ (с 1; вода), характерное для амилопектинов. Полисахарид полностью расщеплялся с образованием глюкозы под действием амилоглюкозидазы. Спектр ¹³C-ЯМР водного раствора полисахарида состоял из шести главных сигналов практически равной интенсивности (C1 100.7; C2 72.7; C3 74.4; C4 78.5; C5 72.4; C6 61.8 м. д.), положение которых совпало с положением соответствующих сигналов в хорошо известных спектрах амилозы [21] и амилопектинов [22]. Полисахарид давал окрашенный в красный цвет комплекс с иодом [23], максимум поглощения которого в видимой области спектра при 519 нм соответствовал разветвленной структуре амилопектинового типа со средней длиной линейных участков цепей (CL) около 18 остатков α-D-глюкопиранозы. Расчет этого же параметра из соотношения интегральных интенсивностей сигналов аномерных протонов в спектре ¹H-ЯМР [24] привел к несколько более низким значениям CL (порядка 12 - 14 глюкозных остатков). Таким образом, выделенный полисахарид занимает по этому показателю промежуточное положение между типичными гликогенами и амилопектинами.

Хроматографическое разделение кислых полисахаридов (фракция I) на колонке с DEAE-сефацелом при элюции растворами NaCl возрастающей концентрации показало, что главным компонентом этой фракции является сульфатированный ксилогалактан, $[\alpha]_D -77.9^\circ$ (с 0.76; вода). По данным количественных определений, молекулы полисахарида содержат остатки D-галактозы, L-галактозы, D-ксилозы и сульфата в соотношении, очень близком к эквимолярному. Часто встречающиеся в других галактанах моно-O-метилпроизводные галактозы обнаружены лишь в качестве минорных моносахаридов. Характерный компонент большинства сульфатированных галактанов красных водорослей, 3,6-ангидрогалактоза, в нативном ксилогалактане отсутствует, и даже после щелочной обработки полисахарида (ср. [25]) ее содержание составляет всего 0.23%. Сульфатированный ксилогалактан дает своеобразный спектр ¹³C-ЯМР: интенсивные узкие сигналы этого спектра принадлежат пяти углеродным атомам остатков β-D-ксилопиранозы (C1 104.4; C2 74.2; C3 76.7;



Спектр ¹³C-ЯМР альгината натрия (фракция III), выделенного из *B. streptococcus* (область резонансов атомов C6 не показана; G и M – остатки гулуруоната и маннуроната, цифра у символа остатка соответствует номеру углеродного атома).

C4 70.5; C5 66.2 м. д.; их положение практически совпадает с соответствующими сигналами в спектре метил-β-D-ксилопиранозида [26]) и C6 остатков галактопиранозы (61.6 м. д.), тогда как прочие сигналы уширены и разрешены неудовлетворительно. Такой спектр, очевидно, свидетельствует о том, что остатки ксилозы в молекуле полисахарида представлены в виде единичных ответвлений от главной галактановой цепи и не сульфатированы. Детальное установление строения ксилогалактана будет предметом наших дальнейших исследований.

Таким образом, в результате проведенной работы еще на одном примере показано, что известковые водоросли семейства *Corallinaceae* отличаются от других красных водорослей полисахаридным составом. Хотя резервный глюкан, выделенный из *B. cretacea*, аналогичен флоридным крахмалам, содержащимся во многих красных водорослях, ее структурные полисахариды представлены довольно необычным сульфатированным ксилогалактаном и альгиновой кислотой. Как хорошо известно, последняя в красных водорослях, не относящихся к кораллиновым, не обнаружена. Ее присутствие в известковых водорослях может иметь прямое отношение к кальцификации, особенно если учесть преобладание в полимере остатков α-L-гулуриновой кислоты над остатками β-D-маннуриновой, поскольку высоким сродством к двухвалентным катионам в молекулах альгинатов обладают блоки поли-G [13]. С другой стороны, среди бурых водорослей, которые всегда содержат альгинаты, кальцифицированные организмы встречаются весьма редко. Это может означать, что наличие альгиновых кислот в клеточных стенках – необходимое, хотя и недостаточное условие кальцификации, и в кораллиновых водорослях эти биополимеры способствуют отложению карбоната кальция, действуя в сочетании с сульфатированными ксилогалактанами и белковыми компонентами клеточных стенок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Водоросль *B. cretacea* собирали в сентябре 1977 г. в б. Троица зал. Посыета Японского моря. Собранный материал после тщательной сортировки и удаления макроскопических примесей высушивали на воздухе и измельчали до размера частиц <0.1 мм.

Полный гидролиз полисахаридов для количественного определения нейтральных моносахаридов проводили нагреванием в 2 М CF₃COOH (8 ч, 100°C), после чего прибавляли мио-инозит и переводили сахара в ацетаты альдононитрилов, как описано ранее [1]. ГЖХ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890A (США) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-1 и интегратором HP 3393A в ре-

жиме программирования температуры от 175 до 290°C со скоростью 10°/мин. Для определения 3,6-ангидрогалактозы методом ГЖХ использовали методику восстановительного гидролиза полисахаридов в присутствии комплекса 4-метилморфолин – боран [1, 27]. Для определения крахмала полисахаридные фракции инкубировали 24 ч с амилоглюкозидазой (Sigma, США) в 0.1 М ацетатном буфере, pH 4.9, при 50°C (ср. [28]) и освобождающуюся глюкозу анализировали методом ГЖХ.

Содержание сульфата в полисахаридах определяли турбидиметрическим методом после гидролиза 1 М HCl [29], уриновых кислот – спектрофотометрически по реакции с конц. H₂SO₄ и 3,5-диметилфенолом [30] в модификации, описанной в работе [1]; целлюлозу определяли по методике, приведенной в работе [31]. D-Галактозу определяли в гидролизатах полисахаридов с помощью галактоза-дегидрогеназы из набора для анализа лактозы и галактозы (Boehringer, Германия). Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 4050 (LKB, Biochrom, Швеция).

Спектры ¹H-ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 (Германия): для продуктов частичного гидролиза альгиновой кислоты в D₂O при 80°C, как рекомендовано в работе [20], и для 2% раствора флоридного крахмала в D₂O при 90°C, согласно работе [24]. Спектры ¹³C-ЯМР получали на спектрометре Bruker AM-300 (Германия) для 3% растворов полисахаридов в смеси D₂O–H₂O (1 : 9) при 80°C с метанолом (50.15 м. д. от тетраметилсилана) в качестве внутреннего стандарта. Оптическую активность измеряли на поляриметре Jasco DIP-360 (Япония).

Экстракция полисахаридов. К суспензии 100 г измельченной биомассы водоросли в 500 мл воды при перемешивании прибавляли по каплям 180 мл конц. HCl, полученную смесь перемешивали 2 ч при 20°C, нерастворившийся остаток отделяли центрифугированием и обрабатывали тремя порциями по 500 мл 0.1 М HCl в тех же условиях. Объединенные кислые экстракты диализовали против дистиллированной воды, концентрировали в вакууме до 0.5 л и приливали 40 мл 10% водного раствора бромида гексадецилтриметиламмония (цетавлона). Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали водой, перемешивали 1–2 сут при 20°C с тремя порциями по 50 мл 20% этанольного раствора иодида натрия, промывали этанолом и растворяли в воде. Раствор диализовали и лиофилизовали, получали фракцию I кислых полисахаридов, растворимых в холодной воде, в виде Na-солей (выход 0.56 г). Маточный раствор

после отделения цетавлоновых солей кислых полисахаридов диализовали, концентрировали, приливали при перемешивании 4 объема этанола, выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом, ацетоном, эфиром и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Получали фракцию II нейтральных полисахаридов, растворимых в холодной воде (выход 0.11 г).

Остаток водоросли после кислой экстракции суспендировали в небольшом количестве воды, нейтрализовали Na_2CO_3 и затем перемешивали с 3% водным раствором Na_2CO_3 (3 × 600 мл) по 5 ч при 45 - 50°C. Объединенные экстракты осторожно подкисляли конц. HCl до pH около 1, выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали 0.1 M HCl, суспендировали в воде и переводили в раствор, прибавляя небольшими порциями твердый NaOH. Слабощелочной раствор диализовали, затем при перемешивании прибавляли по каплям 3 M $CaCl_2$ до конечной концентрации 2%, выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали водой и перемешивали по 2 ч с четырьмя порциями по 100 мл 0.1 M HCl при 20°C. Затем осадок растворяли в воде, прибавляя NaOH, как описано выше, раствор диализовали и лиофилизовали, получали фракцию Na-соли полиуронида III (выход 0.50 г). Маточный раствор после осаждения полиуронида подкислением диализовали и лиофилизовали, получали фракцию IV (выход 1.58 г).

Остаток водоросли после обработки раствором карбоната натрия экстрагировали водой (5 × 800 мл) по 2 ч при перемешивании и нагревании на кипящей водяной бане. Объединенные экстракты концентрировали и прибавляли цетавлон, как описано выше, получали фракцию V (выход 0.25 г) Na-солей кислых полисахаридов и фракцию VI (выход 1.20 г) нейтральных полисахаридов, растворимых в горячей воде. Остаток после экстракции горячей водой промывали этанолом, ацетоном, эфиром и высушивали, получали фракцию VII (выход 2.32 г).

Определение мономерного состава альгината с помощью восстановления карбоксильных групп и последующего гидролиза. Навеску фракции III (около 10 мг) перемешивали 7 сут при 20°C с 20 мл смеси MeOH-CHCl₃-конц. HCl, 10 : 1 : 1. Смесь центрифугировали, осадок полисахарида промывали этанолом (2 × 20 мл), суспендировали в 2 мл 1 M имидазольного буфера, pH 7.0, охлаждали до 0°C, вносили 400 мг NaBH₄ и перемешивали 1.5 ч при 0°C. Затем осторожно прибавляли 1 мл AsOH, 1 мл воды и 20 мл этанола, осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали этанолом, ацетоном и высушивали в вакууме. Гидролиз этого вещества 2 M CF₃COOH и полученные ацетилированных альдононитрилов проводи-

ли в обычных условиях [1, 27]; методом ГЖХ обнаружили 2,3,4-три-О-ацетил-1,6-ангидро-β-гулозу (А, время удерживания T 5.02 мин), 2,3,4,5,6-пента-О-ацетилманнонитрил (В, T 6.85 мин) и 2,3,4,5,6-пента-О-ацетилгулононитрил (С, T 6.98 мин), идентичные веществам, получаемым при аналогичной обработке заведомого альгината. Из соотношения площадей пиков В/(А + С) рассчитана величина М/Г = 0.58.

Частичный гидролиз альгината. К раствору 40 мг фракции III в 2 мл воды приливали 0.86 мл 1 M HCl, полученную смесь нагревали 5 ч на кипящей водяной бане и охлаждали до 20°C. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, промывали 0.1 M HCl (3 × 2 мл), гидролизат и промывки объединяли и доводили объем полученного раствора водой до 25 мл. Осадок суспендировали в 5 мл воды и переводили в раствор осторожным прибавлением 1 M NaOH; объем полученного раствора также доводили до 25 мл. Концентрацию полиуронидов в растворах определяли по реакции с 3,5-диметилфенолом и конц. H₂SO₄ [1]; в растворимой части гидролизата (блоки поли-МГ) найдено 23%, а в нерастворимой (блоки поли-М и поли-Г) – 69.5% исходного вещества. Раствор гомополимерных блоков лиофилизовали, вещество использовали для получения спектра ¹H-ЯМР. Расчет по методике работы [20] дал для соотношения поли-М/поли-Г величину 0.34.

Очистка и характеристика флоридного крахмала. Раствор 300 мг фракции VI в 15 мл воды наносили на колонку (2.5 × 20 см) с DEAE-сефацелом (Cl⁻-форма). Колонку промывали водой, собирая фракцию, дающую положительную реакцию на углеводы с фенолом и конц. H₂SO₄ [32]. Эту фракцию лиофилизовали, полученное вещество (200 мг) растворяли в 15 мл воды и прибавляли 60 мл этанола, выпавший осадок промывали этанолом, ацетоном и высушивали в вакууме. Выход очищенного флоридного крахмала 170 мг, [α]_D +175.6° (с 1; вода). Вещество давало при кислотном гидролизе только глюкозу, полностью расщеплялось с образованием глюкозы при действии амилоглюкозидазы. Спектр иодного комплекса, полученного по методике работы [23], имел λ_{max} 519 нм. Соотношение интегральных интенсивностей сигналов аномерных протонов с химическими сдвигами 5.11 и 5.50 м. д. в спектре ¹H-ЯМР равно 1 : 13.

Очистка и характеристика сульфатированного ксилоталактана. Фракцию I (300 мг) растворяли в 10 мл воды, небольшой осадок отделяли центрифугированием и супернатант наносили на колонку (4 × 26 см) с DEAE-сефацелом (Cl⁻-форма). Колонку промывали последовательно водой, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 и 1.0 M NaCl, каждый раз до исчезновения положительной реакции элюата с фенолом и конц. H₂SO₄. Солевые элюаты диализовали и лиофилизовали. Выходы фракций составили 10,

10, 220, 20, 20 и 20 мг. Главная фракция, вымываемая с колонки 0.4 М NaCl, $[\alpha]_D -77.9^\circ$ (с 0.76; вода), содержала 34.6% галактозы (из которых, по данным определения с галактоза-дегидрогеназой, на *D*-галактозу приходится 17.9%), 12.9% ксилозы и 10.3% SO₃Na, что соответствует мольному отношению *D*-галактоза : *L*-галактоза : *D*-ксилоза : SO₃Na 1.1 : 1 : 1 : 1. В качестве минорных компонентов в препарате обнаружены также 6-О-метилгалактоза (0.8%), 2-О-метилгалактоза (3.52%), 3-О-метилгалактоза (3.28%), манноза (0.52%) и глюкоза (0.74%).

Определение абсолютной конфигурации ксилозы. Раствор 20 мг сульфатированного ксилогалактана, очищенного хроматографией на DEAE-сефацеле, в 2 мл 2 М CF₃COOH нагревали 8 ч при 100°C, кислоту отгоняли многократным упариванием с этанолом, к высушенному остатку приливали 1 мл (*S*)-(+)-октанола-2 (Fluka, Швейцария) и 2 капли CF₃COOH, после чего смесь нагревали в запаянной ампуле 16 ч при 130°C при периодическом встряхивании (ср. [33]). Полученный раствор многократно упаривали с водой для удаления октанола-2, остаток обрабатывали смесью 1 мл As₂O и 2 мл пиридина 1 ч при 100°C. Далее смесь трижды упаривали с толуолом, для удаления окрашенных примесей к раствору остатка в 3 мл хлороформа прибавляли около 1 г силикагеля *L* (100 - 160 мкм для колоночной хроматографии, Chemapol, ЧСФР), встряхивали, фильтровали и фильтрат использовали для ГЖХ (колонка HP Ultra-2, программирование температуры 200°C (1 мин) → 290°C со скоростью 10°/мин). В полученной смеси наряду с пиками ацетилированных (2*S*)-октил-2-*D*- и (2*S*)-октил-2-*L*-галактозидов обнаружены пики (2*S*)-октил-2-*D*-ксилозидов с временами удерживания 8.1 и 8.5 мин, совпадающие с заведомыми производными *D*-ксилозы, в то время как пики соответствующих производных *L*-ксилозы с временами удерживания 8.2 и 8.4 мин полностью отсутствовали.

Действие щелочи на сульфатированный ксилогалактан. Фракцию I (50 мг) растворяли в 10 мл 1 М NaOH, прибавляли 30 мг NaBH₄, нагревали 6 ч при 80°C, охлаждали, нейтрализовали AcOH, диализовали и лиофилизовали, получали модифицированный щелочью ксилогалактан (выход 40 мг), в составе которого найдены SO₃Na (9.43%) и, с помощью методики восстановительного гидролиза [27], ксилоза (12.5%), глюкоза (0.88%), галактоза (39.3%) и 3,6-ангидрогалактоза (0.23%, в исходной фракции I она отсутствует).

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научного фонда (грант NGT000).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Mar. 1995. V. 38. P. 43 - 51.
2. Giraud G., Cabioch J. // Biol. Cell. 1979. V. 36. P. 81 - 86.
3. Silva P.C., Johansen H.W. // Br. Phycol. J. 1986. V. 21. P. 245 - 254.
4. Turvey J.R., Simpson P.R. // Proc. Int. Seaweed Symp. 1966. V. 5. P. 323 - 328.
5. Cases M.R., Stortz C.A., Cerezo A.S. // Phytochemistry. 1992. V. 31. P. 3897 - 3900.
6. Cases M.R., Stortz C.A., Cerezo A.S. // Int. J. Biol. Macromol. 1994. V. 16. P. 93 - 97.
7. Ozaki H., Maeda M., Nisizawa K. // J. Biochem. 1967. V. 61. P. 497 - 503.
8. Nagashima H., Nakamura S., Nisizawa K. // Bot. Mag. 1969. V. 82. P. 379 - 386.
9. Nagashima H., Ozaki H., Nakamura S., Nisizawa K. // Bot. Mag. 1969. V. 82. P. 462 - 473.
10. Nagashima H., Nakamura S., Nisizawa K., Hori T. // Plant Cell Physiol. 1971. V. 12. P. 243 - 253.
11. Misonou T., Okazaki M., Furuya K., Nisizawa K. // Jpn. J. Phycol. 1980. V. 28. P. 105 - 112.
12. Okazaki M., Furuya K., Tsukayama K., Nisizawa K. // Bot. Mar. 1982. V. 25. P. 123 - 131.
13. Painter T.J. // The Polysaccharides. V. 2 / Ed. G.O. Aspinall. N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 195 - 285.
14. Gorin P.A.J., Spencer J.F.T. // Can. J. Chem. 1966. V. 44. P. 993 - 998.
15. Linker A., Jones R.S. // Nature. 1964. V. 204. P. 187 - 188.
16. Scott J.E., Kyffin T.W. // Biochem. J. 1978. V. 169. P. 697 - 701.
17. Maness N.O., Ryan J.D., Mort A.J. // Anal. Biochem. 1990. V. 185. P. 346 - 352.
18. Fazio S.A., Uhlinger D.J., Parker J.H., White D.C. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 43. P. 1151 - 1159.
19. Skjak-Braek G. // Biochem. Soc. Trans. 1992. V. 20. P. 27 - 33.
20. Penman A., Sanderson G.R. // Carbohydr. Res. 1972. V. 25. P. 273 - 282.
21. Colson P., Jennings H.J., Smith J.C.P. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. P. 8081 - 8087.
22. Dais P., Perlin A.S. // Carbohydr. Res. 1982. V. 100. P. 103 - 116.
23. Archibald A.R., Fleming I.D., Liddle A.M., Manners D.J., Mercer G.A., Wright A. // J. Chem. Soc. 1961. P. 1183 - 1190.
24. Gidley M.J. // Carbohydr. Res. 1985. V. 139. P. 85 - 93.
25. Rees D.A. // J. Chem. Soc. 1961. P. 5168 - 5171.
26. Kovac P., Hirsch J., Shashkov A.S., Usov A.I., Yarotsky S.V. // Carbohydr. Res. 1980. V. 85. P. 177 - 185.
27. Усов А.И., Элашвили М.Я. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 839 - 848.

28. Hassid B., Dickson R. // *Physiol. Plant.* 1979. V. 47. P. 151 - 157.
29. Dodgson K.S., Price R.G. // *Biochem. J.* 1962. V. 84. P. 106 - 110.
30. Scott R.W. // *Anal. Chem.* 1979. V. 51. P. 936 - 941.
31. Updegraff D.M. // *Anal. Biochem.* 1969. V. 32. P. 420 - 424.
32. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. P. 350 - 356.
33. Leontein K., Lindberg B., Lonngren J. // *Carbohydr. Res.* 1978. V. 62. P. 359 - 362.

Polysaccharides from Algae.

49.¹ Isolation of Alginic Acid, Sulfated Xylogalactan, and Floridean Starch from Calcareous Red Alga *Bossiella cretacea* (P. et R.) Johansen (Rhodophyta, Corallinaceae)

A. I. Usov² and M. I. Bilan

Zelinskii Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

Abstract—Sulfated xylogalactan, sodium alginate, and floridean starch were isolated from the calcareous red alga *Bossiella cretacea* by its sequential extraction with dilute hydrochloric acid, sodium carbonate solution, and hot water followed by appropriate purification procedures. Based on the amylolysis results, properties of an iodine complex, and ¹H and ¹³C NMR spectra, the floridean starch was characterized as a branched α -D-glucopyranan of the amylopectin type with the average length of the linear chains being about 14–18 glucose residues. The xylogalactan contains D-galactose, L-galactose, D-xylose, and sulfate in a nearly equimolar ratio and does not contain any 3,6-anhydrogalactose, which was scarcely formed after the alkali treatment of the polysaccharide. The alginic acid was characterized by monosaccharide composition and ¹³C NMR spectrum; it contained more β -D-mannuronic than α -L-guluronic acid residues (the M/G ratio was established as ca. 0.5), and its monosaccharide residues were shown to be arranged in blocks along the polymer chain. The data obtained demonstrate the unusual polysaccharide composition of calcareous red algae belonging to the family Corallinaceae.

Key words: alginate, *Bossiella cretacea*, floridean starch, red algae, sulfated xylogalactan.

¹ For communication 48 of the series see [1].

² To whom correspondence should be addressed.