



УДК 547.458+582.273

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АГАРОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ КРАСНОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Ahnfeltia tobuchiensis*

© 1999 г. С. В. Суховерхов\*, А. И. Усов\*, А. В. Подкорытова, И. А. Кадникова

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (ТИНРО-центр),  
690600, Владивосток, тупик Шевченко, 4;\*Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,  
117913, Москва, Ленинский просп., 47

Поступила в редакцию 15.05.98 г. Принята к печати 25.05.98 г.

Методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии исследованы неочищенные агаровые экстракты, полученные шестикратной экстракцией из *Ahnfeltia tobuchiensis*. Установлено, что в их состав входит агаровая фракция (13.1–42.7%), белково-полисахаридные (53.4–77.2%) и низкомолекулярные примеси (3.9–9.7%). Показано, что степень метилирования агаров последовательных экстракций увеличивается, причем метильные группы расположены только в положении 2 остатков 3,6-ангидрогалактозы. Агары незначительно различаются молекулярной массой и содержанием сульфатов. Увеличение степени метилирования агаров не изменяет температуру гелеобразования и уменьшает температуру плавления гелей.

**Ключевые слова:** агар, агаровые экстракты; высокоэффективная эксклюзионная хроматография (ВЭЭХ); 3,6-ангидрогалактоза; степень метилирования.

Агаром называют гелеобразующий полисахаридный препарат, получаемый из некоторых видов красных водорослей (Rhodophyta). Этот биополимер представляет собой набор линейных молекул, построенных из строго чередующихся производных 3-связанной  $\beta$ -D-галактопиранозы и 4-связанной 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопиранозы (или ее биогенетического предшественника – 6-сульфата  $\alpha$ -L-галактопиранозы), которые могут дополнительно содержать неуглеводные заместители – метильные, сульфатные и 1-карбокситетрагидроксиэтильные группы. Регулярная структура, построенная из повторяющихся дисахаридных звеньев, каждое из которых содержит остаток D-галактозы и остаток 3,6-ангидро-L-галактозы, называется агарозой; такой полисахарид обладает наибольшей склонностью к образованию гелей. Отклонения от этой структуры, особенно замена части остатков 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактозы на остатки 6-сульфата  $\alpha$ -L-галактозы и сульфатирование других гидроксильных групп, приводят к нарушению регулярности структуры полимера и, как правило, снижают гелеобразующие свойства вплоть до их полного исчезновения. Поэтому общее содержание сульфата и молярное отношение производных 3,6-ангидрогалактозы и галактозы (величина A/G, которая равна 1 для идеальной агарозы, а для реальных полисахаридов всегда несколько меньше 1) являются важными параме-

трами, характеризующими практически ценные свойства препаратов агара [1–3].

В Дальневосточном регионе России агар получают из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Mak. по технологической схеме, включающей следующие основные этапы: предварительная обработка водоросли, трехкратная экстракция агара, объединение экстрактов, фильтрация, желирование, очистка агарового геля, обезвоживание и сушка [4–6]. Состав и строение агара из *A. tobuchiensis* были исследованы различными методами, в том числе и с помощью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии [7, 8]. Показано, что полисахарид лишь незначительно отклоняется от структуры агарозы и обычно содержит менее 1% сульфатных групп и около 2.5% метоксильных групп, причем метилированы исключительно положения 2 остатков 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактозы. Однако состав неочищенных агаровых экстрактов, а также различия в структуре и свойствах агаров, переходящих в экстракт при последовательных экстракциях водоросли, практически не изучались. Поэтому цель данной работы – исследование фракционного состава неочищенных агаровых экстрактов из *A. tobuchiensis* и физико-химическая характеристика получаемых из них агаров.

Исследованы неочищенные агаровые экстракты, полученные 6-кратной экстракцией из *A. tobuchiensis*. Первые три экстракции проводили в соответствии с технологической схемой производства агара из *A. tobuchiensis*, последующие три – для

\* Автор для переписки (e-mail: root@tinro.marine.su).

**Таблица 1.** Условия экстракции агаров из *Ahnfeltia tobuchiensis*\*

Экстракция	Экстрагент	Объем, л	Время, ч
1	Дист. вода	8.0	6.5
2	0.8% Ca(OH) <sub>2</sub>	5.4	4.5
3	0.9% Ca(OH) <sub>2</sub>	2.4	2.5
4	1.3% Ca(OH) <sub>2</sub>	0.8	2.0
5	Дист. вода	2.0	1.5
6	Дист. вода	1.0	1.5

\* Данные для 800 г воздушно-сухой водоросли; температура экстракции 120°C.

более полного извлечения агара из водоросли (табл. 1). Для исследования экстрактов, содержащих предположительно полисахариды, белки, пептиды и соли, была применена высокоэффективная эксклюзионная хроматография (ВЭЭХ) как быстрый и удобный метод анализа биополимеров различной природы [9].

Сорбенты, используемые в ВЭЭХ, можно разделить на три группы: 1) немодифицированные сферические силикагели; 2) силикагели, модифицированные гидрофильными, как правило, диольными или полиэфирными группами; 3) гидрофильные полимерные гели различной природы [10]. Для улучшения разделения и увеличения линейного участка калибровочной кривой используют бимодальные наборы колонок – две последовательно соединенные колонки с сорбентами, различающимися размером пор на 1.0–1.5 порядка [9, 11]. Имеются два неэксклюзионных механизма взаимодействия, которые мешают разделению и определению молекулярной массы в ВЭЭХ: это взаимодействие между биополимером и сорбентом и внутримолекулярные электростатические эффекты самого биополимера [12–14]. Неэксклюзионные взаимодействия между биополимером и сорбентом носят, как правило, ионообменный, гидрофобный или адсорбционный характер. Они наиболее характерны для белков при использовании сорбентов первой и, в меньшей степени, второй группы. Для подавления этих эффектов используют элюенты с ионной силой 0.05–0.50 М, варьируют диапазон рН и добавляют органические

модификаторы в подвижную фазу [14–16]. Для сорбентов третьей группы эти взаимодействия не характерны. Внутримолекулярные электростатические эффекты связаны с “солечувствительностью” биополимеров, эффектом, когда небольшое количество электролита может значительно понизить вязкость раствора биополимера. Для подавления внутримолекулярных электростатических эффектов агара достаточно добавления нескольких миллиэквивалентов электролита [17].

На основании вышеизложенного для разделения неочищенных агаровых экстрактов использовали последовательно соединенные колонки с сорбентом третьей группы Shodex Asahipak GS-520 и Shodex Asahipak GS-620 (Showa Denko, Япония), а содержащихся в экстракте солей с избытком хватало для подавления внутримолекулярных электростатических эффектов агара.

Для одновременного детектирования белков и полисахаридов применяли последовательно соединенные УФ-детектор и дифференциальный рефрактометр. Белки детектировали по специфическому поглощению при 280 нм, характерному для остатков тирозина и триптофана [18]. Однако при этой длине волны поглощают и некоторые другие примеси, например нуклеиновые кислоты. Дифференциальный рефрактометр – универсальный (неспецифический) детектор, сигнал которого определяется концентрацией соединения в растворе и практически не зависит от его природы и молекулярной массы [9, 19]. Это позволяет использовать его для детектирования всех компонентов в неочищенных агаровых экстрактах и расчетов их процентного соотношения.

Хроматографическое разделение показало, что неочищенные агаровые экстракты состоят из трех основных компонентов: агаровой фракции с молекулярной массой 1000–1650 кДа, белково-полисахаридных и низкомолекулярных примесей (рисунок, табл. 2). Агаровая фракция выходит первой и не имеет поглощения при 280 нм. Белково-полисахаридным примесям, поглощающим при 280 нм, соответствуют несколько пиков. Их химический состав требует дополнительных исследований. Низкомолекулярные примеси, выходящие последними, не поглощают при 280 нм. В состав

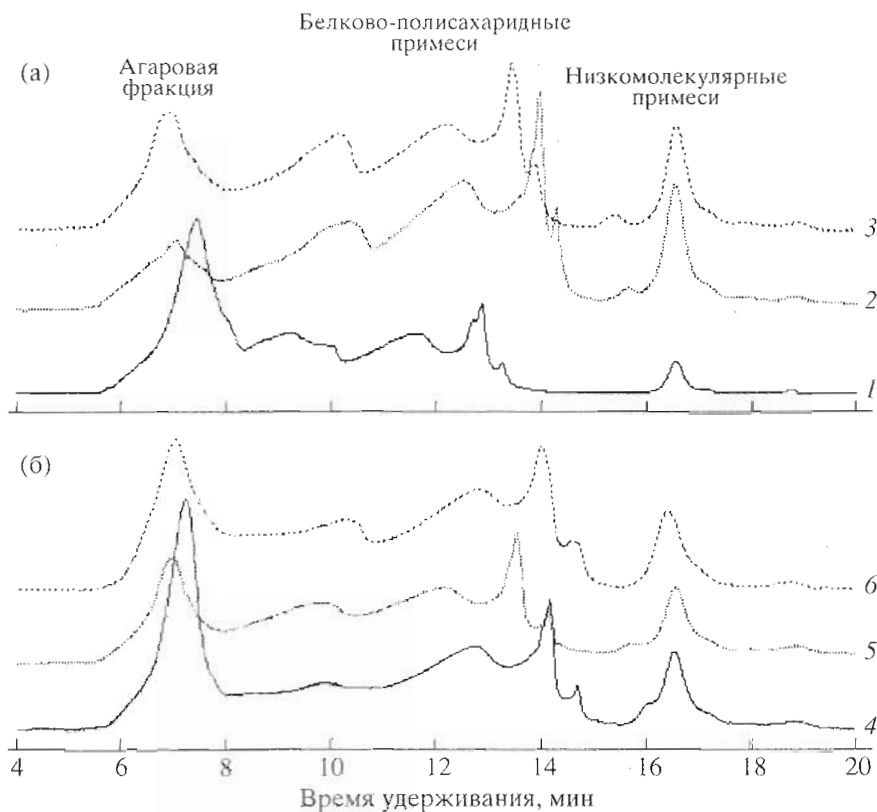
**Таблица 2.** Состав неочищенных агаровых экстрактов из *Ahnfeltia tobuchiensis*

Экстракт	Сухие вещества*	Зола*	Выход агара <sup>2*</sup>	Агаровая фракция <sup>3*</sup>	Белково-полисахаридные примеси <sup>3*</sup>	Низкомолекулярные примеси <sup>3*</sup>
1	1.7	0.15	7.1	42.7	53.4	3.9
2	1.5	0.2	3.3	13.1	77.2	9.7
3	1.3	0.17	1.0	21.5	69.7	8.8
4	1.5	0.17	0.4	33.4	58.5	8.1
5	1.1	0.17	1.5	23.1	68.5	8.7
6	1.3	0.12	0.3	25	67	8

\* Содержание в процентах от общей массы неочищенного экстракта.

<sup>2\*</sup> Проценты от биомассы воздушно-сухих водорослей.

<sup>3\*</sup> Содержание в процентах от общей массы сухих веществ в экстракте, определенное методом ВЭЭХ.



Хроматограммы первых трех (а) и последующих трех (б) агаровых экстрактов из *A. tobuchiensis* (номера кривых соответствуют номеру экстракта). Бимодальный набор колонок Shodex Asahipak GS-520 + GS-620, элюент – дистиллированная вода, детектор – дифференциальный рефрактометр.

этой фракции входит  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , соли и, вероятно, низкомолекулярные продукты деструкции агара. Процентное соотношение этих фракций приведено в табл. 2.

Для агаров, полученных из экстрактов, определяли молекулярную массу ( $M_n$ ), моносахаридный состав и содержание сульфата (табл. 3). Поскольку известно, что в агаре из *A. tobuchiensis* содержится 3,6-ангидро-*L*-галактоза и ее 2-*O*-метилпроизводное, то при анализе моносахаридного состава нельзя было воспользоваться распространенными методами определения 3,6-ангидрогалактозы, основанными на ее деструкции [20–22] и не позволяющими отдельно определять два названных моносахарида. Поэтому мы воспользовались разработанным специально для этой цели методом восстановительного гидролиза, который заключается в обработке полисахарида кислотой в присутствии 4-метилморфолинборана [23]. Этот реагент восстанавливает освобождающиеся при гидролизе производные 3,6-ангидрогалактозы в соответствующие полиолы, что защищает их от кислотной дегградации и позволяет затем отдельно определять 3,6-ангидродульцит и 2-*O*-метил-3,6-ангидродульцит в виде ацетатов методом ГЖХ [23, 24]. Содержание сульфатов в агарах определяли по Доджсону [25].

Агары, извлекаемые последовательной экстракцией из *A. tobuchiensis*, незначительно разли-

чаются по молекулярной массе и содержанию сульфатов (табл. 3). При последовательных экстракциях содержание 3,6-ангидрогалактозы в агаре уменьшается и соответственно увеличивается содержание 2-*O*-метил-3,6-ангидрогалактозы, т.е. увеличивается степень метилирования агаров. Очевидно, в результате метилирования возрастает гидрофобность агаров и соответственно уменьшается их растворимость в воде. Основываясь на этом свойстве, ранее был предложен способ получения фракций агара с повышенной степенью метилирования путем предварительной экстракции водорослей водным этанолом [26]. В отличие от этого способа в нашем случае наиболее метилированные фракции извлекаются из водоросли в последнюю очередь.

Полученные фракции позволяют проследить влияние метилирования на физико-химические свойства агаровых гелей. Из литературы известно, что метилирование положения 6 остатков галактозы в молекуле агарозы приводит к повышению температуры гелеобразования [27, 28], а метилирование остатка 3,6-ангидрогалактозы вызывает противоположный эффект [28]. Метильные группы в обоих указанных положениях при высоких степенях замещения могут вызвать существенное повышение точки плавления геля [29]. Для агаров из *A. tobuchiensis* не обнаружено заметного влияния

Таблица 3. Физико-химическая характеристика агаров из *Ahnfeltia tobuchiensis*

Агар	$M_w$ , кДа	2-О-Метил-3,6-Аг*	3,6-Аг*	Gal*	А/Г <sup>2</sup> *	Сульфат, %	Прочность <sup>3*</sup> , г/см <sup>2</sup>	$t_{пл}^{3*}$	$t_{заст}^{3*}$
								°С	°С
1	1560	5.6	32.2	50.9	0.82 : 1	0.2	600	89	35
2	1620	8.1	32.2	46.9	0.95 : 1	0.3	700	89	36.5
3	1630	9.4	29.3	47.2	0.90 : 1	0.3	700	87.5	36
4	1650	12.1	28.5	48.2	0.92 : 1	0.2	685	83.5	34.5
5	1650	12.9	27.3	45.5	0.97 : 1	0.7	480	82.5	36.5
6	1630	13	26.3	44.3	0.97 : 1	0.5	370	80	35

\* Содержание в процентах в расчете на ангидрозвено (3,6-Аг – 3,6-ангидрогалактоза).

<sup>2</sup>\* Молярное отношение производных 3,6-ангидрогалактозы и галактозы.

<sup>3</sup>\* Характеристика геля.

степени метилирования на температуру гелеобразования, но показано, что с увеличением содержания 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы температура плавления 0.85%-ных гелей уменьшается (табл. 3).

Таким образом, показана возможность использования ВЭХ для анализа фракционного состава неочищенных агаровых экстрактов из *A. tobuchiensis*. Определено, что в их состав входит агаровая фракция, белково-полисахаридные и низкомолекулярные примеси. Установлено, что агары, извлекаемые последовательной экстракцией, достоверно различаются только степенью метилирования, и незначительно – молекулярной массой и содержанием сульфатов. Увеличение степени метилирования не приводит к увеличению температуры гелеобразования и понижает температуру плавления гелей агара.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах использовали красную водоросль *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Mak., добытую в июле 1996 г. в прол. Старка, зал. Петра Великого (Россия, Приморский край). Водоросль очищали от ракушечника, диатомовых водорослей, промывали морской водой и сушили на воздухе.

**Экстракция и очистка агаров.** 800 г воздушно-сухой водоросли предварительно обрабатывали 12 л 2%-ной суспензии Са(ОН)<sub>2</sub>, 2 ч при 110°C, раствор сливали и промывали водоросли водопроводной водой. Шестикратное экстрагирование агара проводили при температуре 120°C в соответствии с условиями, приведенными в табл. 1. Горячие экстракты фильтровали под вакуумом через картонный фильтр со слоем диатомита, охлаждали и желировали. Агаровые гели измельчали и несколько раз промывали водопроводной водой, затем проводили дополнительную очистку геля диализом в дистиллированной воде в течение 10–12 ч. Промытые гели замораживали, размораживали, обезвоживали ацетоном и досушивали на воздухе.

**Определение фракционного состава неочищенных экстрактов и молекулярной массы ага-**

**ров.** При исследовании агаровых экстрактов 1 мл экстракта разводили 4 мл дистиллированной воды и фильтровали через мембранный фильтр Kurabo 25A (Япония) с размером пор 0.45 мкм. Для характеристики сухих агаровых препаратов 5 мг сухого агара растворяли при нагревании в 2.5 мл дистиллированной воды, к полученному раствору добавляли 2.5 мл 0.2 М раствора NaNO<sub>3</sub> и фильтровали через мембранный фильтр.

Для ВЭХ использовали жидкостный хроматограф Shimadzu LC-6A, состоящий из насоса LC-6A, дегазатора DGU-2A, автоматического инжектора SIL-6B, блока управления SCL-6B, термостата колонок STO-6A, УФ-детектора SPD-6A (280 нм) и дифференциального рефрактометра RID-6A. Запись и обработку хроматограмм проводили интегратором CHROMATOPAC C-R4A (Shimadzu, Япония). Разделение осуществляли на последовательно соединенных колонках Shodex Asahipak GS-520 7E и Shodex Asahipak GS-620 7E (Showa Denko, Япония), термостатированных при 45°C. Элюент – дистиллированная вода, скорость – 1 мл/мин. Бимодальный набор колонок калибровали по 0.1%-ым водным растворам декстранов 10T, 20T, 40T, 70T, 80T, 110T, 250T, 500T и голубому декстрану 2000T (Pharmacia Biotech, Швеция).

Моносахаридный состав определяли методом восстановления гидролиза с последующим ГЖХ-анализом [23]. ГЖХ выполняли на газовом хроматографе Hewlett-Packard 5890A с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-1 и интегратором Hewlett-Packard 3393A. Газ-носитель – азот, градиент температуры от 175 до 290°C, 10°C/мин. Внутренний стандарт – инозит. Коэффициент молярного отклика по отношению к ацетату инозита для 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы и 3,6-ангидрогалактозы – 0.58, для галактозы – 0.5.

Количественное определение сульфатных групп проводили турбидиметрическим методом после гидролиза полисахарида в 1 н. HCl по Доджсону [25]. Прочность 0.85%-ого геля агара, температуру плавления и гелеобразования определяли по ГОСТу 26-185-84 [30].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Painter T.J.* // The Polysaccharides. Vol. 2 / Ed. G.O. Aspinall. New York: Acad. Press, 1983. P. 195–285.
2. *Усов А.И.* Прогресс химии углеводов. М.: Наука, 1985. С. 77–96.
3. *Selby H.H., Whistler R.L.* // Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives. Third Edition / Eds R.L. Whistler and J.N. BeMiller. San Diego: Acad. Press, 1993. P. 87–103.
4. *Кизеветтер И.В.* // Изв. ТИНРО. 1952. Т. 36. С. 226–233.
5. *Кизеветтер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А.* Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений. М.: Пищ. пром-сть, 1967. С. 16–94.
6. *Кизеветтер И.В., Суховеева М.В., Шмелькова Л.П.* Промысловые водоросли и травы дальневосточных морей. М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1981. С. 86–93.
7. *Труус К.* Исследование строения и модификации агара из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*. Дис. ... канд. хим. наук. М.: ИОХ РАН, 1994. 26 с.
8. *Труус К., Вялимяе Т., Коллист А., Вахер М.* // Изв. АН ЭССР. Химия. 1988. Т. 37. С. 190–194.
9. *Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. С. 52–77.
10. *Членов М.А.* Высокоэффективная жидкостная хроматография в разработке медицинских препаратов на основе биополимеров: Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. М.: Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии НПО "Биотехнология", 1991. С. 6–7.
11. *Yau W.W., Grinnard C.R., Kirkland J.J.* // J. Chromatogr. 1978. V. 149. P. 465–487.
12. *Barth H.G., Regnier F.E.* // J. Chromatogr. 1980. V. 192. P. 275–293.
13. *Barth H.G.* // J. Liquid Chromatogr. 1980. V. 3. P. 1481–1496.
14. *Barth H.G.* // J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. P. 409–429.
15. *Лотшпайх Ф., Хеншен А.* // Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: Пер. с англ. / Ред. А. Хеншен, К.-П. Хупе, Ф. Лотшпайх, В. Вельтер. М.: Мир, 1988. С. 238–247.
16. *Уотерфилд М.Д.* // Практическая химия белка: Пер. с англ. / Ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. С. 198–207.
17. *Кизеветтер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А.* Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений. М.: Пищ. пром-сть, 1967. С. 187–189.
18. *Прузик З.* // Жидкостная колоночная хроматография: Пер. с англ. / Ред. Дейл З., Мацек К., Янак Я. М.: Мир, 1978. С. 456–458.
19. *Хупе К.-П., Розинг Г., Шренкер Х.* // Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: Пер. с англ. / Ред. А. Хеншен, К.-П. Хупе, Ф. Лотшпайх, В. Вельтер. М.: Мир, 1988. С. 125–129.
20. *Yaphe W., Arsenaull G.P.* // Anal. Biochem. 1965. V. 13. P. 143–148.
21. *Anderson W., Bowtle W.* // Analyst. 1974. V. 99. P. 178–183.
22. *Matsushiro B., Zanlungo A.B.* // Carbohydr. Res. 1983. V. 118. P. 276–279.
23. *Усов А.И., Элашвили М.Я.* // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. С. 839–848.
24. *Usov A.I.* // Hydrobiologia. 1993. V. 260/261. P. 641–645.
25. *Dodgson K.S., Price R.G.* // Biochem. J. 1962. V. 84. P. 106–110.
26. *Lahaye M., Rochas C., Yaphe W.* // Can. J. Bot. 1986. V. 64. P. 579–585.
27. *Guiseley K.B.* // Carbohydr. Res. 1970. V. 13. P. 247–256.
28. *Hirase S., Ikumoto T., Tomiyama K., Miura Y.* // Seito Gijutsu Kenkyu Kaishi. 1993. V. 41. P. 77–83. С.А. 1994. V. 121. 203662g.
29. *Falshaw R., Furneaux R.H., Stevenson D.E.* // Carbohydr. Res. 1998. V. 308. P. 107–115.
30. ГОСТ 26-185-84. Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа. М.: Изд-во стандартов, 1984. С. 23–50.

## A Chromatographic Study of Agar Extracts from the Red Alga *Ahnfeltia tobuchiensis*

S. V. Sukhoverkhov<sup>\*\*</sup>, A. I. Usov<sup>\*\*</sup>, A. V. Podkorytova<sup>\*</sup>, and I. A. Kadnikova<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Pacific Fisheries Research Center (TINRO-Center), tupik Shevchenko 4, Vladivostok, 690600 Russia

<sup>\*\*</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 47, Moscow, 117913 Russia

The red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* was successively extracted six times, and the resulting crude agar extracts were characterized by high-performance size exclusion chromatography. An agar fraction (13.1–42.7%), protein-polysaccharide contaminants (53.4–77.2%), and low-molecular mass impurities (3.9–9.7%) were found in the extracts. In successive extracts, the degree of methylation of agar molecules was shown to increase, the methyl groups being located only in position 2 of 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactose residues. The differences in molecular mass and sulfate content between the different agar extracts were insignificant. An increase in the methylation degree of agars does not affect their gelation temperature and only decreases the melting point of the agar gels.

**Key words:** agar, agar extracts; high-performance size exclusion chromatography; 3,6-anhydrogalactose; methylation degree

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: root@tinro.marine.su.