

А. КОЛЛИСТ, Ю. ПАРИК, Т. ПЮССА

ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ АГАРОНОСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

5. Оценка качества различных агароз

(Представил О. Эйзен)

Для характеристики разных коммерческих агароз и нейтральных полисахаридных фракций водорослей *Phyllophora nervosa*, *Furcellaria fastigiata*, *Ahnfeltia plicata*, *Gracilaria verrucosa* и *Ahnfeltia tobuchiensis* использовались показатели прочности студня, температура плавления студней, электроэндоосмотическое движение полиэтиленгликоля в студне, температура застудневания, содержание золы и серы в них.

На изученных студнях с помощью электрофореза проведено разделение 5 белков сыворотки крови человека. Показано, что нейтральные полисахаридные фракции из водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis* и *Gracilaria verrucosa* могут быть использованы для разделения белков сыворотки крови с помощью гель-электрофореза.

В предыдущих сообщениях этой серии [1-3] изучена возможность выделения высококачественного полисахаридного компонента типа агара из агароносных красных водорослей (багряннок), растущих в морях СССР. Было показано, что хорошим сырьем для изготовления высококачественной желеобразующей электронейтральной фракции агара (агарозы) могут служить багрянки *Ahnfeltia tobuchiensis* и *Gracilaria verrucosa* из залива Петра Великого (Японское море, Приморский край) и *Ahnfeltia tobuchiensis* из залива Измены (остров Кунашир, Курилы) [1-3].

В данной работе излагаются результаты изучения качества электронейтральной желеобразующей фракции, выделенной по единой методике из следующих агароносных водорослей: *Phyllophora nervosa* (филлофоровое поле Зернова, Черное море), *Furcellaria fastigiata* (район о-ва Хийумаа, Балтийское море), *Ahnfeltia plicata* (Соловецкий архипелаг, Белое море), *Gracilaria verrucosa* и *Ahnfeltia tobuchiensis* I (залив Петра Великого, Японское море) и *Ahnfeltia tobuchiensis* II (залив Измены, остров Кунашир, Курилы).

Экспериментальная часть

Полисахариды для анализа экстрагировали из водорослей по единой методике [1]. Для выделения высокомолекулярного электронейтрального (агарозного) компонента во всех случаях использовали его осаждение полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) [4] и обработку полисахаридного раствора диэтиламиноэтилцеллюлозой (ДЭАЭ-целлюлоза) [5, 6]. Для оценки качества полученных фракций использовали такие показатели, как прочность 1%-ного студня по Валенти, температура плавления и температура застудневания.

Характеристика разных агароз и подобных им носителей

Носитель	Прочность студня	Т. плавления, °С	Т. застудневания, °С	Зольность, %	Сера, %	Электронейтральность
Агароза:						
фирмы «Calbiochem», A grade, Lot 601 888	445	79	35	0,7	0,05	3
фирмы «Behringwerke», F5 802	238	79	34,5	0,3	0,06	2
фирмы «Ferak»	630	90	35,5	0,5	0,14	2
фирмы «Miles»	932	77	35	0,32	0,07	2,5
фирмы «Sigma»	1082	90	35,5	0,13	0,03	2
фирмы «Chemapol»	1015	—	—	0,64	—	3
фирмы «Serva»	357	—	—	0,12	0,06	—
Агароза Олайнского объединения «Биохимреактив»:						
марки А, партия 42	102	74	32,5	1,28	0,13	2,5
марки А, партия 15	207	77	33,5	0,75	0,04	3
марки А, партия 5	116	76	35,5	—	0,12	—
марки Б, партия 50	190	75	33	—	—	4
Агароза, изготовленная лиофилизацией сефарозы 2В («Pharmacia»)	553	84	36	0,31	0,13	1,5
Нейтральные фракции из водорослей:						
<i>P. nervosa</i>		61	24,5	2		
<i>F. fastigiata</i>	104	42	27	1,27	7,75	—
<i>A. plicata</i>	192	59,5	33	2,4	0,55	—
<i>G. verrucosa</i>	1047	84,7	35	0,5	0,14	—
<i>A. tobuchiensis</i> I (опыт I)	1023	90	36,5	0,65	0,05	0,5
<i>A. tobuchiensis</i> I (опыт II)	878	87	35,5	0,40	0,05	1
<i>A. tobuchiensis</i> II	800	83	34,5	1,6	0,27	3,5

ния 1%-ного раствора, содержание золы и содержание серы (%) и электрофоретическое движение полосы ПЭГ на 1%-ном геле.* Кроме того, было проведено разделение белков сыворотки крови человека на изученных студнях с соблюдением следующих условий [7]: концентрация геля 0,83%, размеры пластинок 12×5 см, напряженность поля 20 В/см, продолжительность электрофореза 2 ч, верональный буфер с pH 8,7. Для идентификации белков гели красили раствором ярко синего кумасси R-250. На всех изученных носителях фиксировали сдвиг полос преальбуминов, альбуминов, трансферрина, компонентов 3F и 3S в сторону катода (+) или анода (—).

Результаты и их обсуждение

Из литературы [8–12] известно, что желеобразующие вещества, полученные из фуцелларии (*Furcellaria fastigiata*) и филофоры (*Phyllophora nervosa*), являются сильнозаряженными полигалактанами. Также имеются данные [8], что сухой остаток щелочного экстракта из водоросли филофора можно разделить осаждением цетавлоном на две фракции — на нейтральную нежелеобразующую, не являющуюся полигалактаном, и на сильнозаряженную желеобразующую полигалактановую фракцию. Из водоросли фуцелларии выделен нейтральный низкомолекулярный сахарид [10], хотя главным желеобразующим веществом, полученным из нее, является полисульфатированный эфир полигалактозы с молекулярным весом от 20 000 до 80 000 [12]. Несмотря на имеющиеся в литературе отрицательные результаты, мы попытались выделить нейтральные фракции и из агаров, полученных из этих водорослей. При этом была ис-

* У всех изученных образцов было определено также содержание воды (H₂O, %), и все расчеты проведены и растворы изготовлены с учетом содержания ее в образце.

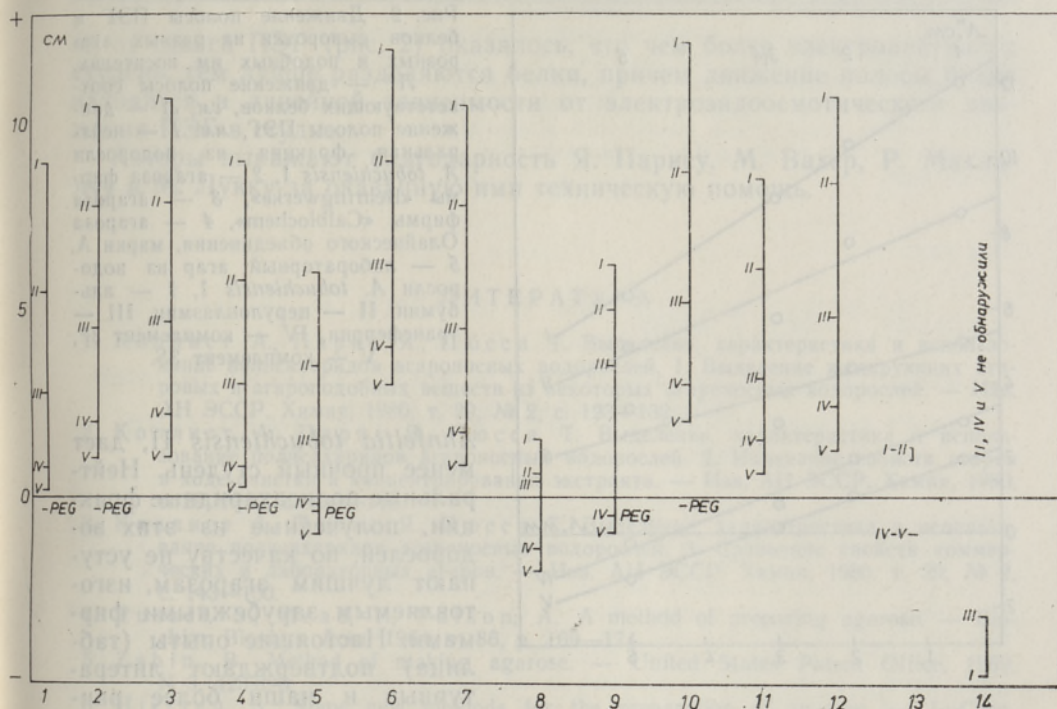


Рис. 1. Разделение белков сыворотки крови человека на разных агарозных и подобных им носителях. 1 — агароза фирмы «Chemapol», 2 — агароза фирмы «Behringwerke», 3 — агароза фирмы «Calbiochem», 4 — агароза Олайнского объединения, марки А, 5 — агароза Олайнского объединения, марки Б, 6 — агароза, изготовленная лиофилизацией биогеля А-0,5 м, 7 — агароза, изготовленная лиофилизацией сепарозы 2В, 8 — бактоагар фирмы «Difco», 9 — лабораторный агар из водоросли *A. tobuchiensis* I, 10 — нейтральная фракция агара из водоросли *A. tobuchiensis* I, 11 — нейтральная фракция агара из водоросли *A. tobuchiensis* II, 12 — нейтральная фракция агара из водоросли *G. verrucosa*, 13 — нейтральная фракция агара из водоросли *A. plicata*, 14 — нейтральная полисахаридная фракция, полученная из *F. fastigiata*. I — преальбумин, II — альбумин, III — трансферрин, IV — комплемент 3F, V — комплемент 3S.

пользована методика, аналогичная методике выделения нейтральных фракций из других изученных водорослей [4-6].

Одним из самых важных показателей качества агарозы является механическая прочность студня. Обычно, чем выше прочность студня, тем лучше работать с ним. По данным таблицы, где приведены также характеристики качества некоторых коммерческих агароз, очень высокими прочностями студня отличаются агарозы фирм «Sigma», «Miles» и «Chemapol», сравнительно низкими прочностями студня — агарозы фирмы «Behringwerke» и «Serva». В то же время температура плавления агарозы фирмы «Miles» одна из самых низких. Температура застывания существенно не зависит от происхождения агара. Содержание серы у всех агароз было низким. Электроэндоосмотическое движение полосы ПЭГ в студне составляло 1,5—3 мм. Агарозы, изготовленные в объединении «Биохимреактив» (Олайнский завод), содержат мало заряженных группировок, однако прочность их студней сравнительно низка.

Из лабораторных агароз самые прочные студни дают нейтральные полисахаридные фракции, полученные из водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis* I и *Gracilaria verrucosa*. Агароза, полученная из водоросли

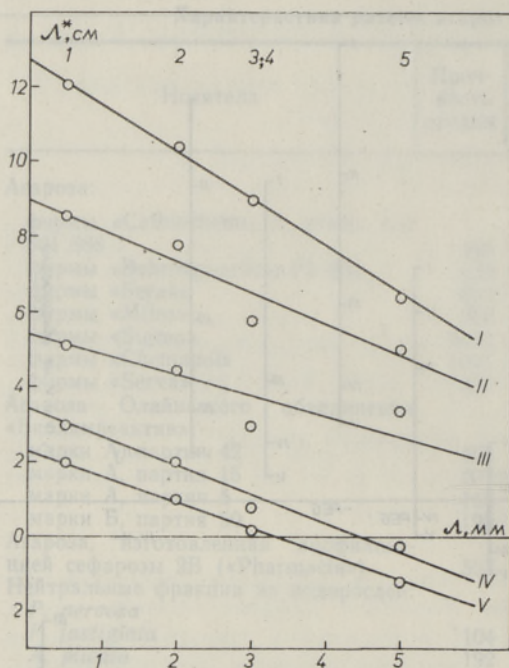


Рис. 2. Движение полосы ПЭГ и белков сыворотки на разных агарозных и подобных им носителях.

L^* — движение полосы ПЭГ, см, L — движение полосы ПЭГ, мм. I — нейтральная фракция из водоросли *A. tobuchiensis* I, 2 — агароза фирмы «Behringwerke», 3 — агароза фирмы «Calbiochem», 4 — агароза Олайнского объединения, марки А, 5 — лабораторный агар из водоросли *A. tobuchiensis* I, I — альбумин, II — перулоплазмин, III — трансферрин, IV — комплемент 3F, V — комплемент 3S.

Ahnfeltia tobuchiensis II, дает менее прочный студень. Нейтральные полисахаридные фракции, полученные из этих водорослей, по качеству не уступают лучшим агарозам, изготовляемым зарубежными фирмами. Настоящие опыты (таблица) подтверждают литературные и наши более ран-

ние [3] данные о том, что получить полигалактан типа агарозы из водорослей *Phyllophora nervosa* и *Furcellaria fastigiata* невозможно. Кроме того, установили, что желеобразующий полисахарид из водоросли *Ahnfeltia plicata* является агаром со сравнительно низкой прочностью студня, а не агарозой.

Как известно [4], электрофоретическое движение γ -глобулина и белков сыворотки крови кролика в студне желеобразующего полисахарида используется для оценки электронейтральности последнего. Мы испытывали разные агаровые и агарозные гели с помощью разделения белков крови человека (рис. 1). На использованных первых трех коммерческих агарозах и агарозах, полученных лиофилизацией коммерческих гранулированных гелей (образцы 6 и 7 на рис. 1), разделяемость главных белков была хорошей. На агарозе марки А Олайнского объединения разделяемость белков была тоже хорошей, а на агарозе марки Б этого же объединения разделение белков было несколько хуже — две зоны белков из пяти выявленных были даже сдвинуты от стартовой линии в сторону анода. Нейтральные полисахаридные фракции, полученные из водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis* I, *Ahnfeltia tobuchiensis* II и *Gracilaria verrucosa*, также показали хорошую картину разделения белков сыворотки. На гелях полисахаридов, полученных из водорослей *Ahnfeltia plicata* и *Furcellaria fastigiata*, белки практически разделить не удалось. Полосы, которые, однако, удалось обнаружить, были сильно сдвинуты в сторону анода. На геле из нейтральной фракции водоросли *Ahnfeltia plicata* разделение белков оказалось труднее, чем на геле из бактоагара «Difco», и намного труднее, чем на геле из водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*. Нейтральные фракции из водорослей *Ahnfeltia tobuchiensis* I, *Ahnfeltia tobuchiensis* II и *Gracilaria verrucosa* имеют свойства, аналогичные свойствам коммерческих агароз. В результате сушки гелей образовались прочные приставшие к стеклу пленки.

В результате анализа зависимости движения белков сыворотки кро-

ви от сдвига ПЭГ (рис. 2) оказалось, что чем более электронейтрален студень, тем лучше разделяются белки, причем движение полосы белка находится в линейной зависимости от электроэндоосмотического движения ПЭГ в студне.

Авторы выражают благодарность Я. Парису, М. Вахер, Р. Махлапуу и М. Лукку за оказанную ими техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коллист А., Парис Я., Пюсса Т. Выделение, характеристика и использование полисахаридов агароносных водорослей. 1. Выделение желеобразующих агаровых и агароподобных веществ из некоторых агароносных водорослей. — Изв. АН ЭССР. Химия, 1980, т. 29, № 2, с. 123—132.
2. Коллист А., Парис Я., Пюсса Т. Выделение, характеристика и использование полисахаридов агароносных водорослей. 2. Изменение свойств агаров в ходе очистки и концентрирования экстракта. — Изв. АН ЭССР. Химия, 1980, т. 29, № 2, с. 133—142.
3. Коллист А., Парис Я., Пюсса Т. Выделение, характеристика и использование полисахаридов агароносных водорослей. 3. Сравнение свойств коммерческих и лабораторных агаров. — Изв. АН ЭССР. Химия, 1980, т. 29, № 2, с. 143—150.
4. Russel, B., Mead, T., Polson, A. A method of preparing agarose. — Biochim. Biophys. Acta, 1964, v. 86, p. 169—174.
5. Zabin, B. Method of making agarose. — United States Patent Office, 1969, N 3, 423.396.
6. Hjerten, S. Some new methods for the preparation of agarose. — J. Chromatogr., 1971, v. 61, p. 73—80.
7. Reuter, W., Hoffman, B. Zur Darstellung der Polymorphismen C3, Tf und Bf in der Dünnschicht-Agarosegel-Elektrophorese. — Arztl. Labor, 1977, Bd. 23, S. 178—186.
8. Воронова Ю. Г., Усов А. И., Рехина Н. И. К разработке метода количественного определения студнеобразующего вещества в агароиде. — Тр. ВНИРО, 1977, т. 124, с. 90—93.
9. Бабин И. П. Молекулярный аспект образования гелей фуцелларана. — В кн.: Изменение пищевых веществ при кулинарной обработке, 1974, с. 50—53.
10. Lindberg, B. A new glycoside from *Furcellaria fastigiata*. — Acta Chem. Scand., 1954, v. 8, p. 869.
11. Percival, E. Chemistry of agaroids, carrageenans and furcellarans. — J. Sci. Fd. Agric., 1972, v. 23, p. 933—940.
12. Schachat, R. E., Glicksman, M. Furcellaran, a versatile seaweed extract. — Economic botany, 1959, v. 13, N 4, p. 365—370.

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
24/X 1979

Тартуский государственный университет

A. KOLLIST, J. PARIK, T. PUSSA

AGARIVETIKATEST ERALDATUD POLÜSAHHARIIDIDE UURIMINE JA KASUTAMINE

5. Agaroside kvaliteedi hindamine

Kuuest NSV Liidu meredes kasvavast vetikast, mille nimetused ja kogumiskohad on loetletud käesoleva seeria esimeses artiklis, eraldatud agari neutraalseid fraktsioone on iseloomustatud seeria teises artiklis toodud näitajate, samuti inimese vereseerumi valkude tsoonelektroforeetilisel lahutamisel saadud andmete kaudu. Kui kõrvutada neid ja kommertsagaroside iseloomustavaid näitajaid, selgub, et Kaug-Ida vetikatest *Ahnfeltia*

tobuchiensis ja *Gracilaria verrucosa* saadud agarosid on kvaliteedilt võrreldavad firmade «Miles» ja «Sigma» agarosidega, geeli tugevuse poolest aga ületavad firmade «Calbiochem», «Behringwerke» jt. agarose. Saadud agarose võib edukalt kasutada verevalkude elektroforeetiliseks lahutamiseks. Vetikate *Furcellaria fastigiata* ja *Phyllophora nervosa* analoogilised fraktsioonid ei ole tegelikult kaugelki elektroneutraalsed, vetikast *Ahnfeltia plicata* eraldatud polüsahhariid on aga suhteliselt madala geelitugevusega agar.

A. KOLLIST, J. PARIK, T. PUSSA

CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM AGAR-CONTAINING ALGAE

5. Characterization of agarose-type polysaccharidic fractions

Using published methods [1-6], the electroneutral fraction of agar from six agarophyte species of the USSR (their names and collecting places have been published [1]) have been isolated and characterized by their gel strength, gelling temperature, temperature of gel solidification, ash content, sulphur content, electroendosmosis (polyethylene glycol method [2]) and zone electrophoresis of human serum proteins. Comparison of data on the above-mentioned agaroses with analogical data on several imported agaroses and with data on agaroses produced at the Olaine Chemical Plant (Latvian SSR) shows that the agaroses obtained in our laboratories from *Ahnfeltia tobuchiensis* (the Gulf of Peter the Great in the Sea of Japan and from the coast of Kunashir Island) and *Gracilaria verrucosa* (the Gulf of Peter the Great) stand comparison with the best agaroses by firms «Miles» and «Sigma». Their gel strength is even higher than that of agaroses by «Calbiochem», «Behringwerke», «Serva», etc. Our agaroses can be successfully used for separating human serum proteins by zone electrophoresis. The fractions obtained by identical procedure from algae *Furcellaria fastigiata* and *Phyllophora nervosa* are rich in sulphur and ash, and are actually not neutral. By this procedure the agarophyte *Ahnfeltia plicata* yields an agar of a comparatively low gel strength.