

Полисахариды водорослей

Сообщение 69*. Моносахаридный состав полисахаридов некоторых тихоокеанских красных водорослей по данным восстановительного гидролиза биомассы

Н. А. Лопатина,^а Н. Г. Клочкова,^б А. И. Усов^{в*}

^аКамчатский филиал Тихоокеанского института географии
Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Российская Федерация, 683000 Петропавловск-Камчатский,
Партизанская ул., 6

^бКамчатский государственный технический университет,
Российская Федерация, 683000 Петропавловск-Камчатский, Ключевская ул., 35.
E-mail: ninakl@mail.ru

^вИнститут органической химии им. Н. Д. Зелинского
Российской академии наук,
Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинский просп., 47.
Факс: (499) 135 5328. E-mail: usov@ioc.ac.ru; miranda-n@yandex.ru

Проведен анализ полисахаридного состава биомассы 23 видов красных водорослей, собранных на побережье Камчатки и Командорских островов. Полный кислотный гидролиз биомассы проводили в присутствии комплекса боран—4-метилморфолин в условиях, при которых освобождающаяся из сульфатированных галактанов 3,6-ангидрогалактоза восстанавливается в 3,6-ангидродульцит и не подвергается кислотной деградации. Частичный гидролиз биомассы в присутствии этого восстановителя приводил к получению диастереомерных агаробииита или каррабииита (3,6-ангидро-4-*O*- β -D-галактопиранозил-L- или -D-дульцита соответственно), идентификация которых позволила отнести содержащиеся в водорослях галактаны к агарам или каррагинанам. Полученные данные использованы для подтверждения корреляций между таксономическим положением и полисахаридным составом красных водорослей.

Ключевые слова: красные водоросли, полисахариды, моносахаридный состав, восстановительный гидролиз, агары, каррагинаны.

Красные водоросли (Rhodophyta — отдел, насчитывающий свыше 5000 видов) содержат уникальные полисахариды, которые не встречаются в других природных объектах². Наибольшее практическое применение из них имеют сульфатированные галактаны, такие как агары и каррагинаны, используемые в качестве гелеобразователей и структурирующих агентов в пищевой и фармацевтической промышленности, микробиологии, биотехнологии и медицине^{3–6}. Линейные молекулы галактанов построены из чередующихся остатков 3-связанной β -D-галактопиранозы и 4-связанной α -галактопиранозы или ее 3,6-ангидро-производного, причем 4-связанный остаток имеет L-конфигурацию в полисахаридах группы агара и D-конфигурацию в каррагинанах. Хорошие гелеобразующие свойства проявляют регулярные полисахариды с высоким содержанием остатков 3,6-ангидрогалактозы, практически лишенные сульфата (агароза) в агарах, либо с регулярным расположением сульфатных групп в каррагинанах⁷. Однако такие регулярные структуры в природных источниках встречаются достаточно редко. Подавляющее большинство

видов водорослей содержат гибридные формы галактанов, молекулы которых построены из дисахаридных звеньев, различающихся наличием или отсутствием 3,6-ангидрогалактозы и положением сульфатных групп. В наиболее сложных галактанах (так называемых DL-гибридах) одновременно присутствуют звенья, характерные для агаров и каррагинанов. Несмотря на то что полисахаридный состав широко распространенных красных водорослей хорошо изучен, поиск новых источников практически ценных полисахаридов продолжает оставаться актуальной задачей. Сведения о полисахаридном составе отдельных видов могут также использоваться для решения ряда сложных вопросов в систематике красных водорослей^{2,8}.

С практической точки зрения важными характеристиками галактанов являются абсолютная конфигурация и количественное содержание 3,6-ангидрогалактозы. Получение этих сведений затруднено специфическими свойствами этого моносахарида, который полностью разрушается в стандартных условиях кислотного гидролиза, применяемого для анализа моносахаридного состава полисахаридов. Для предотв-

ращения кислотной деградации 3,6-ангидрогалактозы предложены методики восстановительного гидролиза (нагревание полисахаридов с кислотой в присутствии комплекса боран—4-метилморфолин), в результате чего в процессе кислотного расщепления полисахаридов остатки 3,6-ангидрогалактозы превращаются в устойчивый к кислотам 3,6-ангидродульцит, пригодный для количественного анализа^{9–13}. Гликозидные связи остатков 3,6-ангидрогалактозы расщепляются гораздо легче гликозидных связей остатков галактозы. Поэтому, если проводить не полный, а частичный восстановительный гидролиз галактанов, то можно получить восстановленные дисахариды, 3,6-ангидро-4-*O*- β -D-галактопиранозил-D-дульцит (каррабиит) из каррагинанов и 3,6-ангидро-4-*O*- β -D-галактопиранозил-L-дульцит (агаробиит) из агаров^{9,10,12}. Эти вещества являются диастереомерами и хорошо разделяются при хроматографии, что позволяет определять абсолютную конфигурацию остатков 3,6-ангидрогалактозы. Для проведения полного и частичного восстановительного гидролиза с контролем результатов методом газо-жидкостной хроматографии требуются очень небольшие количества биомассы. Метод позволяет сравнительно быстро получить сведения о моносахаридном составе образца и отнести присутствующий там галактан к группе агара или каррагинана. Такой подход был эффективно использован ранее для характеристики полисахаридов значительного числа видов красных водорослей, собранных у побережья Камчатки¹⁴. Настоящая работа посвящена продолжению этих исследований на примере новых образцов водорослей, собранных на Камчатке и Командорских островах.

Обсуждение полученных результатов

Перечень образцов красных водорослей, использованных для исследования, приведен в таблице 1. Методика полного восстановительного гидролиза, пригодная для анализа моносахаридного состава гидролизатов биомассы водорослей, описана в нашей предыдущей статье¹⁴. Отличие методики, использованной в данной работе, состояло лишь в том, что моносахариды в гидролизатах идентифицировали не в виде ацетатов альдонитрилов, а в виде ацетатов полиолов. Несмотря на то что превращение в альдонитрилы позволяет разделить ацетаты ксилонитрила и 3,6-ангидродульцита, оно не является количественной реакцией и приводит к заметному разбросу результатов в параллельных опытах. Перевод моносахаридов в ацетаты полиолов представляет более надежную процедуру, однако ацетаты ксилита и 3,6-ангидродульцита нельзя разделить методом ГЖХ. Для отдельного определения ксилозы и 3,6-ангидрогалактозы параллельно с восстановительным гидролизом биомассы мы проводили обычный гидролиз, при котором 3,6-ангидрогалактоза разрушается полностью и не мешает определению ксилозы.

Таким образом, в целом каждый образец биомассы подвергался обработке в четырех вариантах усло-

вий. Во-первых, полный гидролиз без восстановителя позволял оценить содержание в гидролизате всех моносахаридов, включая ксилозу, кроме 3,6-ангидрогалактозы. Во-вторых, выполняемый параллельно полный восстановительный гидролиз давал возможность определить эти величины еще раз для всех моносахаридов, кроме ксилозы и 3,6-ангидрогалактозы, которые определялись в сумме. Содержание 3,6-ангидрогалактозы рассчитывали по разности этих двух опытов и использовали для расчета мольного соотношения этого моносахарида и суммы галактозы и 6-*O*-метилгалактозы (так называемого коэффициента А/Г), важного параметра для оценки регулярности строения галактанов и их потенциальной склонности к образованию гелей. Третий вариант анализа включал предварительную щелочную обработку биомассы с последующим полным восстановительным гидролизом. Этот этап проводился с целью увеличения содержания 3,6-ангидрогалактозы в том случае, если в молекулах галактанов имелись остатки 4-связанного 6-сульфата галактозы, которые, как хорошо известно, достаточно легко превращаются в остатки 3,6-ангидрогалактозы под действием оснований¹⁵. Щелочная обработка приводила в ряде случаев к заметному возрастанию коэффициента А/Г. Наконец, четвертый вариант анализа представлял собой частичный восстановительный гидролиз образцов биомассы, предварительно обработанных щелочью, с последующим качественным определением образующихся восстановленных дисахаридов, агаробиита или каррабиита. К сожалению, этот анализ не давал надежных сведений при низких значениях коэффициента А/Г. Полученные результаты суммированы в таблице 2. Чтобы не загромождать таблицу обилием цифр, мы приводим усредненные по всем определениям величины содержания моносахаридов, а результаты химической модификации галактанов иллюстрируем значениями А/Г до и после щелочной обработки биомассы. В таблице 2 не приведено содержание минорных компонентов галактанов, таких как 2-*O*-метил-3,6-ангидрогалактоза, 2-*O*-метилгалактоза и 4-*O*-метилгалактоза, которые в большинстве случаев присутствовали на уровне следов. Включенные в таблицу 2 значения для ксилозы и маннозы позволяют оценить содержание в биомассе двух других структурных полисахаридов, ксилана и маннана, которые по сравнению с галактанами в подавляющем большинстве случаев являются минорными компонентами клеточных стенок. Приведенные величины для глюкозы отражают содержание резервного полисахарида, так называемого флоридного крахмала. В отличие от структурных полисахаридов эта величина для каждого вида водорослей может значительно изменяться в зависимости от условий обитания и физиологического состояния организма.

Первые четыре образца, приведенные в таблице 2, принадлежат к порядку Bangiales. Два из них, представители рода *Wildemania*, упомянуты в работе¹⁴ под прежним названием *Porphyra*. Новые образцы двух этих видов, собранные годом позже, проанализиро-

Таблица 1. Образцы водорослей для анализа полисахаридного состава биомассы

Обра- зец	Вид	Порядок, семейство	Время и место сбора образцов водорослей
1	<i>Porphyra ochotensis</i> Nagai	Bangiales, Bangiaceae	18.07.1991, бух. Саранная, литораль
2	<i>Pyropia abbotae</i> (Krishnamurthy) Lindstrom	Bangiales, Bangiaceae	25.07.1990, Авачинский зал., б. Лагерная, литораль
3	<i>Wildemania miniata</i> (C.Agardh) Foslie	Bangiales, Bangiaceae	18.07.1991, бух. Саранная, сублиторальные выбросы
4	<i>Wildemania variegata</i> (Kjellman) De Toni	Bangiales, Bangiaceae	15.07.1991, Авачинский зал., бух. Лагерная, гл. 3–5 м
5	<i>Constantinea rosa-marina</i> (Gmel.) Postels & Ruprecht	Gigartinales, Dumontiaceae	8.07.2015, Авачинский зал., бух. Спасения, гл. 7–8 м
6	<i>Constantinea simplex</i> Setchell	Gigartinales, Dumontiaceae	14.08.2015, о. Беринга, бух. Непропускная, выбросы
7	<i>Constantinea sitchensis</i> Postels & Ruprecht	Gigartinales, Dumontiaceae	3.07.2014, Авачинский зал., бух. Безымянная, гл. 5–7 м
8	<i>Opuntiella ornata</i> (Postels & Ruprecht) A.D. Zinova	Gigartinales, Furcellariaceae	24.08.2012, Авачинский зал., бух. Спасения, гл. 8 м
9	<i>Turnerella mertensiana</i> (Postels & Ruprecht) F. Schmitz	Gigartinales, Furcellariaceae	А) 16.05.2000, зал. Корфа, выбросы, жесткие темноокрашенные пластины Б) 6.06.2008, Юго-Восточная Камчатка, б. Безымянная, гл. 2–4 м, тонкие розовые талломы
10	<i>Mastocarpus pacificus</i> (Kjellman) Perestenko	Gigartinales, Phyllophoraceae	25.07.1990, Авачинский зал., бух. Лагерная, литораль
11	<i>Callophyllis rhynchocarpa</i> Ruprecht	Gigartinales, Kallymeniaceae	16.07.1991, Авачинский зал., бух. Безымянная, выбросы
12	<i>Cirrucarpus ruprechtianum</i> (E.S.Sinova) Perestrenko	Gigartinales, Kallymeniaceae	15.07.1991, Авачинский зал., бух. Лагерная, выбросы
13	<i>Hommersandia palmatifolia</i> (Tokida) Perestenko	Gigartinales, Kallymeniaceae	21.07.1991, Авачинский зал., бух. Вилочинская, гл. 18–20 м
14	<i>Kallymeniopsis lacera</i> (Postels & Ruprecht) Perestenko	Gigartinales, Kallymeniaceae	11.07.2014, Авачинский зал., бух. Спасения, гл. 6–7 м
15	<i>Velatocarpus pustulosus</i> (Postels & Ruprecht) Perestenko	Gigartinales, Kallymeniaceae	13.08.2013, Авачинский зал., м. Казак, гл. 7–8 м
16	<i>Neoabbottiella decipiens</i> N.G.Klochkova & N.A.Pisareva	Halymeniales, Halymeniaceae	А) 11.07.2014, о. Старичков, гл. 16–17 м (таллом инфицирован диатомовыми водорослями) Б) 15.07.2014, Авачинский зал., бух. Лиственничная, гл. 10–15 м (стерильное без диатомовых)
17	<i>Halosaccion hydrophorum</i> (Postels & Ruprecht) Kützling	Palmariales, Palmariaceae	А) 14.07.1991, Авачинский зал., бух. Лагерная, литораль Б) 22.07.2002, о. Беринга, п. Никольское, литораль
18	<i>Sparlingia pertusa</i> (Postels & Ruprecht) G.W.Saunders, I.M.Strachan & Kraft	Rhodymeniales, Rhodymeniaceae	3.07.2014, Авачинский зал., бух. Безымянная, гл. 5–7 м
19	<i>Sparlingia stipitata</i> (Kylin) Klochkova	Rhodymeniales, Rhodymeniaceae	28.07.1991, Авачинский зал., Три Брата, гл. 15–16 м
20	<i>Heteroglossum carnosum</i> (Mikami) Perestenko	Ceramiales, Delesseriaceae	06.07.1990, Авачинский зал., бух. Саранная, выбросы
21	<i>Mikamiella ruprechtiana</i> (A.D.Zinova) M.J.Wynne	Ceramiales, Delesseriaceae	15.07.1991, Авачинский зал., бух. Лагерная, выбросы
22	<i>Odonthalia corymbifera</i> (S.G.Gmelin) Greville	Ceramiales, Rhodomelaceae	15.07.1991, Авачинский зал., бух. Лагерная, выбросы
23	<i>Neoptilota asplenioides</i> (Esper) Kylin ex Scagel, Garbary, Golden & Hawkes	Ceramiales, Wrangeliaceae, tribe Ptiloteae	5.07.1991, Авачинский зал., б. Лагерная, выбросы, образцы А-В, различающиеся по внешнему виду

Таблица 2. Моносахаридный состав полисахаридов водорослей (по данным восстановительного гидролиза биомассы)

Образец	Водоросль	Xyl	6-Me-Gal	3,6-AGal	Man	Glc	Gal	A/G	Агаробиит	Каррабиит
1	<i>Porphyra ochotensis</i>	1.2	2.6	4.8	4.3	5.3	30.4	0.16 (1.12)	+	—
2	<i>Pyropia abbotae</i>	0.6	1.5	2.7	2.6	10.6	22.6	0.13 (0.70)	+	—
3	<i>Wildemania miniata</i>	—	1.8	3.1	3.0	5.8	29.2	0.12	—	—
4	<i>Wildemania variegata</i>	—	3.2	4.5	2.0	4.5	31.8	0.15	—	—
5	<i>Constantinea rosa-marina</i>	1.3	0.5	0.4	0.9	12.5	27.0	0.02 (0.04)	—	—
6	<i>Constantinea simplex</i>	1.8	0.9	0.5	0.6	7.7	16.9	0.03 (0.04)	—	—
7	<i>Constantinea sitchensis</i>	2.0	0.8	0.3	0.5	13.1	19.6	0.02 (0.04)	—	—
8	<i>Opuntiella ornata</i>	0.4	—	8.3	0.4	13.4	22.2	0.42 (0.58)	—	+
9	<i>Turnerella mertensiana</i> Образец А	—	—	5.4	—	27.5	17.9	0.33 (0.58)	—	—
	Образец Б	—	—	7.7	0.1	2.6	32.5	0.27 (0.52)	—	+
10	<i>Mastocarpus pacificus</i>	0.7	0.1	0.3	0.2	6.2	23.6	0.01 (0.32)	—	+
11	<i>Callophyllis rhynchocarpa</i>	—	—	1.6	—	2.2	21.3	0.08	—	—
12	<i>Cirrulicarpus ruprechtianum</i>	—	—	0.9	0.2	3.2	23.9	0.05	—	—
13	<i>Hommersandia palmatifolia</i>	—	0.3	3.2	0.4	6.2	26.3	0.15	—	—
14	<i>Kallymeniopsis lacera</i>	—	—	0.5	0.3	9.8	24.3	0.02	—	—
15	<i>Velatocarpus pustulosus</i>	0.9	—	—	0.3	22.9	20.9	—	—	—
16	<i>Neoabbottiella decipiens</i> Образец А	—	3.4	1.4	—	17.7	21.3	0.06	—	—
	Образец Б	—	4.3	2.2	0.2	6.6	28.4	0.08 (0.06)	—	—
17	<i>Halosaccion hydrophorum</i> Образец А	25.7	—	Сл.	—	—	5.7	—	—	—
	Образец Б	42.6	—	Сл.	0.4	0.6	6.2	—	—	—
18	<i>Sparlingia pertusa</i>	—	—	Сл.	0.3	42.1	18.0	— (0.07)	—	—
19	<i>Sparlingia stipitata</i>	0.4	—	0.4	0.2	6.6	23.7	0.02 (0.06)	—	—
20	<i>Heteroglossum carnosum</i>	0.4	—	8.3	0.2	2.4	20.3	0.46 (0.63)	—	+
21	<i>Mikamiella ruprechtiana</i>	1.6	0.4	1.6	0.6	5.5	22.5	0.08 (0.08)	—	—
22	<i>Odonthalia corymbifera</i>	—	4.8	5.9	1.8	3.3	10.0	0.46	—	—
23	<i>Neoptilota asplenioides</i> Образец А	—	5.7	7.7	1.2	5.0	10.6	0.62	+	—
	Образец Б	—	4.6	5.5	0.8	5.4	7.3	0.54	—	—
	Образец В	—	2.8	4.8	1.0	9.0	7.8	0.57	—	—

Примечания. Xyl — ксилоза, 6-Me-Gal — 6-О-метилгалактоза, 3,6-AGal — 3,6-ангидрогалактоза, Man — манноза, Glc — глюкоза, Gal — галактоза, A/G — мольное отношение 3,6-ангидрогалактозы к сумме 6-О-метилгалактозы и галактозы (в скобках — после щелочной обработки биомассы).

ваны для оценки воспроизводимости результатов, тогда как другие два вида ранее не исследовались. Следует отметить большое сходство результатов для всех

четырех образцов. Нативные галактаны содержат заметные количества 6-О-метилгалактозы, но имеют довольно низкие значения коэффициента A/G, кото-

рые существенно возрастают после щелочной обработки. Агаробиит, обнаруживаемый в результате частичного восстановительного гидролиза, доказывает принадлежность этих галактанов к группе агара. Полисахариды такого типа называют порфиранами по имени первого подробно изученного представителя, который был выделен из *Porphyra umbilicalis*¹⁶. Очевидно, что порфираны типичны для представителей порядка Bangiales². Другим характерным свойством этих видов является повышенное содержание в гидролизатах маннозы по сравнению с прочими образцами.

Ранее¹⁴ уже сообщалось о результатах гидролиза биомассы *Constantinea rosa-marina*. В настоящей работе были заново исследованы многочисленные образцы этого вида, различающиеся возрастом и местообитанием, а также два других представителя этого рода, *C. simplex* и *C. sitchensis*. Во всех случаях получены сходные результаты. Высокое содержание глюкозы в гидролизатах всех трех видов соответствует литературным данным о том, что представители рода *Constantinea* являются богатым источником флоридного крахмала¹⁷. В то же время галактаны оказались необычными по составу и поведению при химической модификации, поскольку отличались очень малым содержанием 3,6-ангидрогалактозы, которое лишь незначительно возрастало в результате щелочной обработки. Низкие значения А/Г не позволили с уверенностью определить абсолютную конфигурацию 3,6-ангидрогалактозы и тем самым отнести галактаны к группе агара или каррагинана. Ранее¹⁴ *C. rosa-marina* была описана как вид, принадлежащий порядку CRYPTONEMIALES. В настоящее время в результате существенного пересмотра классификации водорослей этого порядка больше не существует, а семейство Dumontiaceae, к которому относится *C. rosa-marina*, включено в порядок Gigartinales. С нашей точки зрения это решение нельзя признать удачным, поскольку при этом не были приняты к сведению данные о строении сульфатированных галактанов. Виды водорослей, принадлежащие к порядку Gigartinales, хорошо известны как источник каррагинанов², тогда как представители семейства Dumontiaceae, согласно весьма ограниченному литературным данным^{18,19}, содержат галактаны совершенно другого типа. С этой точки зрения представляет несомненный интерес дальнейшее более детальное исследование полисахаридов рода *Constantinea*. Данные о структуре галактанов можно будет использовать для уточнения систематического положения этого рода и всего семейства в классификации красных водорослей.

В отличие от представителей семейства Dumontiaceae, галактаны двух видов, относящихся к семейству Furcellariaceae (см. табл. 2, образцы № 8 и 9) и одного вида семейства Phyllophoraceae порядка Gigartinales (см. табл. 2, образец № 10), несомненно, принадлежат к группе каррагинана. Наименее типичен из них галактан *Mastocarpus pacificus*, содержащий очень мало 3,6-ангидрогалактозы, однако ее вклад в моносахаридный состав значительно увеличивается

в результате щелочной обработки. Три проанализированных образца *Opuntia ornata*, собранные в разных местах, очень сильно различались по содержанию флоридного крахмала (глюкоза от 1.5 до 13.4%), но были весьма близки по содержанию компонентов галактана и по значениям А/Г до и после модификации. Аналогичное наблюдение было сделано и на примере *Turnerella mertensiana*: оказалось, что две формы этой водоросли, толстые плотные кожистые темноокрашенные пластины и более тонкие нежные талломы розового цвета, сильно различаются по содержанию флоридного крахмала, но практически идентичны по соотношению 3,6-ангидрогалактозы и галактозы как до, так и после щелочной модификации. Место и время сбора (образцы были заготовлены в разные годы на о. Беринга, в заливе Корфа и на побережье Восточной Камчатки) не оказывают существенного влияния на характеристики галактанов. Более подробные данные о полисахаридном составе *T. mertensiana*, собранной в Японском море, содержатся в нашей недавней работе²⁰, посвященной этому виду красных водорослей.

Представители еще одного семейства, Kallymeniaceae, также входящего в порядок Gigartinales (см. табл. 2, образцы № 11–15), отличались весьма незначительным содержанием 3,6-ангидрогалактозы, которое существенно не изменялось после действия щелочи, что не позволило рассчитать для них коэффициент А/Г и отнести к одной из известных групп полисахаридов. Следует отметить, что *Velocarpus pustulosus* (см. табл. 2, образец № 15) оказался единственным из всех изученных образцов, в гидролизате которого 3,6-ангидрогалактоза отсутствовала полностью как до, так и после щелочной обработки.

Как было установлено в работе²¹, для *Neoabbottiella decipiens* (см. табл. 2, образец № 16), относящейся к порядку Halymeniales, характерно наличие диатомовых водорослей в качестве эндофитов. Было интересно сравнить состав инфицированных диатомовыми водорослями и стерильных образцов этого вида. Оказалось, что эти два объекта очень близки по компонентам галактанов и надежным отличием является только повышенное примерно в три раза содержание глюкозы в гидролизатах инфицированных образцов. Для того чтобы установить, является ли соответствующий глюкан продуктом жизнедеятельности симбионтов, несомненно, требуется отдельное достаточно сложное исследование.

Как известно, представители порядка Palmariales отличаются от прочих красных водорослей тем, что содержат в качестве главного структурного компонента клеточных стенок нейтральный ксилан вместо сульфатированного галактана². В нашей работе это показано для двух экземпляров *Halosaccion hydraphorum* (см. табл. 2, образец № 17), собранных в разных местах. Еще один образец этого вида был описан ранее¹⁴ под прежним названием *H. glandiforme*.

В отличие от водоросли *Sparlingia pertusa*, упомянутой в предыдущей статье под названием *Rhodymenia*

*pertusa*¹⁴, образец № 18, исследованный в данной работе, содержал очень много флоридного крахмала, тогда как галактаны этих двух образцов и близкородственного вида *S. stipitata* (см. табл. 2, образец № 19) были весьма сходны и характеризовались незначительным содержанием 3,6-ангидрогалактозы и низкими значениями А/Г.

В биомассе *Heteroglossum carnosum*, представителе семейства Delesseriaceae (см. табл. 2, № образец 20, порядок Ceramiales), довольно неожиданно был обнаружен галактан группы каррагинана. Очевидно, что это наблюдение нуждается в дополнительном подтверждении путем анализа новых образцов этой водоросли, поскольку виды порядка Ceramiales обычно содержат полисахариды группы агара. В отличие от *H. carnosum*, другой представитель семейства Delesseriaceae (образец № 21) по результатам гидролиза был вполне аналогичен двум другим видам этого же семейства, описанным ранее¹⁴. Для их галактанов были найдены умеренные значения А/Г, но принадлежность этих полисахаридов к группе агара не вызывает сомнений. Также к группе агара относятся и галактаны двух других представителей этого порядка, *Odonthalia corymbifera* (см. табл. 2, № 22) и *Neoptilota asplenioides* (см. табл. 2, № 23), что было установлено ранее¹⁴. Особенностью двух последних видов является высокое содержание в их галактанах метилированных сахаров, 6-*O*-метилгалактозы в *O. corymbifera* и, в дополнение к ней, 2-*O*-метил-3,6-ангидрогалактозы в *N. asplenioides*. Это приводит к образованию при частичном восстановительном гидролизе, наряду с агаробиитом, 2-*O*-метил-, 6'-*O*-метил- и 2,6'-ди-*O*-метил-производных агаробиита, которые хорошо видны на хроматограммах. В случае этой последней водоросли были проанализированы три образца, заметно различающиеся по морфологии, и получены достаточно близкие результаты, что подтверждает принадлежность образцов к одному виду.

Нами были проанализированы еще два образца водорослей, но полученные данные не включены в таблицы по следующим соображениям. Для вида, определенного предварительно как *Beringia castanea*, была показана принадлежность галактана к группе каррагинана, что противоречит статье¹⁴, где полисахарид этого вида был отнесен к группе агара. Очевидно, одинаковая видовая принадлежность изученных образцов этой водоросли нуждается в пересмотре. Вид другого образца не был определен, и водоросль была предварительно отнесена к роду *Kallymeniopsis*, однако по данным гидролизатов этот образец кардинально отличался от близкородственного *K. lacera* (см. табл. 2, образец № 14). Если образец № 14 содержал очень мало 3,6-ангидрогалактозы и по составу гидролизатов был подобен другим представителям семейства Kallymeniaceae, то морфологически сильно отличающийся от него образец *Kallymeniopsis* sp. содержал галактан группы каррагинана и примерно в 2.5 раза превосходил образец № 14 по содержанию флоридного крахмала. Учитывая эти данные, отнесение обсуждаемых образцов к одному роду вызывает большие со-

мнения. Несмотря на предварительный характер сведений, получаемых с помощью восстановительного гидролиза биомассы, важным итогом работы можно считать новые данные о структурном разнообразии полисахаридного состава красных водорослей, позволяющие проводить целенаправленный выбор объектов для более детального исследования. Необходимо отметить, что в большом числе изученных образцов были найдены галактаны с низким содержанием 3,6-ангидрогалактозы. По сравнению с полисахаридами с высокими значениями А/Г, для установления строения которых эффективно используется спектроскопия ЯМР, структурный анализ галактанов с низкими коэффициентами А/Г представляет гораздо большие сложности, однако именно среди них могут быть найдены высокосульфатированные полисахариды с перспективной биологической активностью, в первую очередь антикоагулянтной, противоопухолевой и противовирусной². Поэтому подробное изучение таких биополимеров представляет интерес как для развития методических подходов к анализу сложных сульфатированных полисахаридов, так и для обнаружения новых веществ с практически ценными свойствами. В целом данные таблицы 2 подтверждают специфические различия в составе структурных полисахаридов для водорослей, принадлежащих к различным порядкам, что может быть использовано при уточнении классификации красных водорослей.

Экспериментальная часть

Сбор и предварительная обработка водоросли. Время и районы сбора изученных образцов приведены в таблице 1. Водоросли высушивали сначала на воздухе, а затем при пониженном давлении над фосфорным ангидридом, и измельчали до размера частиц менее 0.2 мм.

Аналитические методы. Анализ моносахаридного состава гидролизатов биомассы водорослей методом ГЖХ в виде ацетатов полиолов проводили на хроматографе «Agilent 7820А», снабженном пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой НР-5, в токе азота при градиенте температуры от 160 до 290 °С со скоростью 7 град·мин⁻¹. Количественную обработку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы EZ Chrom Elite. Идентификацию ацетатов агаробиита и каррабиита в продуктах частичного восстановительного гидролиза биомассы выполняли сравнением с заведомо известными образцами на том же хроматографе при нагревании от 200 до 290 °С со скоростью 10 град·мин⁻¹ и далее при 290 °С (15 мин).

Для полного восстановительного кислотного гидролиза^{10,14} к навескам измельченной биомассы (20–30 мг) приливали 1 мл 2 *M* трифторуксусной кислоты, содержащей мио-инозит (1 мг·мл⁻¹, внутренний стандарт), через 16 ч вносили 50 мг·комплекса боран—4-метилморфолин и нагревали 8 ч при 100 °С при периодическом перемешивании. После охлаждения гидролизатов кислоту отгоняли в вакууме с этанолом (3½ 10 мл). Перевод освобожденных моносахаридов в ацетаты полиолов и количественный анализ методом ГЖХ проводили по описанной ранее методике²². Для определения ксилозы аналогичный гидролиз проводили без прибавления комплекса боран—4-метилморфолин.

Частичный восстановительный гидролиз проводили на образцах биомассы, обработанных щелочью. К одной из трех навесок биомассы (25–30 мг) приливали 1 мл воды, к двум другим — по 1 мл 1 М NaOH, смеси нагревали при перемешивании 5 ч при 80 °С, охлаждали, прибавляли по 10 мл этанола, тщательно перемешивали. Выпавшие осадки отделяли центрифугированием, промывали дважды этанолом, ацетоном и высушивали при пониженном давлении. Образец, обработанный водой, и один из образцов, обработанных щелочью, гидролизвали в присутствии комплекса боран–4-метилморфолин, как описано выше, для оценки эффективности щелочной модификации. К второму образцу, обработанному щелочью, приливали 3 мл воды, через 24 ч прибавляли 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей мио-инозит (1 мг·мл⁻¹, внутренний стандарт), вносили 50 мг комплекса боран–4-метилморфолин и нагревали при постоянном перемешивании 8 ч при 65 °С. К охлажденному гидролизату приливали 20 мл этанола, осадок отделяли фильтрованием, фильтрат упаривали и переводили остаток в ацетаты полиолов, которые использовали для ГЖХ, как описано выше.

Список литературы

1. М. И. Билан, Н. Г. Клочкова, Н. Е. Устюжанина, А. О. Чижов, А. С. Шашков, Н. Э. Нифантьев, А. И. Усов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2016, 2729 [М. I. Bilan, N. G. Klochkova, N. E. Ustyuzhanina, A. O. Chizhov, A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev, A. I. Usov, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2016, **65**, 2729].
2. A. I. Usov, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2011, **65**, 115.
3. M. Lahaye, *J. Appl. Phycol.*, 2001, **13**, 173.
4. L. Li, R. Ni, Y. Shao, S. Mao, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **103**, 1.
5. V. D. Prajapati, P. M. Maheriya, G. K. Jani, H. K. Solanki, *Carbohydr. Polym.*, 2014, **105**, 97.
6. J. Liu, X. Zhan, J. Wan, Y. Wang, C. Wang, *Carbohydr. Polym.*, 2015, **121**, 27.
7. D. A. Rees, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1969, **24**, 267.
8. F. Soares, T. Chopin, L. Pereira, in *Carrageenans*, Ed. L. Pereira, Nova Science Publishers, 2016, p. 161–188.
9. A. I. Usov, M. Ya. Elashvili, *F. E. C. S. Fifth Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Active Nat. Prod., Conf. Proc.*, Bulgarian Acad. Sci., Sofia, 1989, V. **2**, 346.
10. А. И. Усов, М. Я. Элашвили, *Биоорганическая химия*, 1991, **17**, 839 [*Russ. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, 1991, **17**].
11. T. T. Stevenson, R. H. Furneaux, *Carbohydr. Res.*, 1991, **210**, 277.
12. A. I. Usov, *Hydrobiologia*, 1993, **260/261**, 641.
13. C. N. Jol, T. G. Neiss, B. Penninkhof, B. Rudolph, G. A. De Ruiter, *Anal. Biochem.*, 1999, **268**, 213.
14. A. I. Usov, N. G. Klochkova, *Bot. Mar.*, 1992, **35**, 371.
15. D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 1961, 5168.
16. N. S. Anderson, D. A. Rees, *J. Chem. Soc.*, 1965, 5880.
17. B. J. D. Meeuse, M. Andries, J. A. Wood, *J. Exp. Bot.*, 1960, **11**, 129.
18. T. Dillon, J. McKenna, *Nature*, 1950, **165**, 318.
19. V. C. Barry, J. E. McCormick, *J. Chem. Soc.*, 1957, 2777.
20. В. Е. Васильковский, Г. П. Смирнова, А. С. Шашков, А. И. Усов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2015, 1163 [V. E. Vaskovsky, G. P. Smirnov, A. S. Shashkov, A. I. Usov, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2015, **64**, 1163].
21. T. A. Klochkova, N. A. Pisareva, J. S. Park, J. H. Lee, J. W. Han, N. G. Klochkova, G. H. Kim, *Phycologia*, 2014, **53**, 205.
22. F. A. Pettolino, C. Walsh, G. B. Fincher, A. Bacic, *Nature Protocols*, 2012, **7**, 1590.

Поступила в редакцию 28 октября 2016;
после доработки — 2 февраля 2017