

664.95  
К 30



Федеральное агентство по рыболовству

Научно-технические и методические  
документы

**Качество, безопасность  
и методы анализа  
продуктов из гидробионтов**

**ВЫПУСК 3**

**Руководство по современным методам  
исследований морских водорослей,  
трав и продуктов их переработки**

Издательство ВНИРО  
Москва 2009

Агентство по рыболовству Российской Федерации

Федеральное Государственное Унитарное предприятие  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии» (ФГУП «ВНИРО»)

Федеральное Государственное Унитарное предприятие  
Тихоокеанский научно-исследовательский  
рыбохозяйственный центр (ФГУП «ТИНРО-Центр»)

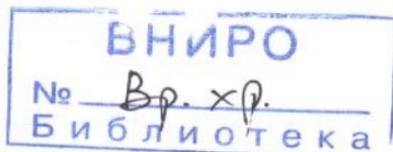
Научно-технические и методические документы

Качество, безопасность и методы анализа  
продуктов из гидробионтов

ВЫПУСК 3

ФГУП «ВНИРО» — А.В.Подкорытова;  
ФГУП «ТИНРО-Центр» — И.А.Кадникова

Руководство по современным методам  
исследований морских водорослей,  
трав и продуктов их переработки



УДК 664.86.582.272

Рецензент:

*д.т.н. Л.Р. Копыленко*

Авторы-составители:

ФГУП «ВНИРО» — д.т.н., профессор *А.В.Подкорытова*;

ФГУП «ТИНРО-Центр» — к.т.н. *И.А.Кадникова*

Под общей редакцией д.т.н., профессора *А.В.Подкорытовой*

**К12** **Качество, безопасность и методы анализа продуктов из гидробионтов.**  
Вып. 3. Руководство по современным методам исследований морских водорослей, трав и продуктов их переработки. — М.: Изд-во ВНИРО, 2009. — 108 с.

Представлены стандартные и современные инструментальные методы анализа морских водорослей и трав, гидроколлоидов, получаемых из них, и других продуктов переработки. Описаны методы определения химического состава водорослей и трав, количественного определения содержания отдельных минеральных элементов, аминокислот и липидов, а также низкомолекулярных и высокомолекулярных углеводов: маннита, агара, альгината, каррагинана. Показаны методы препаративного выделения полисахаридов, методы определения физико-химических свойств и реологических исследований. Предложены методы установления структуры водорослевых полисахаридов.

«Руководство.....» предназначается для широкого круга пользователей: студентов, аспирантов, научных сотрудников НИИ, а также для химических и технологических лабораторий предприятий, занимающихся производством и анализом продукции из водорослей.

*/одобрено Ученым Советом ФГУП «ВНИРО» № 10 от 26 августа 2009 г./*

ISBN 978-5-85382-373-0

© Издательство ВНИРО, 2009

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ТЕХНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДОРΟΣЛЕЙ И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ.....	9
Подготовка проб.....	9
Общий химический состав.....	9
<b>ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА.....</b>	<b>11</b>
Определение набухаемости.....	12
Определение содержания воды.....	12
Определение содержания золы.....	12
Определение содержания микро- и макроэлементов.....	13
<b>Анализ азотистых соединений.....</b>	<b>14</b>
Определение содержания общего азота.....	14
Определение белкового и небелкового азота.....	14
Определение содержания аминокислот.....	16
<b>Определение йода в водорослях и продуктах их переработки.....</b>	<b>16</b>
<b>МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ЛИПИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ И ТРАВ.....</b>	<b>18</b>
Экстракция липидов из водорослей.....	18
Разделение липидов на классы и их идентификация.....	20
Колоночная хроматография.....	23
Количественное определение липидов.....	23
Определение состава жирных кислот.....	23
<b>МЕТОДЫ АНАЛИЗА И ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ.....</b>	<b>25</b>
Определение содержания альгиновой кислоты и выхода ее солей альгинатов.....	25
Экстракция.....	26
Определение содержания альгиновой кислоты.....	26
Определение выхода альгината натрия.....	27
Определение выхода альгината кальция.....	28
Объемный титрометрический метод определения содержания альгиновой кислоты в водорослях и альгинатах.....	28
Спектрофотометрический метод определения содержания альгиновой кислоты в водорослях и альгинатах.....	29
Определение моносахаридов.....	32
Определение содержания маннита.....	33
Количественное выделение ламинарана.....	34
Количественное выделение фукоидана.....	35
Фракционирование фукоидана.....	36
Спектрофотометрическое определение фукоидана и альгината в одной навеске водоросли.....	36
Экстракция фукоидана.....	37
Экстракция альгината.....	37
Определение фукозы с хлоргидратом цистеина и конц. $H_2SO_4$ .....	38
Определение альгината по реакции с конц. $H_2SO_4$ и 3,5-диметилфенолом.....	39
Определение содержания клетчатки.....	39
Методы определения альгиновых кислот, основанные на деградации уруновых кислот.....	40
Колориметрическое определение полиуронидов.....	41
Методы исследования мономерного состава альгинатов.....	43
Определение мономерного состава альгиновой кислоты методом ГЖХ.....	45
Получение маннурановой и гулурановой кислот.....	46

<b>НЕДЕСТРУКТИВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА.....</b>	<b>47</b>
ЯМР - <sup>13</sup> C – спектроскопия .....	47
<b>МЕТОДЫ АНАЛИЗА И ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ.....</b>	<b>50</b>
Определение содержания агара .....	51
Экстрагирование агара из дальневосточной анфельции.....	53
Определение содержания агара в грацилярии.....	54
Определение содержания агара в биомассе красных водорослей методом ГЖХ.....	56
Определение содержания каррагинана в красных водорослях-каррагинофитах.....	58
Получение природного каррагинана из красных водорослей-каррагинофитов.....	60
Фракционирование полисахаридов красных водорослей.....	61
Фракционирование каррагинана хлоридом калия.....	62
Фракционирование агара диметилсульфоксидом (ДМСО).....	63
Определение 3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах красных водорослей.....	64
Определение 3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах реакцией с резорцином.....	66
Определение 3,6-ангидрогалактозы с резорцин-1,1-диэтоксизтаном.....	67
Количественное определение 3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах.....	69
Определение производных 3,6-ангидрогалактозы методом ГЖХ.....	70
Полный восстановительный гидролиз.....	71
Частичный восстановительный гидролиз агара.....	71
Частичный восстановительный гидролиз каррагинана.....	71
Частичный восстановительный гидролиз биомассы водорослей.....	72
Определение галактозы.....	72
Определение содержания сульфатных групп в полисахаридах.....	74
Методика микробиологического тестирования агара.....	76
Определение возможности использования агара для приготовления питательных сред и проведения микробиологических исследований.....	78
<b>МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ МОРСКИХ ТРАВ</b>	<b>81</b>
Методы весового определения содержания пектиновых веществ.....	81
Приготовление экстракта пектина.....	81
Кальций-пектатный метод.....	81
Осаждение этиловым спиртом.....	82
Осаждение ацетоном.....	83
Определение пектиновых веществ карбазольным методом.....	83
Определение свободных и метоксилированных карбоксильных групп, степени метоксилированности пектина титрометрическим методом.....	84
Определение ацетильных групп в пектине.....	86
Определение уроновых кислот в полисахаридах.....	86
Получение ацетатов полиолов.....	87
Получение альдононитрилов.....	88
Получение триметилсилилпроизводных.....	89
Определение избирательной адсорбционной способности полиуронидов.....	89
<b>МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДОВ.....</b>	<b>91</b>
Определение относительной вязкости водных растворов альгината натрия.....	91
Определение рН 1%-ного раствора полисахарида.....	93
Определение прочности геля агара или каррагинана.....	94
Определение температуры гелеобразования водного раствора полисахарида.....	96
Определение температуры плавления геля водного раствора полисахарида.....	97
Исследование реологических свойств гелей и пищевых систем.....	98
Методика приготовления гелеобразных продуктов.....	98
Исследование эмульсионных систем.....	99
<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>99</b>

**Список сокращений:**

- БАВ** – биологически активные вещества.
- БАД** – биологически активные добавки к пище.
- ДМСО** – диметисульфоксид.
- 2-О-Ме-3,6-Аг** - 2-О-метил-3,6-ангидрогалактоза.
- 3,6-АГ** - 3,6-ангидрогалактоза.
- Glu** – глюкоза.
- Gal** – галактоза.
- ГМ** - соотношение сухие водоросли : экстрагент.
- Г** - остатки  $\alpha$ -L-гулуруновой.
- М** -остатки  $\beta$ -D-маннуруновой.
- М/Г** - соотношение уроновых кислот.
- ММР** – молекулярно массовое распределение.
- ВЭЭХ** – высокоэффективная эксклюзионная хроматография.
- ГЖХ** – газожидкостная хроматография.
- ЖК** - жидкостная хроматография.
- ИК** – инфракрасная спектроскопия.
- ПМР** – протонно-магнитный резонанс.
- ЯМР  $^{13}\text{C}$**  – ядерно-магнитный резонанс углерода -13.
- ЯМР  $^1\text{H}$**  - ядерно-магнитный резонанс на водороде - 1.

## ВВЕДЕНИЕ

Морские водоросли – важнейший компонент прибрежного биоценоза. Они образуют плотные заросли и являются естественными волнорезами, замедляют процесс разрушения берегов, перемещение донных осадков и обеспечивают относительно стабильные условия существования для многих беспозвоночных и рыб. Водоросли продуцируют различные органические вещества и после ежегодного разрушения слоевищ и отмирания растений через их бактериальное разложение органические остатки вводятся в круговорот веществ и служат питанием для многих донных морских организмов.

Кроме того, морские водоросли имеют важное хозяйственное значение. Их широко используют, как источники продуктов питания, биологически активных веществ и гидроколлоидов - **полисахаридов**, широко применяемых в различных отраслях промышленности, медицине, биотехнологии, агропромышленном комплексе и др.

Полисахариды - главные компоненты биомассы морских растений, выполняют ряд важнейших биологических функций: они служат энергетическим резервом клетки, участвуют в построении клеточных стенок, образуют наружные капсулы и межклеточный матрикс, препятствуют дегидратации, создают барьер для проникновения в клетку солей из морской среды или же напротив, обеспечивают избирательное поглощение катионов, необходимых для построения органо-минерального скелета.

Полисахариды морских водорослей обладают уникальными физико-химическими свойствами, благодаря которым находят широкое практическое применение. Основное, наиболее ценное свойство гидроколлоидов – это способность образовывать в холодной или горячей воде вязкие растворы. Многие из них при охлаждении горячих растворов способны образовывать гель. Коллоидные свойства полисахаридов морских водорослей позволяют использовать их для разнообразных целей. При этом развитие

пищевой промышленности, пищевой технологии, биотехнологии, микробиологии, биохимии, иммунохимии и других направлений, без которых они не обходятся, дают возможность оценить практическую роль полисахаридов морских водорослей.

Производство альгинатов из бурых водорослей, агара, агарозы и каррагинанов из красных являются важным, но не единственным направлением переработки морских макрофитов. Водоросли особенно бурые и некоторые красные, а также зеленые широко используются в качестве пищевых продуктов и источников биологически активных веществ. В настоящее время получение отдельных биологически активных веществ (БАВ) из водорослей переходит на промышленную основу в связи с целесообразностью широкого использования БАВ для профилактики и лечения многих заболеваний. Для оценки содержания альгиновых кислот, агара, каррагинана, пектинов, фукоидана и других компонентов в биомассе водорослей и для стандартизации получаемых из них гидроколлоидов, биологически активных добавок (БАД), пищевых, медицинских, косметических, кормовых продуктов необходимы достоверные и приемлемые аналитические методы. Для определения рациональных путей использования альгинатов, каррагинанов, агаров, фукоиданов необходима характеристика их физико-химических свойств, а, часто, и структуры полисахарида.

В связи с этим современная химия полисахаридов представляет собой сложный комплекс знаний, включающий технологические и биотехнологические процессы выделения индивидуальных полисахаридов из водорослей, изучение их свойств и строения химическими, биохимическими, физико-химическими и физическими методами. Естественно, что понимание биологической роли полисахаридов и их рациональное использование невозможны без знания их химического строения и физических свойств.

Изучение структуры, молекулярно-весовых параметров полисахаридов водорослей, вязкости растворов, прочности гелей невозможно без ис-

пользования современных методов исследования, которые позволяют установить взаимосвязь между структурой полисахарида, его физико-химическими свойствами и биологической активностью.

Существует множество руководств по методам исследований углеводов, в которых содержится описание методических рекомендаций, относящихся к различным разделам химии углеводов, в том числе и химии полисахаридов. В этих руководствах представлены методы выделения, разделения, анализа и изучения структуры углеводов, методы синтетической химии и физические методы исследования, широко применяемые в работе с важнейшими типами углеводов: низкомолекулярными углеводами, моносахаридами, их производными, олиго- и полисахаридами, гликозидами, нуклеозидами, нуклеотидами, смешанными углеводсодержащими биополимерами. Однако до настоящего времени еще нет руководства, объединяющего методы исследований, начиная от подготовки морского растительного сырья, анализа его химического состава, препаративного выделения полисахаридов и изучения их свойств и строения.

В исследовании полисахаридов морских водорослей вопросы методического характера имеют особое значение, так как при получении полисахаридов в чистом виде возникают проблемы их выделения из морских водорослей и очистки. Сложные превращения полисахаридов в процессе их получения, а также проблемы, возникающие при идентификации, установлении химического строения делают эту область знания одной из важнейших в современной биотехнологии, биохимии и др. При этом следует учитывать, что аналитическая химия водорослевых полисахаридов отличается своеобразием от химии других аналогичных веществ.

Как правило, все исследования начинают с момента заготовки растительного сырья, установления его вида, возраста, применения определенного способа первичной обработки, консервирования и анализа технокимических характеристик [Подкорытова, 2005].

## ТЕХНОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДОРОСЛЕЙ И ПРОДУКТОВ ИХ ПЕРЕРАБОТКИ

**Подготовка проб.** Для получения технохимической характеристики водорослей или морских трав из их биологической пробы (50 шт. растений) отбирают по 5-6 шт. средних по размерно-массовым характеристикам слоевищ, заготовленных из естественных зарослей или на водорослевых плантациях. Предварительно, перед обработкой и измельчением, устанавливают принадлежность растения к определенному классу (отделу), роду и виду, а также возраст. При необходимости обращаются к помощи специалиста в этой области – альгологу. Свежедобытые водоросли сразу же после извлечения из места произрастания тщательно очищают от эпифитов, песка, различных моллюсков и других загрязнений, промывают в морской воде, отделяют органы прикрепления (черешки и ризоиды, подошвы). Очень крупные слоевища (например, бурые водоросли семейства ламинариевых) нарезают на куски с учетом необходимости подготовки средней пробы. В сыром материале определяют содержание воды и содержание сухих веществ в соответствии с ГОСТ 26185-84. Подготовленные пробы водорослей высушивают в сушильном шкафу при температуре не выше 60<sup>0</sup>С, измельчают до размера частиц 0,3-0,5 мм, помещают в банки из темного стекла с притертой пробкой и хранят до анализа.

**Общий химический состав.** В пробах морских растений определяют их общий химический состав: содержание воды в сыром или сушеном материале, общее содержание минеральных веществ в виде золы, рассчитывают общее содержание органических веществ, определяют содержание полисахаридов, низкомолекулярных углеводов. Определяют общее содержание азота, рассчитывают содержание белка.

При необходимости получения более полной характеристики водорослей или морских трав определяют: состав и содержание аминокислот в белках, содержание отдельных микро- и макроэлементов, а также йода,

общее содержание липидов, состав жирных кислот, моносахаридный состав углеводов, содержание и состав пигментов, витаминов. Общее содержание органических веществ определяют расчетным путем. Содержание низкомолекулярных углеводов и полисахаридов - маннита и альгиновой кислоты в бурых водорослях, а также содержание агара и каррагинана в красных водорослях определяют стандартными методами по ГОСТ 26185-84 или методами, описанными в данном руководстве.

Расчет содержания каждого отдельного вещества проводят относительно абсолютно сухой навески, анализируемого материала. При необходимости расчет ведут на 100 г или 1000 г сырого или сушеного материала. Данные о содержании альгиновой кислоты, маннита в бурых водорослях, содержании агара и каррагинана в красных водорослях, а также данные анализа качественной и количественной характеристики полисахаридов, выделенных из водорослей, являются объективными показателями в научно-исследовательском процессе. Эти показатели необходимы при определении пригодности использования этих водорослей в качестве сырья для промышленного или лабораторного получения полисахаридов, биологически активных веществ (БАВ), пищевых продуктов, а также для выделения БАВ из водорослей, их дальнейшего изучения и использования при составлении композиций биологически активных добавок (БАД). Данные о содержании и составе микро-, макроэлементов, йода, суммы азотистых соединений, количества и состава свободных и связанных аминокислот, углеводов, клетчатки, липидов, витаминов, являются показателями для определения использования водоросли в качестве пищевого продукта, а также расчета их пищевой и биологической ценности.

При разработке рекомендаций по использованию того или иного вида водоросли кроме качественных показателей обязательны исследования по безопасности сырья, которые проводятся в соответствии с требованиями СанПиН 2.3.2.1078-01.

Определение содержания ртути проводят по методическим указаниям МУ 5178-90 в развитии ГОСТ 26927 «Сырьё и продукты пищевые. Методы определения ртути» в части расширения применения метода атомной абсорбции на все группы однородной пищевой продукции.

Определение массовой доли свинца и кадмия проводят атомно-абсорбционным методом согласно ГОСТ 30178 «Сырьё и продукты пищевые. Атомно-абсорбционный метод определения токсичных элементов».

Массовую долю мышьяка определяют по ГОСТ 26930 «Сырьё и продукты пищевые. Методы определения мышьяка» колориметрическим методом с пробоподготовкой методом сухой минерализации с последующей обработкой соляной кислотой.

Радионуклиды определяют согласно МУК 2.6.1.1194-03 «Радиационный контроль Стронций-90 и Цезий-137. Пищевые продукты. Отбор проб, анализ и гигиеническая оценка. Методические указания». Микробиологические характеристики образцов определяют по показателям МАФАНМ, БГКП (колиформы), патогенные микроорганизмы, в т. ч. *Salmonellae*, плесени. Показатель МАФАНМ определяют по ГОСТ 10444.15-94, БГКП (колиформы) по ГОСТ 30518-97, патогенные микроорганизмы, в т. ч. *Salmonellae*, по ГОСТ 30519-97 и плесени по ГОСТ 10444.12-88.

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Коммерческие продукты из водорослей и морских трав: водоросли в слоевищах, шинкованные на кусочки, крупку или порошок из водорослей, а также водоросли мороженые, соленые, готовые формы гидроколлоидов - альгиновую кислоту, альгинат натрия, альгинат кальция, агар, каррагинан, зостерин, пищевые продукты из водорослей и др. анализируют на соответствие требованиям ГОСТа и ТУ (технические условия на продукт). Определяют содержание воды в сыром и сушеном материале, общее содержание минеральных веществ в виде золы, состав и содержание минеральных

элементов, общее содержание азота и содержание альгиновой кислоты и других полисахаридов стандартными методами по ГОСТ 26185-84. Определяют степень набухаемости в воде водорослевой крупки и порошка, нерастворимых в холодной воде форм водорослевых полисахаридов - альгиновой кислоты, альгината кальция, агара. Определяют сорбционную активность альгинатов, альгиновых кислот и зостерина.

**Определение набухаемости** водорослевого порошка, крупки, альгиновой кислоты, альгината кальция, агара. Проведение анализа, обработка результатов.

В мерный цилиндр вместимостью 25 см<sup>3</sup> помещают 2,5 см<sup>3</sup> сухого порошка анализируемого материала, доливают в цилиндр до метки 25 см<sup>3</sup> дистиллированной воды температурой 20°С и оставляют на 3-4 ч для набухания. Набухаемость определяют по формуле:

$$n = 100 \times (V_2 - V_1) / V_1;$$

где:  $V_1$  - объем сухой навески, см<sup>3</sup>;

$V_2$  - объем набухшей навески, см<sup>3</sup>.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений, допустимое расхождение между которыми не должно превышать 1 % ( $P=0,99$ ).

**Определение воды** проводят в соответствии с методом ГОСТ 26185-84.

**Определение золы.** Метод основан на удалении органических веществ из навески при ее сжигании и прокаливании в течение 24 часов.

В предварительно прокаленном до постоянной массы фарфоровом тигле взвешивают 1,5 - 2,0 г анализируемого образца с абсолютной погрешностью не более 0,001 г. Тигель с навеской помещают на электрическую плитку и осторожно обугливают до прекращения выделения продуктов сгорания. Затем тигель с содержимым прокачивают в муфельной печи при температуре 500-600°С до полного озоления навески и получения золы белого или светло-серого цвета без темных вкраплений. Тигель с золой охлаждают в эксикаторе и взвешивают. После взвешивания тигель повтор-

но прокаливают при температуре 500-600 °С в течение 5-6 ч, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Если разница в массе между двумя последующими взвешиваниями превысит 0,001 г, то прокаливание повторяют.

Массовую долю общей золы (З в %) в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$З = (m - m_0) \times 100 \times 100 / (m_1 - m_0) \times (100 - w_2),$$

где:  $m$  – масса тигля с золой, г;

$M_1$  – масса тигля с навеской полисахарида до сжигания, г;

$M_0$  – масса тигля, г;

$w_2$  – массовая доля воды в продукте, %.

Расхождения между параллельными анализами не должны превышать 0,2%. За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений. Вычисление проводят до второго десятичного знака.

**Определение содержания микро- и макроэлементов.** Содержание микро- и макроэлементов в водорослях, альгинатах, каррагинанах, агарах, агарозе, в БАДах, пищевых и других продуктах определяют методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии на приборе Nippon Jarell Ash AA-855 (Япония) или на другом современном приборе. Содержание свинца и мышьяка определяют на приборе Hitachi 170-70 (Япония), используя в качестве атомизатора графитовую кювету. Ртуть определяют беспламенным атомно-абсорбционным методом на микроанализаторе ртути Hiranuma Hg-1 (Япония). Подготовку навески исследуемого материала для определения элементов проводят согласно методическим рекомендациям, разработанным в 1987 году [Ковековдова, Лучшева, 1987]. Для определения содержания отдельных элементов навеску водоросли также можно сжечь в муфельной печи при температуре 550°С в течение 24 часов (температуру увеличивают постепенно, начиная от 100°С). Зольный остаток растворяют в 0,1 н. растворе азотной кислоты, фильтруют, в фильтрате спектрофотометрическим методом определяют концентрацию

катионов. Содержание металлов в водорастворимых соединениях водорослей определяют в водных экстрактах, получаемых из навесок анализируемых объектов. После водной экстракции бурых водорослей водорослевый остаток дополнительно экстрагируют 2% -ным раствором соляной кислоты и измеряют в этом растворе содержание катионов металлов, органически связанных с альгиновой кислотой водоросли и другими органическими соединениями.

### **Анализ азотистых соединений**

*Определение содержания общего азота.* Метод основан на способности органических веществ окисляться до углекислоты и воды при сжигании с концентрированной серной кислотой. Для ускорения реакции разложения органического вещества при сжигании прибавляют катализаторы в виде медных солей, а также сернокислый калий - для повышения температуры реакции. Образовавшийся аммиак вытесняется из сернокислой соли в процессе нейтрализации избытка кислоты щелочью и отгоняется в точно отмеренное количество титрованной кислоты. Избыток кислоты в приемнике титруют 0,1н. раствором NaOH [Лазаревский, 1955; ГОСТ 26185-84].

В настоящее время содержание общего и небелкового азота чаще всего определяют на автоматическом анализаторе Kjeltec Auto Analyser 1030 (Tecator, Швеция) или на приборе "Kjeltec auto" 10 SO Analyser (Tecator, Япония).

*Определение белкового и небелкового азота.* К навеске растительного материала, смешанной с водой, прибавляют один из реактивов, осаждающих белок. Выпавший осадок белка отфильтровывают и затем производят определение азота по Кьельдалю, как в осадке, так и в фильтрате.

При исследовании растительного материала пользуются несколькими видами осадителей, например гидратом окиси меди.

Навеску 1-2 г воздушно-сухого растительного материала помещают в стакан емкостью 200-250 мл, добавляют 50 мл горячей воды и нагревают до кипения. Затем прибавляют 20 мл 10%-ного раствора сернокислой меди и 20 мл 2,5%-ного раствора едкого натрия. Смесь хорошо перемешивают и оставляют стоять на 1 час или больше. В отстоявшейся жидкости должен быть избыток меди. После отстаивания осадка жидкость сливают декантацией через фильтр, осадок промывают несколько раз горячей водой, затем осадок переносят на фильтр и промывают горячей водой до исчезновения в промывных водах реакции на серную кислоту с  $\text{BaCl}_2$ . Подсушенный осадок вместе с фильтром переносят в колбу для сжигания и определяют азот. Одновременно производят контрольное определение азота в реактивах и фильтре.

Часто в качестве осадителя белка используют трихлоруксусную кислоту. В этом случае к белковой вытяжке (20 мл) прибавляют 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ), оставляют на 30 мин и фильтруют. Осадок промывают 3 раза по 1 мл трихлоруксусной кислоты той же концентрации, подсушивают вместе с фильтром и определяют азот по методу Кьельдаля.

В качестве осадителя белков используют основной уксуснокислый свинец, который получают смешиванием 600 г среднего уксуснокислого свинца с 200 г окиси свинца ( $\text{PbO}$ ) в фарфоровой чашке. Смесь нагревают на бане до сплавления при тщательном перемешивании, добавляют еще в теплом состоянии 2 л воды, перемешивают, закрывают пробкой, оставляют на 12 часов в теплом месте, после чего отфильтровывают.

Для осаждения белков берут 1-2 г растительного материала, заливают на полчаса водой и прибавляют по каплям раствор основного уксуснокислого свинца до прекращения выпадения осадка. Через 1-2 часа фильтруют, затем фильтрат проверяют на полноту осаждения, осадок промывают водой с несколькими каплями раствора соли свинца. Избытка реактива следует избегать, иначе часть белка может раствориться. Осадок

вместе с фильтром сжигают по методу Кьельдаля. Для определения небелкового азота фильтрат сжигают. Содержание небелкового азота определяют по разнице между общим азотом и белковым. После определения белкового азота можно определить и количество белка в исследуемом материале, умножив количество белкового азота на коэффициент 6,25, принимая во внимание, что белки в среднем содержат 16% азота ( $100:16=6,25$ ).

**Определение содержания аминокислот.** Состав и содержание аминокислот определяют методом жидкостной хроматографии после гидролиза навески водоросли или продукта в 6 н. растворе соляной кислоты при температуре 105-110°C в течение 24 час. Анализ состава и содержания свободных аминокислот проводят тем же методом после их экстракции из образца водоросли подкисленным до (рН 5,5) 70%-ным раствором этилового спирта при комнатной температуре в темноте в течение 24 час. Используют для хроматографического анализа автоматический аминокислотный анализатор, например, L-8800 (Hitachi, Япония).

#### **Определение содержания йода в водорослях и продуктах их переработки**

Метод основан на образовании окрашенного комплексного соединения йода с азотистокислым натрием в кислой среде, адсорбции окрашенных комплексов растворителем (авиационный бензин) [Зикеев, 1950] и измерении экстинкции окрашенного бензинового слоя растворов с помощью фотозлектроколориметра или спектрофотометра.

**Проведение анализа.** Навеску 0,5-1,0 г, измельченного испытуемого образца сушеных водорослей или другого материала, взвешенную в тигле с абсолютной погрешностью не более 0,001 г, смачивают в тигле несколькими каплями 10 % поташа ( $K_2CO_3$  - углекислый калий, из расчета - 0,2 мл на 1 г навески). Содержимое тигля подсушивают и осторожно обугливают в муфельной печи при слабом калении (400-450°C), периодически смачивают водой до получения золы темно-серого оттенка.

Обугленную навеску измельчают стеклянной палочкой в порошок, заливают  $10 \text{ см}^3$  кипящей дистиллированной воды, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр в мерный цилиндр с притертой пробкой вместимостью  $100 \text{ см}^3$ . Золу, перенесенную на фильтр, промывают кипящей дистиллированной водой последовательно 5-6 раз. Общее количество фильтрата не должно превышать  $60 \text{ см}^3$ . После охлаждения фильтрата объем жидкости в цилиндре доводят дистиллированной водой до  $60 \text{ см}^3$ . К фильтрату добавляют  $10 \text{ см}^3$  бензина, 5 мл серной кислоты, разбавленной 1:4. Кислоту добавляют до кислой реакции по лакмусу. Затем добавляют 5 капель 5%-ного раствора азотистокислого натрия. Цилиндр закрывают пробкой и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. Дают смеси отстояться в течение 5-8 мин. Затем бензиновый слой, окрашенный в розово-фиолетовый цвет, осторожно снимают пипеткой и заливают в кювету 10 мм. Измерение оптической плотности бензинового слоя проводят на фотоэлектроколориметре со светофильтром №5 или на спектрофотометре при длине волны 490 нм против чистого бензина. Необходимо проводить контрольный опыт с использованием вместо фильтрата  $60 \text{ см}^3$  дистиллированной воды.

Для получения достоверных данных проводят три определения и по полученным результатам рассчитывают среднее арифметическое значение оптической плотности.

Количество йода, соответствующее определенной оптической плотности, рассчитывают по градуировочному графику.

*Построение калибровочного графика.* Стандартный раствор готовят из свежее перекристаллизованного йодистого калия. Навеску массой 5 г йодистого калия помещают в мерную колбу  $1000 \text{ см}^3$ , растворяют в дистиллированной воде, доводят до метки и перемешивают. 1 мл такого раствора содержит 3,82 мг йода или  $0,00382 \text{ г/см}^3$ . В цилиндры с притертыми пробками вместимостью  $100 \text{ см}^3$  прилить 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 мл раствора йодистого калия, добавляют до 60 мл дистиллированной водой, затем  $10 \text{ см}^3$  авиационного бензина и все последующие реактивы в объе-

мах, добавляемых к рабочей пробе. Цилиндры закрывают пробками, интенсивно встряхивают в течение 2 мин. Дают смеси отстояться в течение 5-8 мин. Затем окрашенный в розово-фиолетовый цвет бензиновый слой осторожно снимают пипеткой и заливают в кювету 10 мм. Оптическую плотность бензинового слоя измеряют на фотоэлектроколориметре со светофильтром №5 или на спектрофотометре при длине волны 490 нм против чистого бензина.

Построение калибровочного графика проводят общепринятым методом. При прямопропорциональной зависимости оптической плотности испытуемого раствора от концентрации в нем йода, следует использовать полученные данные для расчета фактора  $F$ , являющегося средней величиной отношения концентрации йода к оптической плотности раствора, соответствующей концентрации. Фактор  $F$  вводят в формулу расчета содержания йода в навеске испытуемого материала.

*Обработка результатов.* Массовую долю йода в испытуемом продукте ( $X$ ) в процентах, в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле:

$$X = F \times E \times 100 \times 100/M \times (100-W),$$

где:  $F$ - фактор, рассчитанный из данных калибровочного графика;

$E$ -средняя оптическая плотность испытуемых растворов в параллельных опытах;

$W$ -содержание воды в водоросли;

$M$ -навеска водоросли, г.

## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ЛИПИДОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ И ТРАВ

*Экстракция липидов из водорослей.* Первой ступенью при анализе липидов водорослей является их отделение от нелипидных компонентов. Эта процедура заключается в гомогенизации тканей водорослей в соответствующих растворителях, в которых растворяются главным образом липиды. Эффективная количественная экстракция липидов, как нейтральных, так и полярных, обычно достигается при использовании бинарных смесей

растворителей, которые состоят из хлороформа и метанола [Folch, Lees, Sloane-Stanley, 1957]. Наиболее часто применяют метод Блайя и Дайера [Bligh & Dyer, 1959], при котором используют однофазную систему растворителей хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8, по объему). Однако для извлечения липидов из тканей растений, которые содержат довольно много воды, применяют модифицированный метод Блайя и Дайера. В этом случае ткани растений заливают смесью хлороформ-метанол (1:2 по объему), затем водой промывают полученный экстракт для удаления водорастворимых примесей [Kates, 1986].

При экстракции липидов из водорослей, так же как из других растений, необходимо принимать меры для предотвращения действия липолитических ферментов, которые приводят к изменению эндогенных липидов. Для инактивации ферментов водоросли либо предварительно кратковременно нагревают на кипящей воде, а затем извлекают липиды из них смесью хлороформа и метанола, либо обрабатывают их горячим изопропанолом. Часто отдают предпочтение нагреванию водорослей в кипящей воде, однако в тех случаях, когда водоросли разрушаются при кипячении, лучше использовать обработку изопропанолом [Хотимченко, 2003].

Липиды экстрагируют из свежесобранных водорослей. Вместо свежих можно использовать сушеные водоросли, измельченные до порошка, проходящего через сито 60 меш. При использовании свежесобранных водорослей, во избежание изменений липидов при хранении, так как фосфолипиды могут проявлять активность и при температуре ниже 0°C, их обрабатывают как можно быстрее. Свежедобытые водоросли тщательно очищают от эпифитов и загрязнений. Затем их промывают в проточной воде, которую удаляют фильтровальной бумагой и погружают в кипящую воду на 2-3 мин. После кипячения водоросли еще раз обсушивают фильтровальной бумагой, режут на небольшие кусочки, гомогенизируют и извлекают липиды смесью хлороформ-метанол (1:2 по объему). Дополнительные экстракции из твердого остатка смесями этих же растворителей, но в соотношении 1:1, проводят

до обесцвечивания вытяжки. К полученному фильтрату добавляют 1/3 часть общего объема воды, тщательно перемешивают и оставляют на холоде для расслоения. В результате образуется два совершенно прозрачных слоя. Нижний, хлороформный, слой тщательно отделяют и упаривают досуха в вакууме. Остаток растворяют в небольшом количестве растворителя и хранят при температуре порядка минус 10°C. В том случае, когда для инактивации ферментов водоросли обрабатывают, горячим изопропанолом, после нагревания спирт декантируют и упаривают. Остаток водорослей экстрагируют смесью хлороформ-метанол, как описано выше, хлороформный слой объединяют с изопропанолом и упаривают, взвешивают и проводят расчет количественного выхода липидов в процентах.

*Разделение липидов на классы и их идентификация.* Наиболее эффективным методом анализа липидов является метод тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых слоем силикагеля [Svetashev, 1972]. Одномерная хроматография используется для разделения разных групп липидов. Эффективно разделить нейтральные липиды на классы удастся, используя системы растворителей гексан - серный эфир - уксусная кислота в соотношениях от 90:10:1 до 70:30:1 по объему [Kates, 1986]. Система растворителей, предложенная Полем с сотрудниками [Pohl, Glasl, Wagner, 1970], ацетон-бензол-вода (91:30:8), делит главные гликолипиды моногалактозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин, сульфохиновозилдиацилглицерин и оставляет фосфолипиды в области стартовой зоны на пластинке. Эта система растворителей одна из наиболее популярных при анализе липидов растений. Однако нужно заметить, что она применима только для водорослей, которые не содержат бетаиновые липиды.

Разработано множество систем растворителей для разделения всех полярных липидов растений методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Но часто они не дают удовлетворительного разделения главных гликолипидов дигалактозилдиацилглицерина, сульфохиновозилдиацилглицерина и некоторых других компонентов. Применение двумерной

хроматографии в системах растворителей: хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота - вода (100:40:20:20:8 по объему) - первое направление, ацетон-бензол-уксусная кислота-вода (200:30:3:10) - второе направление - позволяет разделить все полярные липиды водорослей (гликолипиды, главные и минорные фосфолипиды, бетаиновые липиды). Наиболее эффективное разделение фосфолипидов удастся достичь при использовании систем растворителей: хлороформ-метанол-бензол-28%-ный аммиак (65:30:10:6 по объему) - первое направление, хлороформ-метанол-бензол-ацетон-уксусная кислота - вода (70:30:10:5:4:1) - второе направление. Несомненно, разделение липидов методом тонкослойной хроматографии существенно зависит от качества и свойств силикагеля. В некоторых случаях использование гипса как связующего агента для силикагеля может давать хорошие результаты [Kates, 1986]. В других случаях замена гипса на флоризил улучшает разделение полярных липидов. Наиболее удобными для анализа сложных смесей липидов являются пластинки с прочно закрепленным слоем силикагеля, которые позволяют не только разделить полярные липиды, но и использовать последовательно несколько реагентов для их идентификации [Беленький и др., 1984].

Следующим этапом после разделения липидов методом тонкослойной хроматографии является их идентификация. Предварительно идентифицировать многие липиды можно, используя спрей-реагенты на ТСХ пластинках. Обработка пластинок 10%-ной серной кислотой в метаноле с последующим сжиганием на горячей плитке, позволяет обнаружить абсолютно все компоненты липидов, которые присутствуют в анализируемом образце. Такой же результат дает и экспозиция пластинок в парах йода.

Для обнаружения конкретных классов липидов разработан ряд специфических реагентов:

1. Фосфолипиды обнаруживают молибдатным реагентом [Vaskovsky et al., 1975], и через 1-2 мин после опрыскивания хроматограмм на белом фоне появляются синие пятна фосфолипидов.

2. Фосфорсодержащие соединения можно идентифицировать с помощью реагента на основе малахитового зеленого [Vaskovsky, Latyshev, 1975]. Для этого хроматограмму опрыскивают 57-72%-ной хлорной кислотой и нагревают на электроплитке до прекращения выделения паров кислоты. Затем пластинку охлаждают и обрабатывают реагентом. При этом фосфорсодержащие пятна приобретают ярко-зеленую окраску на желтом фоне.

3. Для обнаружения гликолипидов хроматограмму опрыскивают 0,2%-ным раствором антрона в бензоле, а затем 5%-ным водным раствором серной кислоты. При нагревании пластинки до 100°C гликолипиды, содержащие галактозу, дают темно-синюю окраску, сульфоллипиды - фиолетовую, фосфолипиды - светло-коричневую [Van Gent et al., 1973].

4. Липиды, содержащие свободную аминогруппу, обнаруживают 0,2%-ным раствором нингидрина в ацетоне с последующим нагреванием пластинки в парах кипящей воды. Такие липиды окрашиваются в розовый цвет [Kates, 1986].

5. Для обнаружения холинсодержащих и других соединений с четвертичными аммониевыми группами используют реактив Драгендорфа [Wagner et al., 1961], после опрыскивания которым, такие соединения дают красно-оранжевые пятна на желтом фоне.

Предварительно идентифицировать липиды можно также, сравнивая хроматографическое поведение в разных системах растворителей и окрашивание специфическими реагентами анализируемых липидов и заведомых стандартов. Для более строгой идентификации индивидуальные липиды гидролизуют и анализируют образующиеся фрагменты. С этой целью широко используют хроматомасс-спектрометрию, ИК- и масс-спектрометрию, методы ядерно-магнитного резонанса и другие физико-химические методы анализа [Kates, 1986]. Эти же методы используют для характеристики интактных липидов.

**Колоночная хроматография.** Для отделения нейтральных липидов от полярных (фосфолипидов, гликолипидов, бетаиновых липидов) используют колоночную хроматографию на силикагеле [Kates, 1986]. Этот метод часто применяют для разделения индивидуальных полярных липидов, элюируют липиды с силикагеля хлороформом с возрастающей концентрацией метанола. Однако полностью разделить все полярные липиды этой процедурой не удастся, поэтому колоночную хроматографию комбинируют с тонкослойной или с высокоэффективной жидкостной хроматографией. Липидные смеси можно разделить на три группы: нейтральные липиды, гликолипиды и фосфолипиды - методом колоночной хроматографии на силикагеле, последовательно элюируют их хлороформом, ацетоном и метанолом [Kates, 1986].

**Количественное определение липидов.** Для определения количества всех разделенных липидов используют разные методы. Содержание гликоглицеролипидов определяют по количеству остатков моносахаридов, входящих в их состав, фенолсерным методом, количество фосфолипидов - по содержанию фосфора [Хотимченко С.В., 2003]. Универсальным методом для количественного определения любых ацильных липидов является определение содержания жирных кислот, входящих в состав липидов, методом газожидкостной хроматографии, с использованием какой-либо кислоты как внутреннего стандарта. Чаще применяют для этой цели гептадекановую кислоту [Жуков, Верещагин, 1970].

**Определение состава жирных кислот.** Жирные кислоты анализируют в виде их метиловых эфиров методом газожидкостной хроматографии. Для получения метиловых эфиров жирных кислот предложено несколько методов. Для этерификации свободных жирных кислот используют 2,5%-ную HCl в метаноле или диазометан, для трансметилирования сложных липидов применяют или 0,5 М метоксид натрия в метаноле, или BF<sub>3</sub>-метанол (14%), или 2,5%-ную H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метаноле [Хотимченко С.В., 2003].

Для анализа небольших количеств липидов, пожалуй, самым удобным является метод, предложенный Карро и Дюбак [Carreau, Dubacq, 1978].

В этом случае для получения метиловых эфиров жирных кислот аликвоту экстракта липидов упаривают досуха, перерастворяют в небольшом количестве бензола, добавляют 1%-ный метилат натрия и нагревают в течение 5 мин при 55°C. Затем реакционную смесь охлаждают, прибавляют 5%-ный HCl в метаноле и нагревают еще 5 мин при 55°C. После охлаждения к пробе добавляют воду и гексан, тщательно перемешивают и оставляют для расслоения. Затем верхнюю фазу отбирают, упаривают и перерастворяют в 0,1 мл гексана. В случае наличия липидов с амидной связью для получения метиловых эфиров жирных кислот используют кислотный метанолит (например, 5%-ная HCl в метаноле, 80°C, 2-4 ч).

Полученные метиловые эфиры жирных кислот очищают тонкослойной хроматографией в бензоле и элюируют с силикагеля хлороформом. Элюат упаривают, метиловые эфиры жирных кислот перерастворяют в небольшом количестве гексана и анализируют методом ГЖХ. Процентное содержание кислот рассчитывают по методу Кэррола [Carrol, 191]. Однако нужно отметить, что современные хроматографы снабжены интеграторами или компьютерами, производящими обсчет хроматограмм по специальным программам.

Жирные кислоты идентифицируют по времени удерживания ( $R_f$ ) и значению углеродных чисел стандартов, таблицы которых приведены в ряде статей [Kramer et al., 1985; Christie, 1988]. Часто этой информации бывает достаточно для того, чтобы предварительно верно идентифицировать жирные кислоты. Дополнительно для идентификации жирных кислот их метиловые эфиры разделяют препаративно по степени ненасыщенности тонкослойной хроматографией на силикагеле, пропитанном нитратом серебра [Dudley, Anderson, 1975]. Для этого применяют разные системы растворителей, в зависимости от поставленной задачи. Разделить метиловые эфиры всех жирных кислот, включая полиненасыщенные, часто удается в

системе растворителей гексан-диэтиловый эфир-уксусная кислота (94:4:3 по объему). Образовавшиеся зоны собирают, МЭЖК элюируют хлороформом с силикагеля и анализируют методом газожидкостной хроматографии [Хотимченко С.В., 2003]. Ценную информацию для идентификации жирных кислот дает гидрирование их метиловых эфиров, а также применение физических методов (ИК-спектроскопии для идентификации двойных связей в *тран*сположении, масс-спектрометрии для обнаружения кето- и гидроксигрупп). Для определения положения двойных связей в жирных кислотах используют хромато-масс-спектрометрию пирролидиновых [Anderson, Holman, 1974], пиколиновых и других производных [Christie 1998].

## **МЕТОДЫ АНАЛИЗА И ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ**

Препаративное выделение углеводов из бурых водорослей и трав: маннита, альгиновой кислоты и ее солей - альгинатов, а также фукоидана, ламинарана, пектинов (зостерина) можно использовать для оценки их количественного содержания в биомассе водоросли, однако разные методики выделения, в зависимости от применяемых реагентов, числа и условий обработки водорослей, пересадений низкомолекулярных и высокомолекулярных углеводов (полисахаридов), в результате которых достигается определенная степень чистоты конечного препарата, могут давать заметно расходящиеся результаты для одного и того же исходного образца водоросли. Поэтому для получения достоверных сравнительных данных необходимо проводить не менее 5 параллельных измерений и использовать постоянные методы.

### **Определение содержания альгиновой кислоты и выхода ее солей – альгинатов**

*Весовой метод.* Навеску от 5 до 10 г (высушенной и измельченной водоросли) помещают в химический, термоустойчивый стакан прибавляют

150 мл 0,5% соляной кислоты и выдерживают при периодическом перемешивании 2,5-3 часа. Кислоту сливают декантацией через бумажный фильтр. Навеску водоросли промывают водой до нейтрального рН промывных вод. При попадании на фильтр частиц водоросли их возвращают в стакан.

**1. Экстракция.** Навеску (10-50 г) водоросли заливают 100 мл 3%-ного раствора карбоната натрия и проводят экстракцию альгината натрия при температуре 80-90<sup>0</sup>С в течение 2-4 час. рН раствора в течение всей экстракции должен поддерживаться в интервале 8,5-9,0. При необходимости добавляют к экстракту карбонат натрия. Горячий экстракт сливают через капроновый фильтр в мерную колбу на 200-250 мл. Водорослевый остаток заливают еще 50 мл 3%-ного раствора карбоната натрия и проводят повторную экстракцию при температуре 80-90<sup>0</sup>С в течение 1 часа. Второй экстракт сливают через капроновый фильтр в ту же мерную колбу. Водорослевый остаток заливают 50 мл горячей дистиллированной воды, нагревают в течение 20-30 мин при температуре 80-90<sup>0</sup>С, полученный экстракт сливают через капроновый фильтр в ту же мерную колбу. Экстракт в колбе охлаждают, доводят содержимое колбы до метки, затем его центрифугируют при 8000-10000 об./мин. или фильтруют через тканевый (марлевый) фильтр с ватной прослойкой. Отфильтрованный экстракт не должен содержать нерастворимых примесей. Очищенный экстракт альгината натрия используют для определения содержания альгиновой кислоты, выхода альгината натрия, альгината кальция или какой – либо другой соли альгиновой кислоты.

**2. Определение содержания альгиновой кислоты.** В 50 мл отфильтрованного экстракта тонкой струйкой или капельно при перемешивании вливают 10-18%-ный раствор соляной кислоты до выделения из экстракта геля альгиновой кислоты (рН раствора 2-3). Образовавшийся осадок альгиновой кислоты отфильтровывают и

промывают горячей водой на капроновом (плотном) фильтре до pH геля 3-  
Рассчитывают содержание альгиновой кислоты ( $X_{\text{альг.}}$ ) в % на сухое  
вещество водоросли по формуле:

$$X_{\text{альг.}} = (m_1 \times 100 \times V_1) / (m \times V_2 \times (100-w)), \quad (1)$$

где:  $m$  – масса водорослей, взятых на экстракцию, г;  
 $m_1$  – масса высушенной альгиновой кислоты, г;  
 $V_1$  – общий объем экстракта, полученный при экстрагировании  
водорослей;  
 $V_2$  – объем экстракта, взятого на осаждение альгиновой кислоты;  
 $w$  – массовая доля воды в водоросли, взятой для экстракции, %.

При необходимости получения чистой альгиновой кислоты в качестве  
продукта или реактива для анализа обезвоженный спиртом гель альгино-  
вой кислоты досушивают в вакууме над фосфорным ангидридом, обезво-  
женным хлоридом кальция или лиофилизацией. Затем измельчают до по-  
рошкообразного состояния, расфасовывают в стеклянные банки с притер-  
той пробкой.

**3. Определение выхода альгината натрия.** Из аликвоты экстракта,  
полученного по п.1, осаждают гель альгиновой кислоты по п. 2. Затем гель  
альгиновой кислоты после промывания его водой до pH 5 и отделения  
избытка жидкости смешивают с карбонатом натрия, тщательно  
перемешивают до полного растворения геля, постепенно доводят pH до  
7,5. Прозрачную однородную пасту альгината натрия обрабатывают  
дважды 96%-ным этиловым спиртом, помещают в бюкс и высушивают до  
постоянного веса при температуре 60-70<sup>0</sup>С.

Рассчитывают выход альгината натрия в процентах относительно  
сухого вещества водоросли по формуле (1).

Для получения качественной характеристики альгината натрия, его  
выделяют описанным способом в количестве не менее 5 г.

Для этого навеску водоросли берут 20–50 г (в зависимости от вида  
бурой водоросли) и проводят всю процедуру в соответствии с п. 1, 2, 3 и  
учетом увеличения навески, а также объемов реактивов и используемой

посуды. Альгинат натрия, высушенный до содержания воды не более 10%, измельчают до порошкообразного состояния и помещают в банку с притертой пробкой и хранят до анализа.

**4. Определение выхода альгината кальция.** Для определения выхода альгината кальция, в аликвоту отфильтрованного альгинатного экстракта, полученного по п.1 тонкой струйкой или капельно при перемешивании вливают 10%-ный раствор хлорида кальция до полного выделения из экстракта геля альгината кальция. Образовавшийся осадок альгината кальция тщательно перемешивают с придавливанием гранул, выдерживают для созревания осадка 20-30 мин, отфильтровывают на капроновом фильтре, промывают горячей водой, отжимают избыток воды. Альгинат кальция обрабатывают этиловым спиртом 2 раза, помещают во взвешенный бюкс и высушивают при температуре 60-70<sup>0</sup>С до постоянного веса. Рассчитывают выход альгината кальция в процентах относительно сухого вещества водоросли по формуле (1).

**Объемный титрометрический метод определения содержания альгиновой кислоты в водорослях и альгинатах.** Навеску измельченной водоросли (0,2-0,3 г) заливают 20 мл 0,5%-ной раствором соляной кислоты, выдерживают 2,5 часа при комнатной температуре. Навеску любой соли альгиновой кислоты или продукта из водоросли также обрабатывают 0,5 %-ным раствором соляной кислоты в течение 2,5 часов.

После обработки раствором кислоты навеску водоросли (альгината или продукта) промывают дистиллированной водой 3 раза, приливая по 30-40 мл, с настаиванием в течение 20 мин. Затем осадок промывают этиловым спиртом 2-3 раза по 10-20 мл (до отрицательной реакции на ионы хлора с AgNO<sub>3</sub>).

Промытый осадок вместе с фильтром переносят в колбу, заливает 40 мл 0,1 н. раствором NaOH, добавляют 3-4-капли фенолфталеина. Колбы закрывают пробками и выдерживают 1-2 ч при периодическом

перемешивании до растворения. Избыток щелочи титруют 0,1 н. раствором серной кислоты.

Одновременно проводят не менее 3 параллельных определений, исследуемого образца, также проводят контрольный опыт с фильтром без навески испытуемого образца.

Количество альгиновой кислоты (X) в процентах, в переводе на сухое вещество, вычисляют по формуле 2:

$$X = (V_1 - V_2) \times K \times 0,01805 \times 100 \times 100 / M \times (100 - W), (2),$$

где  $V_1$  - объем 0,1 н. раствора серной кислоты, пошедшей на титрование контрольного опыта, мл,

$V_2$  - объем 0,1 н. раствора серной кислоты, пошедшей на титрование избытка гидроокиси натрия в рабочем опыте, мл,

$K$  - коэффициент пересчета нормальности на точный раствор гидроокиси натрия (0,1 н.)\*

$M$  - навеска образца, г;

$W$  - содержание воды в образце, %;

**0,01805** – количество альгиновой кислоты эквивалентное 1 н. раствору гидроокиси натрия.

---

\*Примечание. Коэффициент  $K$  вычисляют по результатам титрования 25 мл 0,1 н. раствора серной кислоты 0,1 н. раствором щелочи (гидроокиси натрия) с 3-4 каплями фенолфталеина

**Спектрофотометрический метод определения содержания альгиновой кислоты в водорослях и альгинатах.** Спектрофотометрические методы определения содержания полисахаридов в водорослях и травах и продуктах их переработки основаны на кислотной деградации полисахаридов и последующем измерении на спектрофотометре при определенной длине волны оптической плотности продуктов реакции моносахаров с реагентами, дающими стабильную цветную окраску. Предварительно должны быть построены калибровочные графики с использованием растворов стандартных уроновых кислот, соответствующих определяемым. В качестве реагентов используют: карбазол; индол; 3-гидроскибифенил; 3,5-диметилфенол; нафторезорцин [Haug, 1964; Usov, Bilan, Klochkova, 1995].

*Методика.* Точную навеску сухой измельченной водоросли (или альгинатного препарата) (в пределах 50-60 мг) помещают в центрифужный стакан на 50 мл, приливают 25 мл 0,2 М HCl и перемешивают на магнитной мешалке 1 ч при 50°C. Экстракт отделяют центрифугированием, к остатку водорослей приливают 25 мл 0,1М HCl и экстрагируют еще раз в тех же условиях. От соляной кислоты остаток водорослей или альгинатного препарата отмывают водой несколько раз с настаиванием, отделяя воду от навески центрифугированием или фильтрованием. Приливают в пробирку с навеской 7 мл 0,1 н. раствора NaOH. Пробирки с пробами помещают в стакан, который ставят на водяную баню для экстракции или растворения альгиновой кислоты при 60°C в течение 1-1,5 часов при регулярном перемешивании. После обработки пробу из пробирки количественно переносят в мерную колбу на 250 мл, охлаждают и доводят дистиллированной водой до метки. Экстракт перемешивают, отфильтровывают или центрифугируют и проводят цветную реакцию.

*Проведение цветной реакции.* 1 мл испытуемого раствора помещают в пробирку, охлаждают в пробирках на ледяной бане. Затем осторожно прибавляют 6 мл 2,5% раствора тетрабората калия в концентрированной серной кислоте, 0,2 мл 0,1% спиртового раствора карбазола, перемешивают и термостатируют в течение 20 минут при температуре 100°C. За это время развивается окраска (розовая), стабильная в течение 48 часов.

Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре длина волны 530 нм относительно концентрированной серной кислоты.

Концентрацию альгиновой кислоты (X) в пересчете на сухую навеску рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{F * r * V * 100}{M * (100 - W)} * 100\%,$$

где: r – оптическая плотность исследуемого образца;

F – средняя величина отношений концентрации альгиновой кислоты к оптической плотности окрашенного раствора по калибровочному графику;

V – разведение;

M – навеска водоросли или альгината, г;

W – количество воды в образце, %.

*Построение калибровочного графика.* Стандартные растворы готовят из химически чистого реактива альгиновой кислоты с концентрацией 0-100 мкг/мл с шагом 10 мкг/мл.

Навеску альгиновой кислоты помещают в стакан, приливают дистиллированной воды, добавляют карбонат натрия до рН 7,5-8 и выдерживают альгиновую кислоту до полного растворения при поддержании рН не менее 7,5. Растворы количественно переносят в мерные колбы 50см<sup>3</sup>, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. В пробирки помещают по 1 мл раствора альгиновой кислоты каждой концентрации, пробирки с содержимым охлаждают на ледяной бане. Затем в каждую пробирку осторожно прибавляют 6 мл 2,5% раствора тетрабората калия в концентрированной серной кислоте, 0,2 мл 0,1% спиртового раствора карбазола, перемешивают и термостатируют в течение 20 мин при температуре 100°С. За это время развивается окраска (розовая), стабильная в течение 48 час. Для приготовления спиртового раствора карбазола используют очищенный возгонкой карбазол.

Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 530 нм относительно концентрированной серной кислоты.

Построение калибровочного графика проводят общепринятым методом.

При прямопропорциональной зависимости оптической плотности испытуемого раствора от концентрации в нем альгиновой кислоты, следует использовать полученные данные для расчета фактора F, являющегося средней величиной отношения ее концентрации к

оптической плотности раствора, соответствующей концентрации. Фактор F вводят в формулу расчета содержания альгиновой кислоты в навеске испытуемого материала.

**Определение моносахаридов.** Моносахаридный состав биомассы водорослей, трав или выделенных образцов полисахаридов определяют после гидролиза обезжиренного растительного сырья или полисахарида методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде ацетатов полиолов с ацетатом мио-инозита в качестве внутреннего стандарта.

Сухую, измельченную биомассу растительного материала (20-30 мг) или полисахаридов (8-12 мг) обрабатывают при комнатной температуре смесью метанол-хлороформ-вода, 4:2:1 (4 x 50 мл) для удаления низкомолекулярных веществ [Усов, Элашвилли, 1991]. Затем, к обезжиренной навеске приливают 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей мио-инозит (0,9 мг/мл), нагревают 8 ч при 100<sup>0</sup>С, упаривают трижды с этанолом. К остатку прибавляют несколько капель воды и 1-2 капли 3%-ного раствора карбоната натрия (для нейтрализации следов кислоты), затем вносят 15-20 мг боргидрида натрия и оставляют на ночь. Далее приливают 10%-ный раствор уксусной кислоты в метаноле (10 мл), упаривают досуха, к остатку трижды прибавляют метанол по 10 мл и отгоняют. К полученной смеси полиолов приливают 1 мл пиридина и 1 мл уксусного ангидрида, нагревают 1 ч при 100<sup>0</sup>С, охлаждают, трижды приливают и отгоняют по 10 мл толуола, остаток распределяют между 5 мл воды и 5 мл хлороформа, органический слой фильтруют через ватный тампон и упаривают досуха. Остаток, содержащий ацетаты полиолов, растворяют в 1 мл хлороформа и используют для ГЖХ.

ГЖХ проводят на хроматографе, например, Hewlett-Packard 5890A с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой HP Ultra-2 и интегратором HP 3393A, газ-проявитель – азот, температурный режим колонки: 175<sup>0</sup>С (1 мин.), далее нагрев до 290<sup>0</sup>С со скоростью 10<sup>0</sup>/мин и выдерживание при 290<sup>0</sup>С (3 мин.). Качественную идентификацию ацетатов

полиолов проводят прямым сравнением с заведомыми образцами, а расчет количественного содержания проводят по площадям хроматографических пиков в сравнении с пиком внутреннего стандарта (ацетата мио-инозита).

**Определение содержания маннита.** Для определения содержания маннита в биомассе водоросли существует несколько методов. Наиболее простой используемый для оценки качества сырья при промышленном получении маннита является метод, основанный на образовании медных комплексов при периодатном окислении по ГОСТ 26185-84. Удобнее и надежнее использовать хроматографические методы анализа маннита, например, ГЖХ [Усов, Клочкова, 1994].

К точной навеске сухой измельченной водоросли (10-50 мг в зависимости от ожидаемого содержания маннита) приливают 1,0 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей миоинозит (внутренний стандарт) в концентрации 0,9 мг/мл. После перемешивания в течение 16 ч приливают 10 мл этанола, перемешивают в течение 2 ч, фильтруют, фильтрат упаривают в вакууме и из остатка удаляют следы кислоты упариванием с этанолом (3 x 10 мл), к остатку прибавляют около 1г силикагеля L (100-160 мкм, Chemapol) и 3 мл хлороформа, энергично перемешивают, фильтруют в колбу, осадок на фильтре промывают хлороформом (2x3 мл), фильтраты объединяют, упаривают, остаток растворяют в 1 мл хлороформа и подвергают ГЖХ.

Хроматографию проводят на газо-жидкостном хроматографе с пламенно-ионизационным детектором с использованием капиллярной колонки Ultra-1 (25 м x 0,2 мм, слой поперечно сшитого метилсиликона толщиной 0,33 мкм) в токе азота при градиенте температуры от 175 до 290°C со скоростью 10°/мин.

Расчет содержания маннита проводят по площадям пиков ацетатов маннита и инозита, определенных с помощью интегратора и по калибровочному графику, построенному для известных количеств маннита, обработанных по методике [Усов, Клочкова, 1994].

**Количественное выделение ламинарана.** К навеске (250 г) сырой измельченной водоросли прибавляют 500 мл 0,125 н. соляной кислоты и 1 мл 40%-ного раствора формалина и выдерживают на водяной бане при 70<sup>0</sup>С в течение 30 мин при перемешивании. Экстракт отделяют от водоросли фильтрованием и промывают остаток водорослей 2 раза по 100 мл горячей водой (70<sup>0</sup>С). Фильтрат и промывные воды соединяют, перемешивают в течение 3 час и оставляют на 2 дня в холодильнике. Осадок ламинарана отделяют центрифугированием, промывают 100 мл спирта и 100 мл эфира и сушат в вакууме над фосфорным ангидридом. Этим методом извлекают из водоросли около 80% "нерастворимой в холодной воде" формы ламинарана и около 60% его осаждается из водного кислого раствора при стоянии. Вместо свежей водоросли можно использовать сушеную водоросль, измельченную так, чтобы порошок проходил через сито 60 меш. В этом случае экстракцию проводят на холоде. Для извлечения "растворимой в воде" формы ламинарана 30 г сухой измельченной водоросли заливают 250 мл холодной 0,09 н. соляной кислоты и экстракцию проводят на холоде в течение 2 часов при перемешивании. Смесь центрифугируют, и остатки водоросли промывают 0,05 н. соляной кислотой 2 раза по 50 мл. Надосадочную жидкость и промывные растворы объединяют и прибавляют к ним спирт до 85%-ной его концентрации. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием, промывают 50 мл спирта и 50 мл эфира и сушат на воздухе. При этом из сухой водоросли извлекается около 90% ламинарана.

Выделенный ламинаран обычно содержит фукоидан, от которого избавляются методом ионообменной хроматографии. 15 г ламинарана растворяют в 180 мл воды, раствор пропускают через колонку, содержащую 20 мл ионообменной смолы, и промывают колонку 50 мл воды. К элюату прибавляют спирт до его 85%-ной концентрации, при которой выделяется ламинаран в полукolloидном виде. Коагуляцию ламинарана усиливают,

добавляя 1 мл воды с 0,2 г хлористого натрия. Образовавшийся осадок отделяют центрифугированием и высушивают в вакууме над фосфорным ангидридом [Методы химии углеводов, 1967].

### *Количественное выделение фукоидана*

*1-й способ.* Навеску сухой измельченной водоросли перемешивают с 50 частями 0,2 н. соляной кислоты в течение 2 часов (в медленно перемешивающем и встряхивающем устройстве). Смесь фильтруют и проводят еще раз экстракцию с 50 частями 0,2 н. соляной кислоты в течение ночи, затем фильтруют повторно. Фильтраты объединяют, нейтрализуют и упаривают в вакууме до объема, равного 1/10 от исходного. Концентрированный раствор диализуют против дистиллированной воды. После этого к раствору добавляют ацетат кальция из расчета, чтобы получить 0,005 М концентрацию, и двукратный объем этанола. Образовавшийся осадок отфильтровывают, промывают спиртом и эфиром, высушивают под вакуумом. Перед использованием фукоидан можно перевести в натриевую форму, пропустив его раствор через колонку с Dowex 50 W x 4 в кислой форме, затем нейтрализовать гидроокисью натрия [Haug, 1964].

*2-й способ.* Навеску измельченной сухой водоросли перемешивают со 100 мл смеси метанол-хлороформ-вода (4:2:1) в течение 8 ч при комнатной температуре, водоросль отфильтровывают и высушивают в вакууме. 15 г обезжиренных водорослей перемешивают с тремя порциями по 150 мл 0,1 н. HCl в течение 3 ч при 80<sup>0</sup>C, экстракты охлаждают, нейтрализуют NaHCO<sub>3</sub>, объединяют, диализуют против дистиллированной воды, фильтруют и упаривают в вакууме до объема 100 мл. К полученному раствору приливают при перемешивании 10% водный раствор цетавлона (около 30 мл) до полного осаждения кислых полисахаридов. Осадок отделяют центрифугированием, промывают водой и растворяют при

перемешивании и осторожном нагревании до 60-70<sup>0</sup>С в 100 мл 4 М СаСl<sub>2</sub>. Небольшой осадок отделяют центрифугированием, а к супернатанту приливают 4 объема этанола. Выпавший осадок отделяют, промывают этанолом, суспендируют в 100 мл дистиллированной воды и диализуют. По окончании диализа раствор фильтруют, концентрируют в вакууме и лиофилируют. Выделенный фукоидан - это сумма фракций, которые могут отличаться по молекулярной массе и содержанию сульфатов [Усов, Кириянов, 1994].

**Фракционирование фукоидана.** Раствор, содержащий 0,9 г фукоидана в 100 мл 0,01 н. НСl, наносят на колонку (4x100 см) с ДЕАЕ-сефадексом А-25 (Сl-форма), которую промывают последовательно 1,25, 1,5, 1,75 и 3 М растворами NaCl в 0,01 н. НСl (по 2 л каждого раствора). Полученные фракции нейтрализуют Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, диализуют против дистиллированной воды, концентрируют в вакууме и лиофильно высушивают.

#### **Спектрофотометрическое определение фукоидана и альгината в одной навеске водоросли [Усов и др., 2001]**

*Подготовка образцов.* Высушенные водоросли измельчают в измельчителе любого типа и просеивают через сито 0.25 мм.

*Реактивы и растворы.* Для экстракции используют следующие растворы: 0,2 М НСl, 0.1М НСl 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Для обесцвечивания экстрактов необходимы твердый хлорит натрия NaClO<sub>2</sub> (достаточно квалификации тех. с содержанием основного вещества 85%) и бром (ч).

Для спектрофотометрических определений используют: концентрированную H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> чда; смесь конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с водой в соотношении 5:2; 20% водный раствор H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (к суспензии борной кислоты в воде прибавляют небольшими порциями твердый NaOH до полного растворения осадка); 0.1%-ный раствор 3,5-диметилфенола в ледяной уксусной кислоте; 3%-

ный водный раствор хлоргидрата цистеина (цистеин легко окисляется на воздухе, поэтому реагент можно хранить в холодильнике несколько дней. Если в реагенте выпали белые кристаллы, необходимо готовить свежий раствор!).

*Приборы.* Прибор для экстракции представляет собой магнитную мешалку с водяной баней, снабженной нагревателем, реле и контактным термометром для автоматического поддержания температуры 50°C. Экстракция проводят в центрифужном стакане объемом 50 мл с перемешиванием магнитным сердечником. Для отделения экстрактов от остатка водоросли используют лабораторную центрифугу с 5000 - 6000 об./мин (достаточно центрифугирования в течение 5-10 мин). Диализ проводят в мешках из обычного листового целлофана. Для спектрофотометрии используют спектрофотометр, позволяющий проводить измерения в видимой области при 396, 400, 430 и 450 нм в кварцевых 10 мм кюветах. Для проведения цветных реакций необходимы также кипящая водяная баня и термостат с температурой 70°C.

*Экстракция фукоидана.* Точную навеску сухой измельченной биомассы водоросли (в пределах 150-160 мг) помещают в центрифужный стакан на 50 мл, приливают 25 мл 0,2 М HCl и перемешивают на магнитной мешалке 1 ч при 50°C. Экстракт отделяют центрифугированием, к остатку водоросли приливают 25 мл 0,1 М HCl и экстрагируют еще раз в тех же условиях. Кислые экстракты объединяют, вносят  $75 \pm 5$  мг хлорита натрия, перемешивают до полного растворения соли, выдерживают 1 ч при комнатной температуре, диализуют в течение 3 суток против дистиллированной воды, каждый день, меняя воду. Раствор фильтруют через бумажный фильтр, измеряют объем с точностью до 1 мл (обычно он равен примерно 55 мл). Таким образом, получают раствор 1. В аликвотах по 0,5 мл определяют содержание фукоидана по реакции фукозы с хлоргидратом L-цистеина и конц. серной кислотой. Для построения калибровочного графика в интервале 0-75 мкг фукозы в пробе используют раствор L-фукозы (Fluka), 150 мкг/мл. Результат определения уд-

ваивают, исходя из среднего содержания фукозы в фукоиданах, равного 50%.

**Экстракция альгината.** Остаток водоросли перемешивают с 25 мл 3%-ного раствора карбоната натрия в течение 1 ч при 50° С, экстракт отделяют центрифугированием, а осадок еще дважды обрабатывают в тех же условиях. К объединенному содовому экстракту при комнатной температуре прибавляют 5 капель (110 мг, 0,035 мл) брома, перемешивают несколько мин. до полного растворения брома и оставляют на ночь. Обесцвеченный раствор подвергают диализу в течение 3 суток против дистиллированной воды, меняя воду каждый день, переносят в мерную колбу на 500 мл, доводят до метки водой, при необходимости фильтруют через бумажный фильтр. Таким образом, получают раствор 2. Определяют содержание альгината в аликвотах по 0,5 мл по реакции с 3,5-диметилфенолом и серной кислотой. Для построения калибровочного графика в интервале 0-50 мкг альгината в пробе используют раствор альгината натрия (BDH, Англия), 100 мкг/мл.

**Определение фукозы с хлоргидратом цистеина и конц.  $H_2SO_4$**  В пробирку на 20 мл помещают 0,5 мл исследуемого раствора (1), осторожно приливают по стенке 4 мл смеси  $H_2SO_4$  - вода 5:2, перемешивают, приливают 1 мл конц.  $H_2SO_4$ , снова перемешивают, нагревают на кипящей водяной бане точно 10 мин., помещают в холодную воду и после охлаждения выдерживают некоторое время при комнатной температуре. Затем прибавляют 0,1 мл 3%-ного раствора хлоргидрата цистеина, перемешивают, выдерживают 2 часа при комнатной температуре и измеряют оптическую плотность при двух длинах волн, 396 и 430 нм. Разность оптических плотностей при этих двух длинах волн используют в расчете. Контролем служит смесь, в которой вместо исследуемого раствора используют 0,5 мл воды. Для построения калибровочного графика готовят водные растворы L-фукозы, содержащие 0-80 мкг сахара в пробе (0-160 мкг/мл).

**Определение альгината по реакции с конц.  $H_2SO_4$  и 3,5-диметилфенолом.** В пробирку на 20 мл помещают 0.5 мл исследуемого раствора (2), приливают 0,5 мл 20%-ной борной кислоты и далее осторожно, не допуская сильного разогревания и разбрызгивания, прибавляют 4 мл конц.  $H_2SO_4$ . После тщательного перемешивания пробирку помещают в термостат и выдерживают 40 мин при 70 °С. Далее пробирки охлаждают водой, доводят до комнатной температуры, прибавляют 0,1 мл раствора 3,5-диметилфенола в уксусной кислоте, перемешивают и через 15 мин измеряют оптическую плотность при двух длинах волн, 400 и 450 нм. Разность оптических плотностей при этих двух длинах волн используют в расчете. Контролем служит смесь, в которой вместо исследуемого раствора используют 0,5 мл воды. Для построения калибровочного графика готовят водные растворы заведомого альгината натрия с концентрацией 0-100 мкг/мл.

**Определение содержания клетчатки.** Навеску растительного материала (в зависимости от ожидаемого количества клетчатки) помещают в колбу, соединяют с притертым обратным холодильником (длиной 50-75 см) и приливают смесь из 75 мл 80%-ной уксусной кислоты, 5 мл азотной кислоты (уд. вес 1,4) и 2 г трихлоруксусной кислоты. Содержимое колбы кипятят при осторожном подогревании в течение 15-30 мин, фильтруют через тигель Гуча с асбестом. Колбу промывают горячей реактивной смесью, затем горячей водой, тщательно собирая частички клетчатки в тигель. Клетчатку в тигле промывают спиртом, затем эфиром, высушивают и взвешивают [Белозерский, Проскураков, 1961].

Присутствие в смеси трихлоруксусной кислоты не обязательно, но желательно для полного удаления лигнина. Для определения клетчатки по методике в модификации А.И.Ермакова используют смесь этилового спирта с азотной кислотой (4:1). К навеске приливают 50 мл смеси, колбу соединяют с обратным холодильником и помещают на водяную баню на 1 ч. По окончании нагревания дают осесть осадку и раствор сливают

декантацией через стеклянный фильтр, чтобы не взмутить осадок. К осадку в колбе приливают снова 50 мл смеси спирта с кислотой и снова нагревают в течение 30 мин. После вторичной декантации через тот же стеклянный фильтр осадок в колбе промывают небольшими порциями этилового спирта (96%-ного), приливают в колбу 50 мл 1,25%-ного раствора едкого натрия (или калия) и снова нагревают на плитке. Щелочной раствор вместе с осадком переносят на фильтр, промывают 2 раза по 10-15 мл горячей дистиллированной водой, а затем 1-2 раза этиловым спиртом. Стеклянный фильтр с чистой белой клетчаткой сушат до постоянного веса при 105<sup>0</sup>С [Петров, 1965]. Содержание клетчатки рассчитывают в процентах по отношению к исходной навеске на абсолютно сухое вещество.

*Методы определения альгиновых кислот, основанные на деградации уроновых кислот.* Ряд методик определения альгиновых кислот основываются на специфических реакциях уроновых кислот. К таким реакциям относятся декарбоксилирование и деградация действием концентрированной серной кислоты с последующим образованием окрашенных продуктов в присутствии карбазола, индола, 3-гидроксибифенила и т.д. Эти методы нашли широкое применение, хотя присутствие в анализируемом объекте других полисахаридов, содержащих уроновые кислоты, могут исказить результаты определения альгинатов. Нагревание альгинатов приводит к декарбоксилированию и выделению CO<sub>2</sub>. Обычно анализируемые образцы нагревают с 19%-ной HCl, а выделяющийся CO<sub>2</sub> поглощают и взвешивают, как при микроаналитическом определении углерода в органических соединениях сожжением. Методика рекомендована в практическом руководстве по биохимическим методам исследования водорослей, но ее выполнение требует специального оборудования и навыков. Это справедливо и для модифицированного метода декарбоксилирования, в котором образцы

полисахаридов нагревают с 57%-ной  $\text{HI}$ , а, выделяющийся  $\text{CO}_2$ , определяют методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) или прямым неводным титрованием. При этом другие полисахариды, содержащие уроновые кислоты, мешают определению альгинатов.

*Колориметрическое определение полиуронидов.* Гораздо большее распространение приобрели методы колориметрического определения полиуронидов (альгинатов, морского пектина-зостерина), основанные на кислотной деградации входящих в их состав моносахаридов. При нагревании производных уроновых кислот с концентрированной серной кислотой главным продуктом реакции является довольно устойчивая в этих условиях 5-формилфуран-2-карбоновая кислота. Ее прямому спектрофотометрическому определению мешают продукты разложения нейтральных сахаров — 5-гидроксиметилфурфурол и фурфурол, образующиеся соответственно из гексоз и пентоз. Поэтому лучше воспользоваться способностью 5-формилфуран-2-карбоновой кислоты давать окрашенные продукты с разнообразными органическими реагентами, в частности, с некоторыми ароматическими азотистыми гетероциклами и фенолами. В качестве таких реагентов в разное время были предложены карбазол, индол, 3-гидрокси-бифенил и 3,5-диметилфенол.

Наряду с очевидным преимуществом (возможность работы с микро- количествами веществ) методики колориметрического определения обладают и существенными недостатками. К ним относятся в первую очередь помехи, вносимые нейтральными сахарами, и различная реакционная способность разных уроновых кислот. Поэтому, хотя реакция с карбазолом давно используется для определения полиуронидов, включая альгиновые кислоты, сама методика анализа неоднократно подвергалась модификациям. Так, для увеличения интенсивности окрашивания и выравнивания реакционной способности

различных уроновых кислот предложено вводить в реакционную смесь добавки борной кислоты, а для устранения влияния нейтральных сахаров прибавлять сульфамат или изменять температурный режим. Проведение реакции с карбазолом в четырех различных условиях позволяет, в принципе, рассчитать состав образца, содержащего три уроновые кислоты: глюкуроновую, галактуроновую и маннуриновую [Knutson, Jeanes, 1968].

В методике колориметрического определения полиуронидов, в том числе альгиновых кислот, в качестве реагента используют 3-гидрокси-бифенил в комбинации с борат-анионом и сульфаматом или 3,5-диметилфенол, что является более предпочтительным при определении альгиновых кислот [Усов, 1999].

*При определении альгинатов в пищевых продуктах рекомендуется вначале проводить ферментативную депротеинизацию, выделять альгинат натрия, а затем осаждают его в виде альгината кальция. Осадок альгината кальция тщательно отмывают от растворимых углеводов, растворяют в холодной 80%-ной серной кислоте или в растворе гексаметафосфата натрия и определяют альгинат спектрофотометрическим методом, в полученных растворах, с использованием нафторезорцина, фенола или сульфата трехвалентного железа в концентрированной серной кислоте, избирательность которых ниже, чем 3-гидроксибифенила, 3,5-дифенола и карбазола. В большинстве описанных выше реакций для разрушения уроновых кислот используют концентрированную серную кислоту, однако сходные результаты при определении уронидов можно получить и с реагентом Биляя (орцин в концентрированной соляной кислоте, обычно с добавлением  $\text{FeCl}_3$ ). В случае исследования альгинатов реакция с орцином обладает определенными преимуществами перед реакцией с карбазолом, хотя аналитические результаты также зависят от состава*

исходного полимера. Очевидно, что такая зависимость является основным недостатком многих методик определения альгиновых кислот, поскольку химические свойства остатка уроновой кислоты существенно меняются от того, входит ли он в состав гомо- или гетерополимерного блока. Это обстоятельство служит главным препятствием для получения универсальных калибровочных графиков, пригодных для определения альгиновых кислот с любым соотношением и распределением вдоль остатков  $\beta$ -D-маннуровой и  $\alpha$ -L-гулуровой кислот.

*Методы исследования мономерного состава альгинатов.* Альгиновая кислота – это линейный гетерополисахарид, молекула которого построена из остатков  $\beta$ -D-маннуровой и  $\alpha$ -L-гулуровой кислот, находящихся в пиранозной форме и связанных в линейные цепи 1→4-гликозидными связями. Соотношение между мономерами меняется в широких пределах в зависимости от источника получения альгината. Распределение мономеров вдоль цепи носит блочный характер, причем имеются блоки трех типов: монотонные последовательности остатков  $\beta$ -D-маннуровой или  $\alpha$ -L-гулуровой кислоты и блоки с более или менее регулярным чередованием остатков обеих кислот. От соотношения уроновых кислот (МГ) в альгиновом полимере зависят физико-химические свойства альгиновой кислоты и ее солей альгинатов.

Для получения мономеров уроновых кислот применяют кислотный гидролиз альгинатов, что является достаточно сложным процессом. Дополнительную трудность создает нерастворимость альгиновых кислот в кислой среде. При проведении полного кислотного гидролиза альгиновых кислот происходит деструкция части мономеров, причем остатки L-гулуровой кислоты (Г) разрушаются быстрее остатков D-маннуровой кислоты (М). Конкретные потери каждого из мономеров зависят от их распределения по блокам в полимерной молекуле. Поэтому довольно сложно подобрать универсальные условия гидролиза и ввести

поправки на деструкцию мономеров, одинаково пригодные для использования этого подхода при определении состава альгинатов, различающихся соотношением и расположением остатков уроновых кислот в их молекулах.

При определении мономерного состава и структуры альгинатов другими физико-химическими методами полисахарид предварительно гидролизуют до мономеров маннуровой и гулуровой кислот, а затем анализируют сами уроновые кислоты или их производные - полиолы [Bouffar-Roupe, Neugraud, 1987], эфиры полиолов (бутилборной кислоты или метиловые) [Vadas et al., 1981; Gacesa, 1988], бруциновые соли [Schmitz et al., 1972] или метиловые эфиры метилгликозидов [Annison et al., 1983].

Наиболее часто для получения мономеров маннуровой и гулуровой кислот используются различные варианты кислотного гидролиза с помощью  $H_2SO_4$  различной концентрации и разного времени ее воздействия [Haug, Larsen, 1962; Stockton et al., 1980]; щавелевой кислоты [Haug, Larsen, 1962]; муравьиной кислоты или трифторуксусной кислоты [Annison et al., 1983].

Применяют также ферментативное расщепление альгинатов до олигоуридов альгинатлиазами, выделенными из бактерий и разнообразных морских беспозвоночных [Davidson et al., 1976; Doubet, 1983; Brivonese, Mackie, 1987]. При ферментативном расщеплении альгинатов образуются олигосахариды с остатком 4,5-ненасыщенной уроновой кислоты на не восстанавливаемом конце. После полной дегградации альгинатов проводят анализ уроновых кислот способом, соответствующим поставленной задаче.

Одним из простых методов определения мономерного состава альгинатов является колориметрический анализ уроновых кислот. Для цветной реакции традиционно используют карбазол [Bitter, Muir, 1962], орцинол [Haug, Larsen, 1962] или фенол [Haug, Larsen, 1962] в присутствии серной кислоты. Для повышения специфичности и чувствительности метода анализ проводят с карбазолом в присутствии и отсутствии бората [Gacesa,

1988]. Однако эти методы длительны по времени и недостаточно специфичны. Поэтому колориметрию чаще используют после предварительного разделения уроновых кислот любым методом, например, анионообменной хроматографией [Haug, Larsen, 1962].

Применяемый иногда метод поляриметрии бруциновых солей уроновых кислот весьма трудоемок и требует тщательного соблюдения температурного режима и точных концентраций. Часто уроновые кислоты после восстановления и метилирования анализируют методом ГЖХ с использованием внутреннего стандарта для количественных определений [Gacesa, 1988]. Но наиболее перспективным в обычной лабораторной практике при рутинном анализе большого количества образцов является ВЭЖХ. В настоящее время высокоэффективная анионообменная хроматография позволяет использовать кислотные гидролизаты альгинатов без дополнительного получения каких-либо производных [Lazarus, Seymour, 1980; Gacesa et al., 1983; Kennedy, Sutherland, 1987].

**Определение мономерного состава альгиновой кислоты методом ГЖХ.** Соотношение уроновых кислот (М/Г) в образцах альгиновой кислоты и ее солей определяют методами газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ методом ГЖХ и ВЭЖХ подвергают полные кислотные гидролизаты альгинатов. Гидролиз проводят следующим образом: 50 мг альгината смешивают с 0,5 мл 80 %-го раствора серной кислоты. Смесь оставляют на 18 час при комнатной температуре, а затем разбавляют кислоту 6,5 мл воды до 2 н. концентрации. Далее смесь нагревают на кипящей водяной бане в запаянных ампулах в течение 5 часов. После охлаждения раствора проводят нейтрализацию добавлением  $\text{CaCO}_3$  (легкий избыток). Нерастворимый осадок дважды промывают водой объемом, равным первоначальному объему гидролизата. Промывные воды присоединяют к фильтрату гидролизата и определяют в нем соотношение М/Г методом ВЭЖХ.

Методом ГЖХ анализируют производные - ацетаты полиолов - мономеров уроновых кислот, полученные после гидролиза альгинатов. Для этого сначала проводят восстановление уроновых кислот до полиолов боргидридом натрия. К полученному гидролизату добавляют избыток  $\text{NaBH}_4$  (около 50 мг), оставляют на 1,5-2,0 часа при комнатной температуре. Непрореагировавшее количество боргидрида нейтрализуют и деионируют катионообменной смолой  $\text{Cu-2H}^+$ . Смесь фильтруют, промывают водой и упаривают. Для удаления борной кислоты осадок обрабатывают кислым метанолом и повторяют обработку гидролизата альгината боргидридом натрия три раза с целью полного восстановления уроновых кислот. Ацетилирование полученных полиолов уроновых кислот проводят смесью уксусный ангидрид:пиридин (1:2) в течение 1 часа при температуре  $100^\circ\text{C}$ . От избытка реагентов избавляются многократной отгонкой с *n*-гептаном и толуолом. От последних растворителей освобождаются отгонкой с хлороформом. Перед хроматографией полученные ацетаты полиолов растворяют в хлороформе. Анализ проводят на газожидкостном хроматографе Hewlett-Packard 5890 А с пламенно-ионизационным детектором; колонка (0,6x150 см) наполнена 3% ECNSS-M на газхроме Q; температура колонки  $180^\circ\text{C}$ , газ-носитель-азот, скорость газ-носителя 50 мл/мин. Расчет процентного содержания М и Г проводят по отношению площадей соответствующих пиков на хроматограмме или с использованием интегратора.

**Получение маннуровой (М) и гулуровой кислот (Г).** 2,5 г альгината натрия смешивают с 10 мл 80% серной кислоты при охлаждении на ледяной бане. Смесь оставляют на ночь при комнатной температуре, разводят водой и льдом до 1 н. серной кислоты, выдерживают на кипящей водяной бане в течение 5 часов и кислоту нейтрализуют 14 г карбоната кальция, фильтруют, фильтрат концентрируют упариванием приблизительно до 20 мл. Катионы удаляют пропусканьем раствора через колонку 50 W x 4 Dowex (20-50 mesh) в кислотной форме. Смесь снова упаривают до 20 мл и уроновые кислоты разделяют на колонке 40 W x 5 Dowex (200-400 mesh) в

ацетатной форме. Уроновые кислоты элюируют уксусной кислотой в градиенте от 0,5 до 2 н. Прохождение уроновых кислот контролируют помещением капли каждой фракции на бумажный фильтр с обработкой его трихлорацетатом анилина. Фракции, содержащие уроновые кислоты, разделяются на две группы. Фракции каждой группы собирают, избыток воды удаляют упариванием под вакуумом при комнатной температуре, остаток воды и уксусной кислоты удаляют замораживанием-высушиванием. Маннуроновою кислоту растворяют в этаноле и кристаллизуют охлаждением. Гулууроновою кислоту хранят в метанольном растворе [Haug, 1964].

### НЕДЕСТРУКТИВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

**ЯМР -  $^{13}\text{C}$  – спектроскопия.** Для характеристики химической структуры альгиновых кислот, агара, каррагинана большое значение приобрели неdestructивные физико-химические методы исследования, в первую очередь спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . С помощью этих методов в молекулах альгиновых кислот определяют не только соотношение мономеров, но и характеризуют их распределение по отдельным блокам. Альгиновая кислота и ее соли с трудом гидролизуются кислотами до мономеров, поэтому для определения структуры используют неdestructивные методы анализа - ПМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопию. По ПМР и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектрам легко можно посчитать соотношение остатков маннуроновою и гулууроновою кислот в полисахариде (соотношение М/Г), но и характер чередования мономерных единиц и природу мономеров, расположенных смежно с остатками маннуроновою кислоты на невозстанавливаемом конце [Grasdalen et al., 1979; 1981].  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопией также можно определить протяженность блоков, состоящих только из остатков маннуроновою и гулууроновою кислот, конформации, свойственные блокам различного состава и пространственную организацию цепей полимеров [Stockton et al., 1980; Gras-

dalen et al., 1981; Grasdalen, 1983]. Эти сведения получают при изучении блоков трех указанных выше типов, которые образуются при частичном гидролизе альгиновой кислоты и ее солей и могут быть выделены благодаря их различной растворимости. Спектры ЯМР -  $^{13}\text{C}$  альгинатов впервые интерпретированы в 1977 г. [Grasdalen et al., 1977]. Было обнаружено, что в области резонанса аномерных атомов углерода спектры альгинатов, полученных с помощью спектрометра на 25 МГц, содержат не два (как можно было бы ожидать для полисахарида, построенного из остатков двух уроновых), а четыре сигнала. Это означало что положение сигналов атомов C(1) обоих моносахаридов (как М так и G) зависит от природы соседнего остатка. По интенсивностям этих сигналов можно было оценить не только величину M/G, но и рассчитать относительное содержание (F) пар звеньев MM, MG, GM и GG. Более того, сигнал атома C(5) остатка М был представлен в спектре тремя линиями, что свидетельствовало о чувствительности положения сигнала к природе обоих соседних остатков. Это явление удалось использовать для количественного определения содержания в полимере триплетов с центральным остатком М. Было установлено, что центральная линия этого сигнала отвечает центральным остаткам М триплетов MMM и GMG, в более слабом поле находится соответствующий сигнал триплета GMM, а в более сильном — сигнал триплета MMG. Таким образом, долю двух последних триплетов в молекуле альгината можно было определить непосредственно по интенсивности соответствующих сигналов, а вероятность нахождения триплетов MMM и GMG в цепи полимера можно было рассчитать из соотношений  $F_{\text{MMM}} + F_{\text{GMM}} = F_{\text{MM}}$  и  $F_{\text{GMG}} + F_{\text{MMG}} = F_{\text{MG}}$ . Расчетные данные для нескольких альгинатов хорошо совпадают с результатами химического анализа. В то же время провести аналогичную оценку содержания триплетов с центральным остатком G авторам этой работе не удалось.

В дальнейшем эти же авторы с помощью более высокоразрешающего спектрометра ЯМР на 50 МГц и тщательного подбора условий съемки

получили сигнал аномерных атомов углерода в виде восьми линий, соответствующих центральным звеньям восьми теоретически возможных триплетов первичной структуры. Интенсивности этих линий позволили рассчитать содержание триплетов каждого типа в нескольких образцах природных альгинатов. Частичное подтверждение справедливости этих расчетов было получено из анализа сигналов углеродных атомов карбоксильных групп и атомов С(4) и С(5) остатка М, также имеющих мультиплетную форму, и из сравнения расчетных данных с результатами химического определения. По содержанию триплетов можно рассчитать среднюю длину гомополимерных блоков:  $N_{G>1} = (F_G - F_{MGM})/F_{GGM}$  и  $F_{M>1} = (F_M - F_{GMG})/F_{MMG}$ .

Для синтетических бинарных сополимеров, образующихся при полимеризации двух разных мономеров, можно математически определить наиболее вероятное расположение звеньев вдоль цепи в зависимости от исходных концентраций и относительной реакционной способности мономеров. В то же время блочный состав альгинатов, как правило, отличается от последовательности, вытекающей из подобных расчетов, что свидетельствует против механизма образования этих полисахаридов в результате сополимеризации двух моносахаридных предшественников и считается важным доводом в пользу альтернативного пути биосинтеза с участием полиманнуронан-С(5)-эпимеразы [Stockton et al., 1980].

Спектроскопия ЯМР-<sup>13</sup>С наиболее удобный метод структурной характеристики альгинатов, выделенных из различных природных источников или модифицированных с помощью ферментативной обработки. Этот прием используют также для контроля за процессом биосинтеза альгината у бактерий. Надежность определения блочного состава в известной степени зависит от величины М/Г исследуемого образца. Более точные результаты получаются для альгинатов с высоким содержанием одного из мономеров; если же величина М/Г близка к единице, то значения длины отдельных блоков, рассчитанные из спектров, могут заметно расходиться

ся с данными, полученными в результате химического или ферментативного гидролиза.

Спектры ЯМР- $^{13}\text{C}$  получают не только для растворов, но и для твердых образцов альгинатов. В последнем случае разрешение пиков существенно хуже, особенно для сигналов аномерных атомов углерода. Тем не менее, сложную спектральную кривую удалось представить как сумму отдельных симметричных сигналов, относящихся к атомам С(2)-С(5) остатков обеих уруновых кислот, позволило с достаточной точностью оценить величину M/G [Llanes et al., 1997]. Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР получают на спектрометре Bruker WM-250 (62,86 МГц), в качестве внутреннего стандарта используют диметилсульфоксид (39,5 м.д.).

## **МЕТОДЫ АНАЛИЗА И ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ**

При наличии достаточного количества образцов красных водорослей агарофитов или каррагинофитов содержание агара или каррагинана можно определять весовым методом. Предварительно в пробах водорослей определяют содержание воды и золы, для расчета содержания агара и каррагинана на абсолютно сухое и беззольное вещество. Перед экстракцией полисахаридов сушеные водоросли промывают и замачивают в холодной пресной воде на 2-3 часа. Время замачивания строго контролируют, поскольку некоторые типы каррагинана растворяются уже при комнатной температуре. При промывании водой из водорослей удаляются растворимые соли, азотистые соединения и пигменты.

Экстракцию полисахаридов из агарофитов обычно проводят при рН 7-8, причем значение рН не является величиной постоянной и изменяется в зависимости от вида водоросли. Экстракцию полисахаридов из каррагинофитов проводят водой. Экстракты для повышения концентрации основного вещества упаривают под вакуумом и обезвоживают добавлением различ-

ных растворителей и досушивают под вакуумом. Экстракты полисахаридов подвергают также лиофильной сушке. Определяют выход полисахарида в процентах к массе сухой водоросли. В полученных образцах полисахаридов определяют содержание воды, золы, общего азота, прочность гелей различной концентрации без сахара и с сахаром, прозрачность растворов, температуру гелеобразования и температуру плавления гелей в зависимости от концентрации полисахарида в растворе. Все показатели устанавливают на соответствие с требованиями ГОСТ 26185-84, ГОСТ 16280-88 Агар пищевой и ГОСТ 17206-96 "Агар микробиологический". Препаративный выход агара и каррагинана можно использовать для оценки их содержания в биомассе водоросли, однако применяют разные методики выделения, в зависимости от изучаемого сырья.

#### *Определение содержания агара*

(1) Метод основан на экстракции агара из водоросли раствором NaOH, очистке агарового экстракта, высушивании и весовом определении его массы [ГОСТ 26185-84].

20 г исследуемого образца измельченных агарсодержащих водорослей помещают в колбу вместимостью 500 мл, приливают 50 мл раствора NaOH с концентрацией 30 г/л и 200 мл горячей дистиллированной воды (температура от 85 до 95°C). Колбу соединяют с обратным холодильником, помещают на кипящую водяную баню и выдерживают 2 ч, периодически помешивая.

Экстракт сливают в предварительно взвешенную коническую колбу вместимостью 500 мл через стеклянную воронку с фильтром из двух слоев марли так, чтобы на фильтр не попали кусочки водоросли. Остатки экстракта из марли отжимают на воронке стеклянной палочкой. Водоросли, попавшие на фильтр, переносят обратно в колбу. Колбу с экстрактом оставляют в теплом месте, чтобы не допустить желирования.

В колбу с водорослями вновь приливают 20 мл раствора NaOH с концентрацией 30 г/л и 200 мл горячей дистиллированной воды и нагревают

еще 2 ч при периодическом перемешивании на кипящей водяной бане. Затем экстракт сливают в колбу через тот же фильтр. Водоросли вновь заливают 150 мл горячей воды и нагревают еще 1 ч. Экстракт сливают, как указано выше.

Остаток водорослей заливают 100 мл горячей воды и нагревают еще 1 ч. Экстракт сливают, содержимое колбы промывают 50 мл горячей воды, промывные воды через фильтр сливают в колбу с экстрактом.

Собранный экстракт взвешивают и берут навеску 10 г в металлическую бюксу. Бюксу с отвешенным экстрактом помещают в ванночку с водой температурой 20°C для желирования на 1 ч. Вода должна находиться выше слоя экстракта в бюксе. Гель промывают в дистиллированной воде температурой 20°C от 4 до 12 ч с периодической трех-, четырехразовой сменой промывной воды.

По окончании промывки студень должен быть прозрачным, допускается легкий сероватый оттенок. Промытый студень помещают в предварительно высушенную и взвешенную бюксу и сушат при температуре 102-105°C до постоянной массы, охлаждают в эксикаторе и взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,01г.

Массовую долю агара в водоросли ( $X_{\text{агара}}$ ) в процентах в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле:

$$X_{\text{агара}} = m \times m_2 \times 10 / (m_1 \times m_3 \times (100 - m_4)),$$

где  $m$  – масса собранного экстракта, г;

$m_1$  – масса исследуемых водорослей, г;

$m_2$  – масса высушенного студня из 10 г экстракта, г;

$m_3$  – масса экстракта, взятая для желирования, г;

$m_4$  – массовая доля воды в водорослях, взятых для анализа, %.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 %.

### *Экстрагирование агара из дальневосточной анфельции*

(2) Метод основан на экстрагировании агара слабым раствором гидроксида кальция, желировании экстракта, промывке геля агара, высушивании и весовом определении его массы. Обычно этот способ применяют для экстрагирования агара из дальневосточной анфельции.

100 г воздушно-сухой анфельции, взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,01 г, промывают в холодной воде, переносят без потерь в термостойкий стакан, заливают 1%-ным раствором окиси кальция температурой 95-97<sup>0</sup>С при соотношении 1:15 и оставляют на 1 ч. Затем раствор сливают и после добавления к анфельции окиси кальция и воды в количествах, соответствующих каждой экстракции, стаканы помещают в автоклав, где проводят трехкратную экстракцию агара при температуре 120<sup>0</sup>С с периодическим сливом экстрактов.

При первой экстракции добавляют СаО в расчете 5% к массе, взятой на экстракцию, анфельции, при соотношении анфельции к воде 1:10. На вторую экстракцию – 2% СаО и воды 1:6 и на третью – 1% СаО и воды 1:4. Продолжительность экстракций составляет соответственно 10, 8, 6 ч. По окончании каждой экстракции - экстракты отстаивают в течение 10-15 мин, затем сливают через ватно-марлевый фильтры в стаканы, охлаждают. Экстракт желируется при комнатной температуре. Гель агара выдерживают для созревания в течение 8 часов.

Полученный гель разрезают на пластинки толщиной 5-6 мм, заливают холодной водой в стеклянных стаканах и промывают до полного обесцвечивания. Соотношение геля и воды выдерживают 1:3. Содержимое стаканов периодически перемешивают стеклянной палочкой. Воду по мере окрашивания сливают через марлевый фильтр. Обесцвеченный гель раскладывают на сито, и сушат при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре 60-65<sup>0</sup>С. высушенную пленку осторожно, без потерь снимают с сетки и сушат в сушильном шкафу до постоянной массы при 102-105<sup>0</sup>С. В полученном агаре определяют массу золы.

**Определение содержания агара в грацилярии.** Метод основан на предобработке водоросли 5% -ным раствором NaOH (удаление минеральных элементов, белка, окрашивающих веществ, размягчение клеточной стенки, улучшение процесса экстрагирования).

20 г исследуемого образца сушеной, измельченной, агарсодержащей водоросли грацилярии помещают в термоустойчивый стакан или эмалированную емкость вместимостью не менее 500 мл, промывают дважды пресной водой, воду сливают, приливают 400 мл раствора 5%-ного раствора NaOH, нагревают до температуры 60°C, выдерживают в закрытой емкости при периодическом перемешивании в течение 8 час. Щелочной раствор сливают в емкость, разбавляют водой, нейтрализуют, сливают в канализацию. Водоросли промывают 4-5 раз холодной водопроводной водой. Затем заливают охлажденным 0,7%-ным раствором серной кислоты (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ГМ=1:15 (соотношение сухие водоросли : раствор серной кислоты). Раствор серной кислоты готовят заранее и охлаждают в холодильнике до 5<sup>0</sup>С. Температура смеси водоросли-серная кислота должна быть не выше 15<sup>0</sup>С. Выдерживают при перемешивании 5-7 мин. Кислоту сливают, промывают водой до pH 4-5. Промытые водоросли заливают 30 мл 3%-ным раствором Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, доводят pH до 7. Избыток жидкости (карбоната натрия) слить.

*Первая экстракция.* Подготовленные водоросли заливают дистиллированной водой в соотношении 1:20 (сухие водоросли:вода), проводят экстракцию при слабом кипении 3 часа, при перемешивании. Емкость закрывают крышкой. Экстракт сливают через капроновое сито, затем фильтруют горячим через фильтр (слой ваты между двумя слоями капрона) и центрифугируют. Отфильтрованный экстракт сливают в стакан, охлаждают до желирования.

*Вторая экстракция.* Остаток водорослей заливают дистиллированной водой в соотношении 1:15. экстрагируют агар в течение 2,5 часов при слабом кипении. Экстракт фильтруют, сливают в один стакан с первым экстрактом, охлаждают, желируют.

*Третья экстракция.* Остаток водорослей заливают дистиллированной водой, ГМ 1:10. Экстрагируют 2 часа при слабом кипении. Экстракт фильтруют, сливают в стакан к первым двум экстрактам, охлаждают, желируют.

Гели объединенных экстрактов выкладывают на доску (лучше стеклянную или пластмассовую), режут гель тонкими полосками (0,5X5 см), помещают на эмалированный поднос или плоское сито, замораживают при температуре минус 18<sup>0</sup>С в течение 24 час. Затем замороженный гель размораживают на воздухе, вода при этом должна стекать и не задерживаться в емкости с гелем. Коагель агара отжимают от избытка влаги, помещают в термоустойчивый химический стакан или в другую какую-либо емкость, заливают дистиллированной водой (1000 мл), нагревают при перемешивании до полного растворения. Раствор агара охлаждают до температуры 20<sup>0</sup>С, выдерживают в течение 6-8 часов для желирования и созревания геля. Гель агара режут тонкими полосками (0,5X5 см), помещают в стеклянную емкость 2 л, заливают дистиллированной водой, выдерживают гель при помешивании 2-3 часа, воду сливают через капроновое сито, залить еще дистиллированной воды и так 2-3 раз по 2-3 часа до полного обесцвечивания геля агара.

Промытые в воде кусочки геля агара раскладывают на сито, помещают на поддон, замораживают при температуре не выше минус 18<sup>0</sup>С в течение 24 час. Затем гель размораживают, талую воду удаляют. Обезвоженный коагель промывают дистиллированной водой, затем промывают 96%-ным этиловым спиртом, избыток жидкости прессуют и досушивают методом тепловой, вакуумной или лиофильной сушки.

Содержание (выход) агара определяют отношением суммированной массы сухого агара, полученного от всех экстракций анфельции или другой агарсодержащей водоросли, пересчитанной на агар с массовой долей воды 18% и золы 6% к водоросли с нормированной массой воды и механических примесей.

Содержание агара рассчитывают по формуле:

$$X_{\text{(агара)}} = m(100 - m_1) \times 0,921/100 - (m_2 + m_3),$$

где:  $m$ -масса агара, полученная от всех экстракций, г;

$m_1$ - массовая доля воды в анфельции, %;

$m_2$  – массовая доля золы в агаре, %;

$m_3$ - массовая доля посторонних примесей в анфельции, %.

0,921 – расчетный коэффициент, учитывающий нормируемую массу воды и примесей в анфельции и нормируемые массы воды и золы в агаре 1-го сорта.

Этот метод можно использовать для фракционирования агара при этом каждый экстракт (1-й, 2-ой и 3-ий) обрабатывают отдельно. В результате получают три фракции агара, отличающиеся физико-химическими свойствами и назначением. Все фракции агара взвешивают и рассчитывают долю агара в водоросли или выход каждой фракции отдельно, а также выход суммарного агара

Анализируют в агаре содержание воды, золы, белка, определяют прочность геля 0,85 или 1%-ного раствора агара, температуру желирования, температуру плавления, прозрачность и цветность геля.

**Определение содержания агара в биомассе красных водорослей методом ГЖХ.** Определение содержания агара методом ГЖХ проводят после полного восстановительного гидролиза биомассы водоросли. Реакцию проводят в 2 М растворе трифторуксусной кислоты в присутствии 4-метилморфолинборана. Восстановление 3,6-ангидрогалактозы до 3,6-ангидродульцита происходит в момент гидролиза, что позволяет избежать кислотной деградации. Остальные моносахариды после гидролиза переводят в альдонитрилы обработкой раствором хлоргидрата гидросиламина в пиридине. Полученные продукты ацетируют уксусным ангидридом и анализируют ГЖХ. Таким образом, 3,6-ангидрогалактозу и 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозу определяют в виде ацетата полиола, а галактозу и её О-метилловые эфиры в виде ацетатов альдонитрилов. Основываясь на дан-

ных ГЖХ, рассчитывают содержание моносахаридов, по сумме которых определяют количество агара [Усов, Элашвилли, 1991].

*Проведение анализа.* К точной навеске сухой, измельченной водоросли или водорослевого остатка (15-20 мг) добавляют 40-50 мг 4-метилморфолинборана (Aldrich, США) и 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей инозит (0,9 мг/мл). Смесь нагревают в закрытой колбе 8 ч при температуре 100°C. После охлаждения к смеси трижды прибавляют и отгоняют на роторном испарителе по 8 мл этанола. К сухому гидролизату добавляют 1 мл 6%-ного раствора хлоргидрата гидроксилamina в пиридине и нагревают 1 ч при 100°C. Затем добавляют 1 мл уксусного ангидрида и нагревают еще 1 ч при 100°C. После охлаждения к смеси трижды прибавляют и отгоняют на роторном испарителе по 10 мл толуола. Оставшуюся маслянистую жидкость растворяют в 3 мл хлороформа и добавляют 1 г силикагеля. Все тщательно перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Силикагель на фильтре промывают два раза хлороформом порциями по 3 мл. Хлороформ отгоняют на роторном испарителе, остаток растворяют в 1 мл хлороформа и анализируют методом ГЖХ. В качестве внутреннего стандарта используют инозит.

Содержание 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы (2-О-Me-3,6-AG), 3,6-ангидро-галактозы (3,6-AG), галактозы (Gal) и глюкозы (Glu) в водоросли рассчитывают по формуле:

$$X = 0,5 \times S_1 \times MM / (M \times S \times a)$$

где:  $X$  – содержание моносахарида, %;

$m$  – масса навески водоросли или водорослевого остатка, мг;

$MM$  – молекулярная масса моносахаридного остатка (табл. 1);

$a$  – коэффициент молярного отклика моносахарида (см. табл. 1);

$S_1$  – площадь пика моносахарида;

$S$  – площадь пика инозита;

$0,5$  – коэффициент пересчета.

Таблица 1

<i>Моносахарид</i>	ММ	а
2-О-Ме-3,6-АГ	158	0,58
3,6-АГ	144	0,58
Gal	162	0,50
Glu	162	0,50
Ins	180	1,00

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов трех параллельных определений.

Содержание агара в водоросли и водорослевом остатке ( $X_{\text{агара}}$ ) рассчитывают по формуле:

$$X_{\text{агара}} = X_{2\text{-О-Ме-3,6-АГ}} + X_{3,6\text{-АГ}} + X_{\text{Gal}}$$

где:  $X_{2\text{-О-Ме-3,6-АГ}}$  – содержание 2-О-метил-3,6-ангидрогалактозы;

$X_{3,6\text{-АГ}}$  – содержание 3,6-ангидрогалактозы;

$X_{\text{Gal}}$  – содержание галактозы.

**Определение содержания каррагинана в красных водорослях-каррагинофитах.** Метод основан на водной экстракции каррагинана, очистке каррагинанового экстракта, осаждении каррагинана, высушивании и весовом определении его массы.

Навеску 4,0 – 5,0 г воздушно-сухого измельченного хондруса или другой каррагинансодержащей водоросли, взвешенной с абсолютной погрешностью не более 0,01 г, помещают в термоустойчивый стакан объемом 300 мл, заливают водой в соотношении водоросли:вода 1:20 и выдерживают при температуре 20-40<sup>0</sup>С в течение 1-2 ч при периодическом перемешивании. Затем воду сливают, водоросли промывают водой для удаления загрязнений. Промытые водоросли заливают дистиллированной водой в соотношении сухие водоросли:вода 1:40, проводят экстракцию каррагинана при температуре 90-95<sup>0</sup>С в течение 2,5-3,0 ч при периодическом перемешивании. В процессе экстракции образуется вязкий раствор каррагинана в смеси с водорослями. По окончании экстракции горячий экстракт

сливают в мерную колбу объемом 250 мл через воронку с капроновым ситом. Водорослевый остаток помещают в стакан, добавляют 20 мл дистиллированной воды, нагревают до температуры 80<sup>0</sup>С, выдерживают в течение 30 мин, экстракт сливают через сито в мерную колбу, экстракцию проводят еще раз, экстракт также сливают в мерную колбу, охлаждают, доводят объем жидкости до метки, тщательно перемешивают. Затем нагревают до температуры 60<sup>0</sup>С, центрифугируют или фильтруют другим доступным способом. Очищенный экстракт или его аликвоту помещают в чистую, сухую, взвешенную фарфоровую чашку. Чашку с экстрактом взвешивают, помещают на водяную баню и упаривают. Образовавшуюся пленку вместе с чашкой помещают в сушильный шкаф и досушивают при температуре 60±5<sup>0</sup>С до постоянного веса.

Рассчитывают содержание каррагинана в водорослях в процентах от массы воздушно-сухих водорослей, взятых для экстракции.

Массовую долю каррагинана в водорослях ( $X_{кар}$ ) в процентах в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле:

$$X_{кар} = (m_1 \times 100 \times V_1) / (m \times V_2 \times (100-w)),$$

где:  $m$  – масса водорослей, взятых на экстракцию, г;

$m_1$  – масса высушенного каррагинана, г;

$V_1$  – общий объем экстракта, полученного при экстрагировании водорослей;

$V_2$  – объем экстракта, использованного на осаждение каррагинана;

$w$  – массовая доля воды в водорослях, взятых для экстракции, %.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5%. Вычисление проводят до первого десятичного знака.

*Получение природного каррагинана из красных водорослей-каррагинофитов.* Метод основан на водной экстракции каррагинана, очистке каррагинанового экстракта, осаждении каррагинана спиртом, высушивании и измельчении.

Навеску 100 г воздушно-сухих каррагинансодержащих водорослей, взвешенной с абсолютной погрешностью не более 0,01 г, замачивают в воде при температуре 20-40<sup>0</sup>С в течение 1-2 ч. с гидромодулем (соотношение водоросль:вода) 1:20 при перемешивании. По окончании замачивания воду сливают, водоросли промывают в проточной воде для удаления песка и ила. Промытые водоросли заливают горячей водой при соотношении водоросли и воды 1:60 и проводят экстракцию каррагинана. Смесь подогревают до температуры 95-98<sup>0</sup>С и выдерживают при данной температуре в течение 2,5-3,0 ч при периодическом перемешивании 2-3 раза по 5 мин. В процессе экстракции образуется вязкий раствор каррагинана в смеси с водорослями. По окончании экстракции горячий экстракт фильтруют сначала через капроновое сито для отделения крупнодисперсных примесей. Водорослевый остаток заливают горячей водой, тщательно перемешивают, проводят повторную экстракцию при температуре 80-90<sup>0</sup>С в течение 30 мин, затем фильтруют через капроновое сито. Экстракты объединяют, фильтруют или центрифугируют при температуре 60-70<sup>0</sup>С. Очищенный экстракт сливают в стеклянный стакан или емкость из нержавеющей стали или эмалированную посуду. Экстракт при необходимости упаривают на водяной бане вдвое. К упаренному охлажденному экстракту приливают 96%-ный этиловый спирт при соотношении 1:3 (экстракт:спирт) и периодическом перемешивании. Выпадает осадок каррагинана. Осадок каррагинана отделяют центрифугированием и высушивают над силикагелем в вакуум-эксикаторе. Высушивают также методами лиофильной или тепловой сушки. Высушенный каррагинан взвешивают и рассчитывают его выход в процентах от массы воздушно-сухой водоросли, взятой для экстракции.

Выход природного каррагинана из водоросли ( $X_{\text{кар}}$ ) в процентах в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле:

$$X_{\text{кар}} = (m_1 \times 100 \times V_1) / (m \times V_2 \times (100-w))$$

где:  $m$  – масса водорослей, взятых на экстракцию, г;

$m_1$  – масса высушенного природного каррагинана, г;

$V_1$  – общий объем экстракта, полученного при экстрагировании водорослей;

$V_2$  – объем экстракта, использованного на осаждение природного каррагинана;

$w$  – массовая доля воды в водорослях, взятых для экстракции, %.

Каррагинан используют для последующего анализа и изготовления на его основе различных продуктов. В зависимости от необходимого объема получения каррагинана исходную навеску увеличивают, пропорционально изменяя соотношения реагентов.

### **Фракционирование полисахаридов красных водорослей**

Одной из самых важных и трудных стадий в исследовании полисахаридов является их очистка и фракционирование с целью получения однородных индивидуальных веществ. Известно, что растворимость полисахаридов уменьшается в присутствии неорганических солей, взятых с избытком. На этом свойстве основано, например, широко распространенное в химии белка фракционирование осаждением сульфатом аммония. Этот реагент может служить осадителем и для полисахаридов. Фракционирование полисахаридов растворами солей используют для отделения полисахаридов друг от друга. Неорганические соли вызывают разрыв межмолекулярных водородных связей и осаждение полисахаридов из экстрактов. Для выделения из экстракта и одновременного освобождения от нейтральных полисахаридов удобно использовать осаждение сульфатированных полисахаридов в виде солей с катионными детергентами типа бромистого цетилтриметиламмония (цетавлона) [Кочетков и др., 1967; Усов, 1979].

Для гелеобразующих полисахаридов группы агара применяют для удаления примесей минерального и органического происхождения многократное замораживание-оттаивание геля или его многократную промывку водой [Бемиллер, 1967]. При разделении смесей каррагинанов используют способность каппа-каррагинанов к образованию гелей в присутствии ионов калия [Пейнтер, 1967]. Каппа-каррагинан экстрагируется из водорослей в смеси с другими фракциями каррагинана. Эти полисахариды разделяют классическими способами фракционирования или осаждения хлоридом калия, а также солями аммония, рубидия, цезия [Smith, 1953; Кочетков и др., 1967]. При осаждении этими солями фракция каппа-каррагинана выпадает в осадок, а каррагинан другого типа остаётся в растворе.

Фракционирование полисахаридов типа каррагинана растворами солей используется довольно часто. Соли вызывают разрыв межмолекулярных водородных связей и меньшее соосаждение, чем органические растворители. Выбор осадителя обусловлен тем, что гелеобразование каррагинана зависит от природы и концентрации одновалентного катиона, связанного с каррагинановой кислотой [Rees, 1969].

***Фракционирование каррагинана хлоридом калия.*** К аликвоте очищенного от мелкодисперсных примесей экстракта, содержащего каппа-каррагинан, полученного экстрагированием водоросли, содержащей гибридные формы полисахарида, для осаждения каппа-фракции вносят 0,4-0,5 г KCl к единице сухого вещества в экстракте при температуре 70<sup>0</sup>C и перемешивании. Температура и концентрация осадителя являются важными факторами в процессе осаждения, влияющими на структуру геля каррагинана. Проведение процесса осаждения в охлажденных растворах вызывает слабое структурирование системы полисахарид-калий с отделением раствора от геля. Проведение процесса осаждения при температуре 70<sup>0</sup>C способствует взаимодействию молекулы полисахарида с катионом калия и созданию прочной структурированной системы полисахарид-калий. Образуется прочный гель каппа-каррагинана, удобный для последующей обра-

ботки. Гель каппа-каррагинана режут на кусочки, замораживают при температуре минус 18<sup>0</sup>С, выдерживают в течение 24 час, размораживают. Коагель каррагинана заливают 96%-ным этиловым спиртом в соотношении 1:2, выдерживают в течение 1 час, спирт сливают через капроновый фильтр, отжимают. Обезвоженный каррагинан высушивают над силикагелем в вакуум-эксикаторе или методом тепловой или лиофильной сушки.

Выход каппа-каррагинана из водоросли ( $X_{кар}$ ) в процентах в пересчете на сухое вещество, вычисляют по формуле:

$$X_{кар} = (m_1 \times 100 \times V_1) / (m \times V_2 \times (100-w))$$

где:  $m$  – масса водорослей, взятых на экстракцию, г;

$m_1$  – масса высушенного каррагинана, г;

$V_1$  – общий объем экстракта, полученного при экстрагировании водорослей;

$V_2$  – объем экстракта, взятого на осаждение каппа-каррагинана;

$w$  – массовая доля воды в водорослях, взятых для экстракции, %.

**Фракционирование агара диметилсульфоксидом (ДМСО).** Согласно современным представлениям агар - это сложная смесь линейных галактанов, построенных по типу агарозы и содержащих дополнительные неуглеводные заместители - метоксильные, сульфатные и 1-карбокситилиденовые группы. В составе агара содержатся структуры трех типов с чередующимися  $\alpha$  (1->3) и  $\beta$  (1->4) связями: 1. нейтральная агароза, состоящая из  $\beta$ (1->3) связанных остатков D-галактозы и  $\alpha$  (1->4) связанных остатков 3,6-ангидрогалактозы; 2. «пируватированная агароза», в которой остатки D-галактозы замещены пировиноградной кислотой с образованием ацетальной группировки; 3. сульфатированный галактан, содержащий несколько остатков 3,6-ангидро-L-галактозы или пируватзамещенной D-галактозы (Общая органическая химия, 1986). Упрощенно агар можно рассматривать как смесь нейтральной агарозы и заряженного агаропектина.

Гелеобразующие свойства агара зависят от соотношения в нем агарозы и агаропектина, а также от химического состава обоих компонентов. Соотношение содержания агарозы и агаропектина различно у разных видов водорослей: так, например, у *Gelidium*, выращиваемого в Корее, оно равно 1.3-1,66, а у *Gracilaria* выращиваемой в Чили – 19,9-21,0. У разных видов водорослей одного рода это соотношение также различно, причем величина его зависит от многих факторов: от сезона года, условий среды обитания, возраста растения, фазы его развития. Физико-химические свойства агара, содержание агарозы и агаропектина в нем зависят от используемого сырья и способов их получения.

В 1968 году японский ученый Тагава успешно применил метод для разделения агара на агарозу и агаропектин диметилсульфоксид (ДМСО), основанный на различной растворимости компонентов агара. Данный метод позволяет определить содержание агарозы и агаропектина в агаре [Tagawa, 1968].

Навеску агара (2 г) растирают с 50-кратным количеством ДМСО, выдерживают при 80 °С в течение 1 ч, раствор центрифугируют на лабораторной центрифуге со скоростью вращения ротора 16 500 об./мин. Надосадочную жидкость отделяют от осадка, который 2-3 раза промывают ДМСО. Из общего объема надосадочной жидкости добавлением ацетона осаждают агарозу, затем отделяют от раствора, отжимают от ацетона и высушивают на воздухе при комнатной температуре. Высушенную фракцию агарозы измельчают до порошкообразного состояния, взвешивают и определяют ее выход. Нерастворимые вещества промывают ДМСО, затем ацетоном, высушивают, взвешивают и определяют выход фракции агаропектина.

#### ***Определение 3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах красных водорослей***

3,6-ангидрогалактоза – это уникальный природный моносахарид. В виде остатков 4-0-замещенной 3,6-ангидро-альфа-галактопиранозы, часто

с метильной или сульфатной группой, входит в состав многочисленных галактанов красных водорослей. При этом в полисахаридах группы каррагинана остатки 3,6-ангидрогалактозы принадлежат к D-ряду, а в полисахаридах группы агара – к L-ряду. Количественный анализ и полная идентификация этого моносахарида, включающая в себя определение абсолютной конфигурации, являются важными этапами установления строения сульфатированных галактанов красных водорослей [Усов, Элашвилли, 1991].

3,6-ангидрогалактоза чувствительна к кислотам и полностью разрушается в обычных условиях гидролиза гликозидных связей. На повышенной лабильности к кислотным воздействиям основан наиболее распространенный метод количественного спектрофотометрического определения 3,6-ангидрогалактозы в присутствии других моносахаридов - реакция с резорцином-HCl. Однако методика применима только для анализа растворов полисахаридов и не дает возможности исследовать нерастворимые объекты, а также раздельно определять 3,6-ангидрогалактозу и ее 2-О-метилэфир. Для определения прочих моносахаридов, входящих в состав полисахарида, необходимо параллельно использовать другие методики, на которые влияет присутствие производных 3,6-ангидрогалактозы, а при спектрофотометрических определениях вводить соответствующие поправки.

Чтобы определить абсолютную конфигурацию остатков 3,6-ангидрогалактозы в последние годы используют спектроскопию  $^{13}\text{C}$ -ЯМР олиго- и полисахаридов. Для этого проводят кислотный метанолиз, с помощью которого неоднократно удавалось определить абсолютную конфигурацию 3,6-ангидрогалактозы и 2-О-метил-3,6-ангидро-галактозы в полисахаридах.

Для частичного расщепления полисахаридных молекул до соответствующих олигосахаридов с остатком 3,6-ангидрогалактозы на восстанавливаемом конце используют мягкий гидролиз водными кислотами, иногда с последующим восстановлением, метанолиз,

меркаптолиз или окислительный гидролиз, но все эти методики экспериментально трудны и дают много побочных продуктов. Восстановительный гидролиз используется для количественного определения производных 3,6-ангидрогалактозы в галактанах красных водорослей, анализа их моносахаридного состава, а также частичного расщепления полисахаридов с последующей хроматографической идентификацией, образующегося дисахарида, для отнесения изучаемого полисахарида к группе агара или каррагинана, для чего достаточно микро-количеств исходного вещества. Более того, идентификацию полисахарида можно проводить без выделения полисахарида, путем частичного восстановительного гидролиза биомассы водоросли.

*Определение 3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах реакцией с резорцином* [Matsuhira, Zanlungo, 1983]. Полисахариды водорослей – это природные биополимеры, молекулы которых уникальны по своему моносахаридному составу. Своеобразие моносахаридного состава и обилие неуглеводных заместителей приводит к тому, что для анализа полисахаридов водорослей применяется целый комплекс специальных приемов, которые включают химические, ферментативные, иммунологические, спектрофотометрические и микробиологические методы исследования.

Галактоза и 3,6-ангидрогалактоза являются главными компонентами агара, каппа-каррагинана и фуцелларана. D-ксилоза (0,2-1,8%) и 6-О-метил-D-галактоза (0,8-21%) присутствуют в меньших пропорциях в агаре.

3,6-ангидрогалактоза не существует в кристаллической форме. Ее стандартный раствор получают гидролизом метил-3,6-ангидро-L-D-галактопиранозиды. Оптимальный период для развития окраски 3,6-ангидрогалактозы при температуре 80°C - 10 мин. Главное достоинство метода Yurbe низкое содержание выше отмеченных моносахаридов, но это вызывает необходимость использовать более долгий период нагрева, чтобы обеспечить полный гидролиз полисахарида.

*Проведение испытания.* В мерную колбу на 25 мл вносят растворы сахаров (10-200 мкг) в дистиллированной воде (2,0 мл), добавляют 0,5 мл 5%-ного раствора тимола в этаноле, затем 5,0 мл 0,5 %-ного раствора хлорида железа в концентрированной соляной кислоте. Смесь нагревают на водяной бане в течение 13 мин. при температуре 80 °С, и затем быстро охлаждают при комнатной температуре. Пробу разбавляют этанолом (10 мл) и измеряют коэффициент поглощения на Bausch и Lomb Spectronic 20. Стандартные кривые для определения содержания 3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах (300 мкг) были получены с растворами метил-3,6-ангидроальфа-D-галактопиранозида (12-20 мкг) [Lewis et al., 1963].

Поправочный фактор 0,92 вводят для расчета концентрации 3,6-ангидрогалактозы. Все измерения проводятся трижды. Стандартные кривые приводят к достоверной линии, при использовании метода линейной регрессии по наименьшей площади.

*Определение 3,6-ангидрогалактозы с резорцин-1,1-дизтокситаном.* Метод предполагает использование улучшенного реагента резорцин-1,1-дизтокситана как более чувствительного для количественного определения фруктозы и 3,6-ангидрогалактозы в агаре, каррагинане и других полисахаридах. Отношение поглощения различных сахаров, к поглощению фруктозы показывает, что в смесях, эквимольные количества этих сахаров незначительно препятствуют определению либо фруктозы или 3,6-ангидрогалактозы. Поглощение, например 0,18 микромолей 3,6-ангидрогалактозы, составляет 92 % эквимольного количества фруктозы. Таким образом, с использованием корректирующего фактора фруктоза может быть использована как сахар, по отношению к которому определяется концентрация 3,6-ангидрогалактозы в агаре, каррагинане и других полисахаридах [Yarpe, Arsenault, 1965].

#### *Приготовление реагентов*

1. *Получение ацетала.* В 4-литровую склянку наливают 1050 г (1305 мл; 21,7 мол) 95 %-ного этилового спирта и прибавляют 200 г (1,8 мол)

гранулированного безводного  $\text{CaCl}_2$ . Бутылку со смесью помещают в ледяную воду, охлаждают смесь до  $8^\circ\text{C}$  или ниже, после чего по стенке сосуда медленно приливают 500 г свежеперегнанного ацетальдегида ( $t_{\text{кип.}} = 20-22^\circ\text{C}$ ) так, что последний образует слой над спиртовым раствором  $\text{CaCl}_2$ . Слянку плотно закрывают корковой пробкой и несколько минут энергично взбалтывают (осторожно! разогрев!), после чего смесь оставляют стоять на 1-2 дня при комнатной температуре, повторяя время от времени взбалтывание. Через 1-2 ч реакционная жидкость расслаивается на 2 слоя, и по истечении первых суток объемы обоих слоев не изменяются.

Верхний слой, вес которого равен 1280-1285 г, отделяют, помещают в делительную воронку и промывают водой в три приема, одинаковыми порциями по 330 мл, после чего вес его уменьшается до 990-995 г. Промытую маслянистую жидкость обезвоживают добавлением 25 г безводного поташа ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) и подвергают фракционной перегонке с хорошо работающей колонкой, высота которой должна быть не менее 90 см, фракцию, кипящую при  $101-103^\circ\text{C}$ , собирают как чистый ацеталь. Таким образом, после одной или двух фракционных разгонок получают 7600-720 г продукта. Выход может быть увеличен, если ниже кипящую фракцию и остаток промыть небольшим количеством воды, маслянистый слой высушить и перегнать с той же колонкой. Общий выход достигает 790-815 г, т.е. 61-64 %.

2. Раствор 1,1-диэтоксацетала готовят следующим образом: навеску ацетала (0,84 г) разбавляют водой в мерной колбе на 100 мл, отбирают 9,8 мл этого раствора и разбавляют водой до 250 мл, полученный раствор содержит 2,78 мкмоль вещества в 1 мл раствора. Раствор устойчив в течение месяца.

3. Раствор резорцина: 150 мг резорцина растворяют в мерной колбе на 100 мл. Этот реагент готовят каждую неделю и хранят в темной посуде.

4. Резорциновый реагент: к 9 мл раствора резорцина прибавляют 100 мл концентрированной соляной кислоты и 1 мл 1,1-диэтоксиэтана. Полученный реагент устойчив около 36 часов.

Построение калибровочного графика. Калибровочный график строят по поглощению стандартного раствора фруктозы с концентрацией 50 мкг/мл. Навеску (2,5 мг) фруктозы растворяют в мерной колбе на 25 мл. Для построения калибровочного графика методом разбавления готовят серию растворов следующих концентраций:

1. 10 мкг фруктозы в 1,0 мл – 0,2 мл исходного раствора фруктозы доводят водой до 1,0 мл;
2. 20 мкг фруктозы в 1,0 мл – 0,4 мл исходного раствора фруктозы доводят водой до 1,0 мл;
3. 30 мкг фруктозы в 1,0 мл – 0,6 мл исходного раствора фруктозы доводят водой до 1,0 мл;
4. 40 мкг фруктозы в 1,0 мл – 0,8 мл исходного раствора фруктозы доводят водой до 1,0 мл;
5. 50 мкг фруктозы в 1,0 мл – 1,0 мл исходного раствора фруктозы;

*Проведение испытания.* Анализ проводят в пробирках со шлифованными стеклянными пробками. К 1 мл раствора фруктозы, содержащего 10, 20, 30, 40, 50 мкг вещества, при охлаждении льдом прибавляют 5 мл резорцинового реагента, перемешивают и выдерживают при 0°C 3 мин., после чего пробирки помещают в водяную баню при 20°C на 40 мин, нагревают 10 мин при 80°C, охлаждают 1,5 мин в ледяной бане, оставляют на 15 мин при 20°C и измеряют адсорбцию на ФЭК при длине волны 550 нм. По полученным точкам поглощения строят калибровочную кривую.

*Количественное определение 3,6-ангидрогалактозы в полисахаридах.* Навеску (5-6 мг) полисахарида растворяют в мерной колбе на 50 мл. 0,5 мл раствора полисахарида охлаждают 20 мин на ледяной бане, прибавляют 2,5 мл реагента (50 мл концентрированной HCl + 4,5 мл резорцина + 0,5 мл ацеталя), охлаждают 20 мин, затем при комнатной температуре 5 мин и нагревают 10 мин при 80°C, затем охлаждают 2 мин на ледяной бане и измеряют поглощение при длине волны 555 нм в течение 15 мин. Оптическая плотность растворов 3,6-ангидрогалактозы составляет 0,92 оп-

тической плотности растворов той же концентрации фруктозы. Активность 3,6-ангидрогалактозы равна 92% фруктозы: 10 мкг фруктозы - 9,2 мкг 3,6-ангидрогалактозы.

Измерения повторяют три раза и по полученным результатам определяют среднее арифметическое значение оптической плотности.

Количество 3,6-ангидрогалактозы, соответствующее определенной оптической плотности, рассчитывают по калибровочному графику.

Расчет содержания 3,6AG проводят по формуле:

$$\%(3,6AG) = (C \times 100 \times 100) / m \times (100 - w),$$

где: C-концентрация 3,6-ангидрогалактозы по калибровочному графику, мкг;

m - навеска полисахарида, взятая для анализа, мг.

w – содержание воды в навеске.

#### *Определение производных 3,6-ангидрогалактозы методом ГЖХ.*

Метод количественного определения 3,6-ангидрогалактозы с помощью восстановительного гидролиза и ГЖХ обладает рядом преимуществ перед имеющимися спектрофотометрическими методами. Он позволяет отдельно определять остатки 3,6-ангидрогалактозы и ее 2-О-метилового эфира, одновременно проводить анализ прочих сахаров, присутствующих в гидролизате, а также анализировать не только водорастворимые полисахариды, но и непосредственно исходное сырье, препараты клеточных стенок, труднорастворимые соли.

Частичный восстановительный гидролиз представляет интерес как метод получения олигосахаридных фрагментов из молекул галактанов. Эти фрагменты несут на восстанавливаемом конце остатки 3,6-ангидродульцита, поэтому устойчивы и удобны для хроматографического разделения. Сохранение сульфатных групп в условиях частичного гидролиза делает эти олигосахариды ценными веществами, несущими информацию о строении и степени регулярности исходных полимеров. Методика количественного определения и установления абсолютной конфигурации остатка

3,6-ангидрогалактозы имеет большое значение для скрининга, поскольку позволяет установить тип и количество содержащегося полисахарида в водоросли, используя небольшие навески биомассы (1-10 мг).

**Полный восстановительный гидролиз.** К точной навеске полисахарида 2-5 мг или биомассы водоросли 10-15 мг прибавляют 4-метилморфолинборан (35-40 г) и 1 мл 2М  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , содержащей инозит (0,9 мг в 1 мл). Смесь нагревают в закрытой колбе 8 ч при  $100^\circ\text{C}$ , затем охлаждают, кислоту отгоняют в вакууме, трижды прибавляя и упаривая по 10 мл этанола, к остатку приливают 1мл 6% раствора хлоргидрата гидроксиламина в пиридине, нагревают 30 мин при  $100^\circ\text{C}$ , охлаждают, прибавляют 1 мл  $\text{As}_2\text{O}$  (уксусный ангидрид) и нагревают 1 ч при  $100^\circ\text{C}$ . К смеси трижды прибавляют и упаривают в вакууме по 10 мл толуола, остаток распределяют между 5 мл хлороформа и 5 мл воды, хлороформный слой отделяют, концентрируют и используют для ГЖХ.

**Частичный восстановительный гидролиз агара.** 200 мг агара растворяют в 15 мл дистиллированной воды при нагревании до  $100^\circ\text{C}$ , раствор охлаждают до  $50-60^\circ\text{C}$ , прибавляют 1,35 г 4-метилморфолинборана и 5 мл 2М  $\text{CF}_3\text{COOH}$  и помещают в термостат при  $55^\circ\text{C}$  на 20 ч или  $65^\circ\text{C}$  на 1 или 8 ч. Далее кислоту отгоняют с водой и раствор остатка в воде хроматографируют на колонке с TSK HW-40S, собирают фракцию 135-180 мл, содержащую высокомолекулярные продукты гидролиза, а также фракции 181-192, 193-208, 209-230, 231-255 и 256-280 мл, содержащие олигосахариды. Олигосахариды дополнительно очищают методом ионообменной хроматографии, которую проводят на колонке (0,4x25 см) с ДЭА-силасорбом, 7 мкм («Диагностикум», СССР), элюент  $-0,075\text{ M NaCl}$ , 0,75 мл/мин. на силасорбе С-18.

**Частичный восстановительный гидролиз каррагинана.** 200 мг к – каррагинана обрабатывают в условиях частичного гидролиза, как описано для агара, 24 ч при  $55^\circ\text{C}$  или 8 ч при  $65^\circ\text{C}$ . В процессе гель-хроматографии собирают фракции 240-254 и 255-266 мл, содержащие преимущественно

дисульфат карратетраита и сульфат каррабиита соответственно в виде 4-метилморфолиниевых солей. Каждую из этих фракций рехроматографируют на ионообменной колонке и полученные фракции с временами удерживания 6 и 12 мин обессоливают на сефадексе G-10.

Гель-хроматографию выполняют на колонке (2,6 x 87 см) с Toyopearl TSK HW-40S (Япония),  $V_0 = 135$  мл, элюент-вода, 0,75 мл/мин при 20 или 40 °С (повышенная температура использовалась для частичных гидролизатов агара). Выделение сульфатированных олигосахаридов осуществляют на полупрепаративной колонке (1x25 см) с тем же сорбентом («Диагностикум»), элюент – 0,075 М NaCl, 4 мл/мин. Фракции обессоливают на колонке (2,6x30 см) с сефадексом G-10 при промывании водой. Обратноразносную хроматографию выполняют на колонке (1x25 см) с силасорбом C-18, 7 мкм («Диагностикум»), элюент вода, 3 мл/мин.

*Частичный восстановительный гидролиз биомассы водорослей.* К навеске (20 мг) биомассы водоросли, предварительно измельченной, обработанной метанолом в аппарате Сокслета до получения бесцветного экстракта и высушенной, прибавляют 3 мл воды, нагревают 6 ч при 100 °С, охлаждают, прибавляют 50 мг 4-метил-морфолинборана, приливают 1 мл 2 М  $\text{CF}_3\text{COOH}$  и нагревают 30 мин при 100 °С. Реакционную смесь трижды упаривают с толуолом, остаток распределяют между водой и хлороформом, хлороформный слой отделяют, концентрируют и используют для ГЖХ. ГЖХ выполняют на хроматографе Hewlett-Packard 5890 А с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой Ultra-I и интегратором 3393 А; условия – градиент температуры от 175 до 290 °С, 10 °С/мин.

*Определение галактозы.* Определение галактозы проводят фенолсерным методом, так как фенол в присутствии серной кислоты может быть использован для количественного колориметрического микроопределения сахаров и их метиловых производных, олигосахаридов и полисахаридов. Простые сахара, олигосахариды, полисахариды и их производные да-

ют оранжево-желтое окрашивание при обработке фенолом с концентрированной химически чистой серной кислотой. Этот метод достаточно простой, быстрый, чувствительный и, особенно, пригоден для определения малых количеств сахаров, дает воспроизводимые результаты. Используемый реагент недорогой и стабильный, данный раствор требует только одну стандартную кривую для каждого сахара. Образующаяся окраска растворов является постоянной.

*Приготовление 5%-ного раствора фенола.* 5 г перекристаллизованного фенола помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

Калибровочную кривую строят по галактозе. Готовят исходный раствор галактозы с концентрацией 100 мкг/мл. Для этого 5 мг галактозы растворяют в 50 мл воды. Для построения калибровочного графика методом разбавления готовят серию растворов следующих концентраций:

1. 10 мкг галактозы в 0,5 мл – 0,1 мл исходного раствора галактозы доводят водой до 0,5 мл;
2. 20 мкг галактозы в 0,5 мл – 0,2 мл исходного раствора галактозы доводят водой до 0,5 мл;
3. 30 мкг галактозы в 0,5 мл – 0,3 мл исходного раствора галактозы доводят водой до 0,5 мл;
4. 40 мкг галактозы в 0,5 мл – 0,4 мл исходного раствора галактозы доводят водой до 0,5 мл;
5. 50 мкг галактозы в 0,5 мл – 0,5 мл исходного раствора галактозы доводят водой до 0,5 мл.

К 0,5 мл раствора галактозы прибавляют последовательно 0,5 мл раствора 5%-ного раствора фенола, 2,5 мл концентрированной  $H_2SO_4$ , через 30 мин измеряют поглощение на колориметре при длине волны 490 нм против дистиллированной воды взятой для приготовления раствора сахара.

Для количественного определения галактозы в полисахаридах проводят полный кислотный гидролиз в 1 н. HCl (16 ч для  $\lambda$ -каррагинана, 5 ч для

к-каррагинана) и далее анализируют, как описано выше. Вместо 0,5 мл раствора галактозы берут 0,5 мл гидролизата, проводят реакцию, измеряют поглощение и по калибровочной кривой определяют количество сахара, соответствующее поглощению гидролизата.

Расчет содержания галактозы проводят по формуле:

$$\%(\text{Gal}) = (C \times 100 \times 10^{-3} \times 100)/m = (C \times 10)/m,$$

где: С-концентрация, определяемая по калибровочному графику, мкг;

m-навеска полисахарида, взятая для анализа, мг.

Вычисление проводят до второго десятичного знака с последующим округлением результата до первого десятичного знака.

За окончательный результат определения принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должно превышать 0,01 %.

**Определение содержания сульфатных групп в полисахаридах.** Метод основан на измерении % поглощения суспензии сульфата бария в желатине при длине волны 364 нм [Dodgson, Price, 1962].

**Приготовление реактива.** 1 г желатина растворяют в 200 мл воды температурой 60-70 °С, оставляют на 12-13 ч при 4 °С, затем раствор делят на две порции по 100 мл. В одной из них растворяют 1,0 г BaCl<sub>2</sub>, затем его центрифугируют (3000 об./мин) и сливают надосадочную жидкость. Оба реагента хранят при 4 °С и используют в течение недели.

Калибровочный график строят по K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, предварительно перекристаллизованному и высушенному при 105 °С. Готовят исходный раствор K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> с концентрацией 1 мг/мл. Для этого 50 мг K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> растворяют в 50 мл воды. Для построения калибровочного графика методом разбавления готовят серию растворов следующих концентраций: 40 мкг, 60 мкг, 80 мкг, 100 мкг, 120 мкг, 140 мкг, 160 мкг, 180 мкг в 0,2 мл.

1. 40 мкг K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в 0,2 мл – 0,04 мл исходного раствора K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> доводят водой до 0,2 мл;

2. 60 мкг  $K_2SO_4$  в 0,2 мл – 0,06 мл исходного раствора  $K_2SO_4$  доводят водой до 0,2 мл;
3. 80 мкг  $K_2SO_4$  в 0,2 мл – 0,08 мл исходного раствора  $K_2SO_4$  доводят водой до 0,2 мл;
4. 100 мкг  $K_2SO_4$  в 0,2 мл – 0,1 мл исходного раствора  $K_2SO_4$  доводят водой до 0,2 мл;
5. 120 мкг  $K_2SO_4$  в 0,2 мл – 0,12 мл исходного раствора  $K_2SO_4$  доводят водой до 0,2 мл;
6. 140 мкг  $K_2SO_4$  в 0,2 мл – 0,14 мл исходного раствора  $K_2SO_4$  доводят водой до 0,2 мл;
7. 160 мкг  $K_2SO_4$  в 0,2 мл – 0,16 мл исходного раствора  $K_2SO_4$  доводят водой до 0,2 мл;
8. 180 мкг  $K_2SO_4$  в 0,2 мл – 0,18 мл исходного раствора  $K_2SO_4$  доводят водой до 0,2 мл.

К 0,2 мл  $K_2SO_4$  добавляют 3,8 мл 3% трихлоруксусной кислоты и 1 мл раствора  $BaCl_2$ -желатина. Через 5-10 мин измеряют поглощение на колориметре против дистиллированной воды. Измерения проводят только с реактивом  $BaCl_2$ -желатин и строят калибровочный график.

*Проведение испытания.* Точно взвешенную навеску полисахарида (для каррагинана –3-4 мг; агара-25 мг, агароподобных 6-7 мг) заливают 2 мл 1 н.  $HCl$ , гидролизуют в запаянной ампуле 5 ч при 105-110 °С. После охлаждения ампулу вскрывают, 0,2 мл гидролизата переносят в пробирку, прибавляют 3,8 мл 3% трихлоруксусной кислоты, затем 1 мл реактива  $BaCl_2$ -желатин, перемешивают и измеряют поглощение на колориметре при длине волны 364 нм против раствора, в котором гидролизат заменен 0,2 мл 1 н.  $HCl$ . Суспензия устойчива в течение 1ч. Измерение проводят в кюветах с рабочей длиной 10 мм. Затем берут 0,2 мл гидролизата, переносят в пробирку, прибавляют 3,8 мл 3% трихлоруксусной кислоты, 1мл желатина и проводят измерение поглощения против контрольного раствора, содержащего вместо гидролизата 0,2 мл 1 н.  $HCl$ . Разница между 1-ой и

2-ой величинами оптической плотности определяет поглощение общего сульфата в полисахариде.

Расчет содержания сульфата в образце проводят по формуле:

$$\%(\text{SO}_4^{2-}) = (0,6 \times C \times 10^{-3} \times 100)/m;$$

где: С-концентрация вещества, определенная по калибровочной кривой, мкг;

**m**- навеска полисахарида, мг;

**0,6** – коэффициент пересчета из  $\text{K}_2\text{SO}_4$  в  $\text{NaHSO}_3$ .

Вычисление проводят до второго десятичного знака с последующим округлением результата до первого десятичного знака.

За окончательный результат определения принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 %.

**Методика микробиологического тестирования агара.** Микробиологический агар используют для изготовления питательных сред для выращивания бактерий. Агар, применяемый для этой цели, должен быть в высокой степени очищенным, обеспечивать оптимальную плотность, обладать высокой устойчивостью к ферментативному действию культивируемых микроорганизмов и обеспечивать усвоение последними питательных веществ. Поэтому для оценки пригодности использования агара в качестве основы питательных сред необходимо проводить специальные микробиологические исследования, основу которых заложены следующие положения [Андреева и др., 1980]:

1. каждая живая микробная клетка, помещенная в агаровую питательную среду, должна размножиться и давать видимую невооруженным глазом колонию;
2. любая колония должна вырастать не более чем из одной микробной клетки.

*Проведение анализа (методика 1).* В качестве тест микроорганизмов используют штаммы *E.coli* М-17 и *St.aureus*, подсчет колоний которых проводят после их 18-20 часового роста.

Для оценки роста микроорганизмов в качестве контрольной среды используют питательный агар, например, производства Дагестанского НИИ питательных сред (г.Махачкала), в состав которого входит: гидролизат кильки-17,9 г/л, натрий хлорид-5,9 г/л, агар-11,2 г/л, рН-7,2-7,4. Можно использовать и другую подходящую питательную среду.

Контрольную микробиологическую среду приготавливают следующим образом: 17,5 г порошка питательного агара размешивают в колбе с 500 мл дистиллированной воды, нагревают, кипятят 1-2 мин, отфильтровывают, раствор стерилизуют 20 мин при 120<sup>0</sup>С, охлаждают до 40-45<sup>0</sup>С и разливают в стерильные чашки Петри.

Опытную среду готовят на основе стандартного сухого питательного бульона, дистиллированной воды и экспериментального агара. Агар вносят в количестве, обеспечивающем прочность питательной агаровой среды, равной прочности контрольного образца – 470 г/см<sup>2</sup>.

В контрольную и опытную среды вносят *E.coli* и *St.aureus* в физиологическом растворе. Расчет количества бактериальных культур, засеваемых на опытных и контрольных средах, проводят по оптическому стандарту мутности (ГИСК им.Тарасевича).

Чашки Петри с контрольной и опытной средами, содержащими бактерии, инкубируют в течение 24 ч. при температуре 37<sup>0</sup>С.

Результаты исследования агара с целью применения его в качестве микробиологической среды для выращивания культур должны показать, что засеянные культуры *E.coli* на опытных и контрольных питательных средах характеризуются типичным ростом и морфологией изолированных колоний. Количество выросших микробных колоний на питательной среде, основой которой является экспериментальный агар, должно быть приближено к числу колоний, выросших на стандартной среде.

Количество колоний *St.aureus*, как в экспериментальной, так и в контрольной питательной среде должно вырасти настолько, что их подсчет должен быть не возможным.

Таким образом, микробиологическое тестирование испытуемого агара должно показать, что препарат пригоден для роста бактериальных культур.

**Определение возможности использования агара для приготовления питательных сред и проведения микробиологических исследований.** Для оценки биологических показателей агара на его основе готовят питательный агар с использованием бульона Хоттингера (по ФСП 42-0397-2539-02).

Учитывая высокую прочность агара ( $500-630 \text{ г/см}^2$ ), в питательный бульон вносят 0,8% агара, тщательно перемешивают, кипятят, постоянно помешивая, до полного растворения агара в течение 3 минут, не допуская прилипания смеси ко дну колбы. Регулируют pH раствора в интервале 7,2-7,4 с помощью 20% раствора натрия гидроокиси (ГОСТ 4328-77). Раствор агара должен быть прозрачным, слегка соломенного цвета, без присутствия каких-либо включений. Стерилизуют в автоклаве при температуре  $121^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин, охлаждают при комнатной температуре до  $45-50^{\circ}\text{C}$  и разливают в стерильные чашки Петри по ГОСТ 25336-82 или ТУ 64-2-19-79 слоем 4-5 мм. Перед посевом чашки со средой подсушивают в термостате, соблюдая правила асептики, в течение 60 мин, при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Готовая питательная среда, разлитая в чашки Петри должна быть прозрачной, слегка желтоватого цвета.

Для испытания полученного питательного агара используют музейные тест-штаммы культур, хранящиеся в лиофилизированном состоянии (ГНСК им.Тарасевича):

- *Shigella flexneri* 1a 8516;
- *Shigella sonnei* "S form";
- *Pseudomonas aeruginosa* 27/29;
- *Serratia marcescens* 1.

Испытуемый питательный агар оценивают по следующим биологическим показателям:

1. *Чувствительность* среды определяют по максимальному разведению культуры, при котором на всех засеянных чашках обнаруживается рост.
2. *Скорость роста* определяют по минимальному времени инкубации после посева культур, достаточного для их выведения.
3. *Стабильность* основных свойств микроорганизмов определяют по биологическим свойствам культур, выросших на испытуемом питательном агаре.

Для проведения исследований музейные тест-штаммы восстанавливают из лиофилизованного состояния с использованием жидкой и плотной питательных сред. Проводят несколько пассажей с целью получения колоний, типичных для данного вида микроорганизмов. Выросшие на питательной среде культуры каждого тест-штамма оценивают визуально на чистоту роста и отсутствие диссоциации (Методические рекомендации к контролю питательных сред по биологическим показателям, 1980).

Восстановленные культуры используют для контроля испытуемого питательного агара. Для этого полученные колонии отсеивали в пробирки с питательным агаром (ПА) и инкубировали в течение 18-20 ч при температуре 37<sup>0</sup>С и 22<sup>0</sup>С для *Serratia marcescens* 1.

Из выросших в пробирках культур готовят стандартную взвесь культур каждого тест-штамма, соответствующего 10 единицам по стандарту мутности ОСО 42-28-85 П, с использованием стерильного 0,9% раствора натрия хлористого (ГОСТ 4233-77).

Полученные взвеси культур *Shigella flexneri* 1a 8516 и *Shigella sonnei* «S form» десятикратными разведениями доводят до разведения 10 –8.

Для определения *чувствительности* питательного агара и скорости роста микроорганизмов на нем из 4-х последних разведений (10-5, 10-6, 10-7, 10-8) по 0,1 мл взвеси каждого тест-штамма вносят на 3 хорошо под-

сушеные чашки с питательным агаром. Через 18-20 ч инкубации культур *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* «S form» и *Pseudomonas aeruginosa* 27/29 при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  и  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  для *Serratia marcescens* 1 определяли наличие и характер роста тест-штаммов. Определение проводили визуально. Для определения *стабильности культур*, выросших на испытуемом питательном агаре, колонии каждого из тест-штаммов пересеивают в пробирки с испытуемым питательным агаром (косой агар).

Через 18-20 ч инкубирования при  $37^{\circ}\text{C}$  культуру каждого тест-штамма пересеивали на биохимический ряд, состоящий из 17 основных углеводов, спиртов и аминокислот. Инкубировали в течение 18-20 ч при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

*Результаты.* Полученный раствор питательного агара, приготовленного с использованием высококачественного агара должен быть прозрачным, желтоватого цвета и не требовать фильтрования.

На всех засеянных чашках Петри должны наблюдать рост тест-штаммов *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* «S form» в виде бесцветных, прозрачных, выпуклых крупных колоний диаметром: *Shigella flexneri* 1a 8516 –1,0-2,0 мм; *Shigella sonnei* «S form»-1,5-2,5 мм. Из разведения 10<sup>-6</sup> должно вырасти 45±5 колоний.

Рост тест-штаммов в *Pseudomonas aeruginosa* 27/29 и *Serratia marcescens* 1 должно быть в виде колоний с образованием сине-зеленого и оранжево-красного пигментов. При посеве по 0,1 мл микробной взвеси, соответствующей 10 единицам по стандартному образцу мутности должно вырасти 72±4 колонии. Биохимические свойства всех тест-штаммов (ферментация углеводов, образование H<sub>2</sub>S и индола, образование пигмента и др.), а так же подвижность должны оставаться стабильными.

## МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ МОРСКИХ ТРАВ

*Методы весового определения содержания пектиновых веществ.*

*Приготовление экстракта пектина.* Навеску 10 г сухого измельченного растительного материала (морская трава) помещают в коническую колбу объемом 250 мл, добавляют 50 мл 0,3 н. раствора соляной кислоты, закрывают колбу пробкой с обратным холодильником и выдерживают 30 мин на кипящей водяной бане. Солянокислый экстракт фильтруют через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу №1 на 500 мл. Остаток на фильтре 3-4 раза промывают 75 мл дистиллированной воды, промывные воды фильтруют через бумажный фильтр в ту же колбу. Фильтр вместе с остатком растительного материала переносят в коническую колбу, заливают 50-70 мл 1%-ного лимоннокислого аммония, колбу с содержимым помещают на кипящую водяную баню на 30 мин. Полученный экстракт фильтруют через бумажный фильтр в ту же мерную колбу №1. Фильтр промывают горячей водой, после чего содержимое колбы охлаждают и доводят до метки. Полученный экстракт исследуют одним из следующих методов [Методические указания..., 1997].

*Кальций-пектатный метод.* Метод основан на осаждении пектиновых кислот в виде кальциевых солей. Это один из наиболее точных методов. Он прост, доступен и имеет хорошую сходимость параллельных анализов. В зависимости от цели исследования можно определить отдельно растворимый пектин, протопектин или сумму пектиновых веществ. Для гидролиза пектиновых веществ к 50 мл исследуемого экстракта прибавляют равный объем 0,4% -ного раствора NaOH и оставляют на 8-10 ч при комнатной температуре. По истечении этого времени раствор подкисляют тем же объемом 1 н. уксусной кислоты. Образовавшиеся пектиновые кислоты осаждают 50 мл 11,1%-ного раствора CaCl<sub>2</sub>. Полученный осадок пектата кальция отфильтровывают через заранее высушенный до постоян-

ной массы и взвешенный с бюксой бумажный фильтр. Осадок на фильтре промывают 0,5 %-ным раствором  $\text{CaCl}_2$ , затем 5-6 раз дистиллированной водой для удаления ионов хлора. Фильтр с осадком переносят в бюкс и сушат до постоянной массы при температуре 100-105 °С. Массу осадка, полученную по разности между массой бюкса с осадком на фильтре и массой бюкса с фильтром, умножают на 0,9235 для пересчета на пектиновую кислоту.

**Осаждение этиловым спиртом.** Существуют несколько модификаций этого метода. Наиболее используемые следующие:

*1 способ.* К 50 мл исследуемого экстракта прибавляют концентрированную соляную кислоту до достижения ее конечной концентрации 0,15 н. Затем при непрерывном энергичном перемешивании вводят по каплям 100 мл 95%-ного этилового спирта. Через 1 ч осадок отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр, тщательно промывают смесью вода:этанол (1:2), содержащей 0,2% соляной кислоты. Промытый осадок растворяют на фильтре горячей водой. При плохой растворимости осадка к горячей воде прибавляют несколько капель щелочи. Количество фильтрата должно быть равным 50 мл. Полученный фильтрат нейтрализуют и снова осаждают этиловым спиртом. Образовавшийся осадок снова отфильтровывают, промывают сначала смесью вода: этанол (1:2), затем 96%-ным этиловым спиртом, переносят количественно горячей водой в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный тигель и сушат в сушильном шкафу при температуре 100-105°С до постоянной массы. Разность между массой тигля с осадком после сушки и пустого тигля - это количество пектина в 50 мл раствора.

*2 способ.* К 100 мл исследуемого экстракта прибавляют 20 мл концентрированной соляной кислоты. Из подкисленного экстракта пектин осаждают, прибавляя 100 мл 96%-ного спирта. Спустя 15 мин. выпавший осадок отфильтровывают через плотное шелковое полотно, которое осторожно разворачивают и помещают в открытую широкую чашку осадком вверх.

Осадок заливают 300 мл 96%-ного спирта, растирают и отжимают. Такую промывку повторяют 3-4 раза до отрицательной реакции на хлор. После тщательного обезвоживания, осадок переносят количественно в прокаленный взвешенный тигель, сушат его и сжигают. Количество пектиновых веществ определяют по разности между массой остатков после сушки и сжигания. Достоинством этого метода является его простота. Однако он недостаточно точен, так как вместе с пектином осаждаются балластные по отношению к пектину вещества.

**Осаждение ацетоном.** К исследуемому экстракту пектиновых веществ, прибавляют ацетон до конечной концентрации в растворе 50%. Через 5 мин отстаивания смеси осадок отфильтровывают через бумажный фильтр, количественно переносят его, смывая холодной водой в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки. Для лучшего растворения осадка раствор подогревают. После охлаждения раствора прибавляют ацетон для осаждения пектиновых веществ. Повторно фильтруют через взвешенный беззольный фильтр, осадок промывают 60%-ным ацетоном, сушат при температуре 100<sup>0</sup>С и сжигают. Количество пектиновых веществ в исследуемом растворе определяют по разности между массой остатков после сушки и сжигания. Достоинство данного метода состоит в том, что получается более плотный осадок, чем при осаждении спиртом. Кроме того, ацетон легко регенерируется.

**Определение пектиновых веществ карбазольным методом.** Пектиновый раствор (приготовленный по п.1.1) подкисляют серной кислотой до рН 1,0-1,5. Затем пектины осаждают подкисленным этиловым спиртом-ректификатом до рН 4,7-4,8. образовавшийся осадок отделяют центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин и промывают подкисленным спиртом. Промытый осадок гидролизуют концентрированной серной кислотой, добавляют 0,2%-ный спиртовый раствор карбазольного реактива и проводят измерение оптической плотности на фотоэлектроколориметре или аналогичном приборе при длине волны 535 нм (зеленый светофильтр).

Предпочтительно использовать кювету с рабочей длиной 20 мм. Отсчет на ФЭКе ведут по шкале оптической плотности. Количество пектиновых веществ определяют с помощью калибровочной кривой, построенной по чистой галактурановой кислоте. [Аймухамедова, Шелухина, 1964].

При использовании карбазольного метода результаты могут быть искажены из-за недостаточно тщательной промывки пектинового осадка от сахарозы, продукты гидролиза которой (в основном глюкоза) дают с карбазолом тот же цвет, хотя и менее интенсивный, чем галактурановая кислота.

*Определение свободных и метоксилированных карбоксильных групп, степени метоксилированности пектина титрометрическим методом.* Навеску 1 г промытого и высушенного пектина, полученного из экстракта п.1.1, помещают в колбу на 300 мл, смачивают чистым 96%-ным этиловым спиртом для предотвращения комкования и добавляют 100 мл дистиллированной воды, перемешивают и оставляют на ночь до полного растворения пектина. Раствор титруют 0,1 н. NaOH при добавлении 6 капель индикатора Хинтона до появления красного окрашивания, не исчезающего в течение 1 минуты. Для индикатора смешивают 1 объем 0,4 % бромтимолблау, 1 объем 0,4 %-ного красного крезола, 3 объема 0,4 %-ного красного фенола и 1 объем дистиллированной воды. [Хенглейн, 1960].

Содержание свободных карбоксильных групп  $K_c$  %, рассчитывают по формуле:

$$K_c = a \times 0,45 / G,$$

где:  $a$  - количество 0,1 н. раствора NaOH, израсходованное на титрование, мл;

(1 мл 0,1 н. раствора NaOH эквивалентен 0,0045 г COOH-групп);

$G$  - навеска пектина.

В этом же растворе определяют количество метоксилированных карбоксильных групп.

К нейтрализованной пробе после определения содержания свободных карбоксильных групп добавляют из бюретки 10 мл 0,5 н. NaOH. Колбу закрывают и оставляют на 2 ч при комнатной температуре для гидролиза метоксилированных карбоксильных групп. Затем к раствору добавляют из бюретки 10 мл 0,5 н. HCl и избыток последней титруют 0,1 н. NaOH.

Количество 0,1 н. NaOH, израсходованное на второе титрование, соответствует количеству этерифицированных групп Кэ, % в исследуемой пробе, которое рассчитывают по формуле:

$$Kэ = b \times 0,45 / Gm,$$

где: **b** - количество 0,1 н. NaOH, израсходованное на второе титрование, мл;

**Gm** - навеска промытого и высушенного порошка пектина, г.

Для расчета количества метоксилированных карбоксильных групп необходимо вводить поправку на ацетильные группы, которые также гидролизуют при этих условиях. Количество метоксильных групп Км, %, с учетом поправки на ацетильные группы составляет:

$$Kм = Kэ - Aц,$$

где: **Aц** - количество ацетильных групп, %

Степень метоксилированности пектина рассчитывают по формуле:

$$C = Kм \times 100 / Kо,$$

где: **Kо** - общее содержание карбоксильных групп, %;

$$Kо = Kм + Kс,$$

где: **Kс** - содержание свободных карбоксильных групп, %.

Содержание метоксильных групп **Kсн<sub>3</sub>о**, % рассчитывают по формуле:

$$Kсн_3о = Kм (31 / 45),$$

где: **31** - эквивалентная масса CH<sub>3</sub>O-групп;

**45** - эквивалентная масса COOH-групп.

**Определение ацетильных групп в пектине.** Навеску пектина 1,0 г взвешивают на весах второго класса точности, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 25 мл 0,6%-ного раствора NaOH и оставляют на 6-8 ч, затем содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой. Отбирают 20 мл раствора в дистилляционную колбу, добавляют 20 мл раствора MgSO<sub>4</sub> (100 г MgSO<sub>4</sub> растворяют в воде до 180 мл и добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты).

Дистилляцию проводят, нагревая колбу 1 на горелке, пока объем в ней не достигнет 15-20 мл, затем открывают зажим от парообразователя и пропускают пар. Скорость пропускания пара и нагревания колбы регулируют так, чтобы в колбе поддерживать постоянный объем жидкости 15-20 мл. Отбирают 1 мл дистиллята и титруют в присутствии фенолфталеина 0,1 н. раствором NaOH.

Параллельно проводят холостой опыт с 20 мл раствора и 20 мл дистиллированной воды. Разница между титрованиями соответствует количеству ацетильных групп в порошке пектина, содержание которых (Ац%) рассчитывают по формуле:

$$Ац = 43,04 \times C/G \times 100,$$

где: С-разница между количествами 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование в опыте с навеской и в холостом опыте, мл;

G – навеска пектина.

43,04-эквивалентная масса ацетильных групп.

**Определение уроновых кислот в полисахаридах.** Полные кислотные гидролизаты полисахаридов подвергают анализу методом ГЖХ. В этом случае необходимы дополнительные химические превращения уроновых кислот в летучие производные. Продукты гидролиза представляют собой обычно смесь уроновых кислот с их лактонами.

Вместо гидролиза можно использовать метанолиз. В этом случае образуется многокомпонентная смесь метиловых эфиров метилгликозидов.

Известен анализ таких смесей в виде триметилсилилпроизводных [Kennedy, Robertson, Stagey, 1976].

Также предложено переводить уроновые кислоты в лактоны альдоновых кислот (восстановлением альдегидных групп и последующей лактонизацией) или в полиолы с последующим хроматографическим разделением в виде ацетатов [Perry, Hulyalkar, 1965].

**Получение ацетатов полиолов.** 50 мг альгината (или зостерина) смешивают с 0,5 мл 80%-ной серной кислоты, оставляют на 18 часов при комнатной температуре, а затем добавляют 6-7 мл дистиллированной воды до 2 н. концентрации серной кислоты. Смесь термостатируют при 100<sup>0</sup>С в течение 5 часов. Охлажденный гидролизат переносят в стаканчик и проводят нейтрализацию CaCO<sub>3</sub> до прекращения выделения пузырьков газа. Гидролизат фильтруют, нерастворимый осадок дважды промывают 1-2 мл дистиллированной воды, промывные воды соединяют с фильтратом.

Перед хроматографическим определением соотношения уроновых кислот смесь моносахаридов превращают в ацетаты полиолов. Для этого сначала проводят восстановление уроновых кислот до полиолов боргидридом натрия. К полученному гидролизату добавляют избыток NaBH<sub>4</sub> (50 мг), оставляют на 1,5-2 часа (можно на ночь) при комнатной температуре. Непрореагировавшее количество боргидрида нейтрализуют и деионизируют катионообменной смолой Ку-2H<sup>+</sup>, добавляя по 1-1,5 мл суспензии смолы непосредственно в колбы, в течение 5-10 мин. Смесь пропускают через фильтр, промывая смолу 2-3 раза водой по 1-2 мл и упаривают.

Чтобы удалить борную кислоту, осадок после упаривания 2-3 раза обрабатывают кислым метанолом. Для этого в колбы добавляют по 4 мл 0,1%-ного раствора соляной кислоты в метаноле, нагревают в течение 5 мин при 50-55<sup>0</sup>С и упаривают. Повторяют эту процедуру до удаления белого осадка на стенках колбы.

Для полного восстановления уроновых кислот обработку гидролизата боргидридом натрия проводят трижды.

Ацетилирование полученных полиолов уроновых кислот проводят смесью уксусный ангидрид: пиридин (1:2) в течение 1 часа при 100<sup>0</sup>С. После реакции избыток пиридина и уксусного ангидрида удаляют 3-х кратной перегонкой с толуолом или с Н-гептаном. От избытка толуола освобождаются, добавляя в колбы 3 мл хлороформа и упаривая.

Перед хроматографией полученные ацетаты полиолов разбавляют хлороформом. Анализ проводят на газожидкостном хроматографе с плазменно-ионизационном детектором; колонка (0,6x150 см) наполнена 3% ECNSS-M на газхроме Q; температура 180<sup>0</sup>С, скорость протекания азота 50мл/мин.

Расчет процентного содержания уроновых кислот в альгинате - маннуроновой кислоты (М) и гулууроновой кислоты (Г) проводят по отношению площадей соответствующих пиков на хроматограмме или с использованием интегратора. Полученные значения пересчитывают для выяснения истинного соотношения М/Г в исходном альгинате:

$$M/G = (M/G_{\text{хроматог.}}) \times 0,85$$

0,85 – коэффициент, учитывающий преимущественное разрушение остатков Г по сравнению с остатками М при полном кислотном гидролизе.

*Получение альдононитрилов.* К точной навеске сухих водорослей или водорослевого остатка (15-20 мг) добавляют 40-50 мг 4-метилморфолинборана и 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты, содержащей внутренний стандарт – инозит (0,9 мг/мл). Смесью нагревают в закрытой колбе 8 ч при температуре 100<sup>0</sup>С. После охлаждения к смеси трижды прибавляют и отгоняют на роторном испарителе по 8 мл этанола. Затем к сухому гидролизату добавляют 1 мл 6%-ного раствора хлоргидрата гидроксиламина в пиридине и нагревают еще 1 ч при 100<sup>0</sup>С. Потом добавляют 1 мл уксусного ангидрида и нагревают еще 1 ч при 100<sup>0</sup>С. После охлаждения к смеси трижды прибавляют и отгоняют на роторном испарителе по 10 мл толуола. Оставшуюся маслянистую жидкость растворяют в 3 мл хлороформа и добавляют 1 г силикагеля. Все тщательно перемешивают и фильт-

руют через бумажный фильтр. Силикагель на фильтре промывают два раза хлороформом порциями по 3 мл. Хлороформ отгоняют на роторном испарителе, остаток растворяют в 1 мл хлороформа и анализируют методом ГЖХ [Усов, Элашвили, 1991; Usov, Bilan, Klochkova, 1995].

**Получение триметилсилилпроизводных.** Для анализа используют образец уроновой кислоты после полного гидролиза альгината или зостерина. 100 мкл гексаметилдисилазана и 50 мкл хлоротриметилсилана добавляют к 500 мкл (1 мг/мл) раствора уроновых кислот. После прохождения реакции к раствору добавляют пиридин и центрифугируют для удаления осадка хлорида аммония. Полученные образцы анализируют на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором. Анализ проводят на колонке (152 см x 4 мм) с фазой SE 30 или XE 60 на Celite (с размером пор 100-120). В качестве газа-носителя используют азот со скоростью течения 40 мл/мин. Анализ проводят при температуре 175 °С - для XE 60 или 200 °С - для SE 30. В качестве внутреннего стандарта используют триметилсилилпроизводное рибитола [Kennedy, Robertson, Stagey, 1976].

**Определение избирательной сорбционной способности полиуронидов.** Полиурониды - альгиновая кислота бурых водорослей, а также пектины морских трав, обладают свойствами природного ионообменника, обеспечивающего механизм избирательной фиксации катионов металлов водорослями и травами. На этом же свойстве основана способность полиуронидов преимущественно адсорбировать и выводить из организма человека одни металлы, заменяя их другими. Данные по сорбционной активности альгиновой кислоты показывают, что все элементы по адсорбируемости на полимере располагаются в следующий общий ряд по мере убывания: Pb > Cu > Ba > Sr > Ca > Co > Mn, Zn, Fe. Эти данные свидетельствуют о том, что в присутствии тяжелых металлов или радионуклидов, альгиновые кислоты избирательно адсорбируют их ионы без изменения усвоения кальция организмом, несмотря на то, что, например, стронций является химическим аналогом кальция, и их движение по пищевым путям сходно [Несп,

Ramsbotton, 1965; Misonou et al., 1980]. При этом эффективность адсорбции стронция тем выше, чем больше в альгинатах содержится L-гулурановой кислоты [Harrison, 1966; Долматова, Пантелеева, 1968; Дубровина и др., 1969; Аминина, Подкорытова, 1994], так как способность альгиновой кислоты связывать катионы металлов зависит от ее мономерного состава. Способностью адсорбировать поливалентные элементы, в том числе тяжелые металлы и радионуклиды, обладают все кислые полисахариды, относящиеся к полиуронидам. Адсорбция поливалентных металлов основана на замещении водорода карбоксильной группы полимера на ионы металлов с образованием нерастворимых комплексов. При этом их комплексообразующая способность не зависит от молекулярной массы полимера и определяется коэффициентом селективности ионного обмена, являющегося характеристикой насыщения карбоксильной группы полиуронидов двухвалентными катионами.

В связи с уникальной способностью к адсорбции полиуронидов морских бурых водорослей и трав развивается их использование в качестве энтеросорбентов, применяемых для детоксикации организма [Корзун и др., 1992 а; 1992 в; Корзун и др., 1993; Лоенко, 1997; Подкорытова, 2005].

Сорбционную способность кислых полисахаридов определяют по реакции со стабильными катионами в системах, например,  $\text{Ca}^{2+}$  -  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  -  $\text{Pb}^{2+}$  по методу Хауга [Haug, 1964].

*Методика.* Навеску полисахарида помещают в коническую колбу на 100 мл и заливают 0,0015М растворами систем  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  -  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  или  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  -  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  и встряхивают в течение 10 мин. Первую партию колб выдерживают в течение 0,3 ч; вторую - в течение 1 ч и третью - в течение 24 ч при температуре окружающего воздуха. По окончании процесса содержимое колбы фильтруют через складчатый фильтр. Из фильтрата отбирают аликвоту 5 мл. Осадок на фильтре промывают дистиллированной водой, подсушивают, измельчают и подготавливают пробу к определению металлов, методом мокрого сжигания [Ковековдова, 1987].

В полученных образцах определяют количество  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  и  $\text{Pb}^{2+}$ , адсорбированных полисахаридом, и оставшихся в растворе.

Из химической реакции, на примере альгиновой кислоты, с привлечением закона действующих масс была выведена формула для расчета коэффициента селективности [Подкорытова и др., 1992].

Расчет коэффициента селективности, характеризующего предпочтительную адсорбцию ионитом одного катиона в сравнении с другим, проводят по формуле:

$$K = \frac{[\text{Sr}]_g \times [\text{Ca}]_i}{[\text{Ca}]_g [\text{Sr}]_i},$$

где:  $[\text{Sr}]_g$ ,  $[\text{Ca}]_g$  – молярные концентрации ионов, адсорбированных полисахаридом;

$[\text{Sr}]_i$ ,  $[\text{Ca}]_i$  – молярные концентрации ионов, введенных в реакцию.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДОВ

*Определение относительной вязкости водных растворов альгината натрия.* Вязкость водных растворов альгината натрия – одна из важнейших физических характеристик растворимого полисахарида. Эту характеристику альгината натрия получают методом вискозиметрии, измеряя относительную вязкость 0,2 или 1%-ного водного раствора на вискозиметре ВПЖ с определенным диаметром капилляра. Относительную молекулярную массу альгината натрия определяют методом вискозиметрии, измеряя вязкость 0,2%-ных растворов альгината в 0,2 н. растворе хлорида натрия, который используется для снятия электровязкого эффекта растворенного полимера [Воюцкий, 1976].

Вискозиметрия – наиболее простой экспериментальный метод определения молекулярной массы [Шатенштейн и др., 1964; Хувинк, Ставерман, 1965; Захарченко, 1989]. Однако теория вычисления молекулярной массы

из вискозиметрических данных чрезвычайно сложна, так как необходимо учитывать форму молекул (непроницаемые клубки, рыхлые проницаемые клубки, жесткие стержни), их деформацию и ориентацию, а также броуновское движение [Хувинк, Ставерман, 1965]. Для большинства растворов полимеров применимо уравнение Марка-Хувинка [Шатенштейн и др., 1964; Захарченко, 1989; Martinsen et al., 1991]:

$$[\eta] = KM^\alpha$$

где:  $[\eta]$  - характеристическая вязкость;

$M$  - молекулярная масса;

$K$  и  $\alpha$  - константы для данной системы полимер-растворитель.

Зависимость между характеристической вязкостью  $[\eta]$ , приведенной  $\eta_{пр} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 C$  или относительной  $\eta_{отн} = \eta/\eta_0$  вязкостью и концентрацией определяется по уравнениям Хаггинса:

$$\eta_{пр}/C = [\eta] + K_x [\eta]^2 C$$

и Кремера:

$$(\ln \eta_{отн})/C = [\eta] + K_k [\eta]^2 C$$

где:  $K_x$  и  $K_k$  - константы Хаггинса и Кремера;  $C$  - концентрация полимера.

Оба уравнения выполняются при условии  $\eta_{отн} < 1,5$ , а константы Хаггинса и Кремера связаны приближенным равенством  $K_x + K_k \approx 0,5$  [Захарченко, 1989].

Молекулярная масса, найденная методом вискозиметрии, отличается от среднечисловой  $M_n$  и среднемассовой  $M_w$ , её называют средневязкостной  $M_v$  и рассчитывают по формуле [Шатенштейн и др., 1964; Захарченко, 1989]:

$$M_v = [\sum N_i M_i^{1+\alpha} / \sum N_i M_i]^{1/\alpha}$$

Как правило, величины средних молекулярных масс удовлетворяют неравенству  $M_w > M_v > M_n$  [Стыскин и др., 1986].

Для определения молекулярной массы и молекулярно-массового рас-

пределения (ММР) альгинатов используют метод высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ) [Членов и др., 1989; Членов, 1991; Martinsen et al., 1991]. При определении молекулярной массы и ММР альгинатов используют те же методы калибровки хроматографической системы, что и для синтетических полимеров в неводных средах. Наиболее подходящим методом калибровки считается метод “универсальной” калибровки, основанный на линейной зависимости  $\lg([\eta]M)$  от  $V_e$  для полимеров различного строения, в том числе для белков и полисахаридов [Barth, 1980; Членов, Телкова, 1987; Martinsen et al., 1991; Членов, 1991]. Для расчетов молекулярно-массовых характеристик одного полимера по калибровочной кривой, построенной для другого полимера, используют уравнение Марка-Куна-Хувинка-Сакурады:

$$\lg [\eta] = \lg K + a \cdot \lg M.$$

Величины  $K$  и  $a$  могут быть известны из литературы (табл. 2) или найдены экспериментально с помощью значений  $[\eta]$ ,  $M_w$  и  $M_n$  для фракций данного полисахарида [Martinsen et al., 1991; Членов, 1991].

Таблица 2

Константы  $K$  и  $a$  для уравнения Марка-Куна-Хувинка-Сакурады

Образцы альгинатов	$K$	$a$
из <i>Laminaria japonica</i> [Членов, 1991]	$7 \cdot 10^{-5}$	0,92
из <i>Laminaria hyperborea</i> [Martinsen et al., 1991]	$6,9 \cdot 10^{-6}$	1,13
из <i>Macrocystis pyrifera</i> [Martinsen et al., 1991]	$7,3 \cdot 10^{-5}$	0,92

**Определение рН 1%-ного раствора полисахарида.** Метод основан на измерении концентрации водородных ионов.

1 г исследуемого порошка полисахарида (агара, альгината, каррагинана, пектина) растворяют при перемешивании в 100 мл дистиллированной воды. Полученную смесь нагревают в течение 10-15 мин при температуре 50-60<sup>0</sup>С. Для растворения агара смесь нагревают до кипения. Раствор декантируют от нерастворенного остатка и определяют

pH потенциометром с применением стеклянного или хинингидронного электрода.

**Определение прочности геля агара или каррагинана.** Метод основан на измерении массы нагрузки, необходимой для разрушения структуры геля толщиной 30 мм.

Для определения прочности используют гель, содержащий 0,85 -1,5% сухого агара, 0,5-2,0% каррагинана, 2,0-3,0% зостерина или готовят растворы полисахарида какой-либо другой заданной концентрации.

**Приготовление геля.** Навеску испытуемого полисахарида, отвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,001 г, помещают в колбу, заливают необходимым количеством дистиллированной воды и выдерживают для набухания не менее 1 ч. После этого колбу закрывают пробкой с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения полисахарида. 100 г горячего раствора полисахарида (не ниже 80<sup>0</sup>С) фильтруют при наличии не растворимых в воде примесей через сухую вату и разливают в три металлических стаканчика. Стаканчики с горячим раствором ставят в горизонтально установленный сосуд с плоским дном (кристаллизатор), наполненный водой температурой 20<sup>0</sup>С, уровень которой немного ниже уровня раствора в стаканчиках. Стаканчики с раствором выдерживают 1 ч при 20<sup>0</sup>С, поддерживают эту температуру добавлением в сосуд при размешивании холодной или теплой воды. Через 1 ч измеряют прочность геля с помощью прибора, предназначенного для этой цели, например прибор Валента, где перед началом работы устанавливают уровень. На поверхность геля осторожно опускают насадку диаметром 16 мм и высотой 10 мм. Поверхность, на которую давит насадка, имеет площадь 1 см<sup>2</sup>. Насадка находится на нижнем конце подвижного вертикально расположенного штока. Затем нажимают рычаг и ссыпают песок из стакана с отверстием в коническом дне в стакан для приемки песка до тех пор, пока насадка, прорвав гель, не пройдет через него.

Песок можно заменить водой. Для этого на площадку штока помещают стеклянный стакан объемом от 100 до 2000 мл (в зависимости от ожидаемой прочности геля). В стакан наливают тонкой струйкой воду комнатной температуры до тех пор, пока насадка, прорвав гель, не пройдет через него. После этого взвешивают стакан для приема груза с имеющимся в нем песком или водой с абсолютной погрешностью не более 1 г, и рассчитывают прочность геля. Песок следует насыпать (воду наливать) с постоянной скоростью от 10 до 12 г/сек., отрегулированной перед началом опыта. Для этого в стакан с отверстием в коническом дне засыпается сухой, промытый, прокаленный, просеянный песок и вращением колпачка, закрепленного гайкой до наружного положения, регулируется ход запорного штока. Перемещение колпачка по направляющей обуславливает ход запорного штока. После регулировки штока нажимают на рычаг и одновременно засекают время по секундомеру.

Взвешивают песок, пересыпавшийся за определенный промежуток времени и, если необходимо, снова регулируют ход штока. Эту операцию проводят до получения нужной скорости пересыпания песка. Необходимо также отрегулировать ход штока в направляющих роликах кронштейна. Регулировка проводится винтом. Шток должен ходить плавно, без заеданий и перекосов.

Масса подвижной системы, состоящая из насадки, штока с площадкой и сосуда для груза, должна быть от 90 до 100 г. Насадка должна быть изготовлена из антикоррозийного материала, шаровая поверхность ее должна быть полированной.

Прочность геля рассчитывают в  $\text{г/см}^2$ , где учитывается масса нагрузки в граммах, необходимая для продавливания геля, с учетом массы сосуда с песком или водой, массы штока с насадкой и площадкой.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов трех параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 10%.

При наличии современного оборудования следует его использовать

**Определение температуры гелеобразования водного раствора полисахарида.** Метод основан на визуальном определении начала гелеобразования в водном растворе полисахарида и измерении температуры (агар, каррагинан, агароид, зостерин и или филлорин).

Для определения температуры гелеобразования геля используют раствор, содержащий 0,85 -1,5% сухого агара, 0,5-2,0% каррагинана, 2,0-3,0% зостерина или 2,5% агароида, или растворы полисахарида какой-либо другой заданной концентрации.

Подготовка раствора: навеску испытуемого полисахарида, отвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,001 г, помещают в колбу, заливают необходимым количеством дистиллированной воды и выдерживают для набухания не менее 1 ч. После этого колбу закрывают обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане до полного растворения полисахарида, при необходимости доводят до кипения.

100 мл горячего раствора полисахарида (не ниже 80<sup>0</sup>С) фильтруют, при наличии не растворимых в воде примесей через фильтр. Раствор полисахарида наливают в две пробирки объемом 10 см<sup>3</sup> приблизительно до половины объема пробирок (5 мл), после чего их закрывают пробками. Пробирки помещают в стакан с водой, имеющей температуру 50<sup>0</sup>С. Температуру контролируют термометром, помещенным в стакан с водой. Когда температура воды снизится до 40<sup>0</sup>С, одну из пробирок вынимают и, наклоняя ее, наблюдают подвижность раствора до момента его перехода в гелеобразное состояние.

Пробу на желирование повторяют при охлаждении через каждый градус падения температуры воды в стакане при 39, 38<sup>0</sup>С и т.д. Падение температуры воды в стакане на 1<sup>0</sup> должно происходить не быстрее, чем в течение 2-3 мин. При необходимости подливать в стакан небольшое количество воды с температурой 20<sup>0</sup>С.

Правильность определения проверяют, пользуясь второй пробиркой, в которой состояние содержимого проверяют наклоном пробирки и измерением температуры геля.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать  $1^{\circ}\text{C}$ .

При наличии современного оборудования следует его использовать

**Определение температуры плавления геля водного раствора полисахарида.** Метод основан на визуальном определении точки плавления геля и измерении температуры плавления (агар, каррагинан, агароид).

Для определения температуры плавления используют гель, полученный из раствора полисахаридов, приготовленных для определения температуры гелеобразования, определение проводят в тех же пробирках, заполненных приблизительно до половины их высоты раствором полисахарида.

Находящийся в пробирках гель полисахарида оставляют при температуре  $20^{\circ}\text{C}$  не менее чем на три часа.

Пробирки с гелем помещают в стакан с водой, имеющей температуру  $60^{\circ}\text{C}$ , с погруженным в него термометром. Стакан помещают на водяную баню, которую подогревают таким образом, чтобы скорость повышения температуры воды в стакане на  $1^{\circ}\text{C}$  не превышала 2 - 3 мин. Через каждый градус повышения температуры одну из пробирок вынимают из стакана и, наклоняя ее, наблюдают изменение текучести геля.

Температуру, при которой содержимое пробирки перейдет в жидкое состояние, отмечают как температуру плавления полисахарида.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение результатов трех-пяти параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать  $1^{\circ}\text{C}$ .

При наличии современного оборудования следует его использовать

*Исследование реологических свойств гелей и пищевых систем.* Вязкость и предельное напряжение сдвига полисахаридных гидрогелей, их смесей, эмульсионных систем на их основе, систем, содержащих полисахаридные гидрогели, рыбный или мясной фарши определяют на ротационном вискозиметре Реотест-2 с использованием измерительных цилиндров в диапазоне измерений вязкости от 0 до 380Па. Для расчета применяют формулы:

$$\tau = z \cdot a ,$$

где:  $\tau$  - предельное напряжение сдвига, Па  
 $z$  – константа прибора;  
 $a$  – показания шкалы.

$$\eta = \frac{\tau}{D} ,$$

где:  $\eta$  - динамическая вязкость, Па х с,  
 $D$  – градиент напряжения на срез.

При исследовании влияния температуры на изменение вязкости полисахаридных гидрогелей или их смесей измеряют их вязкость в интервале температур от 20 до 120<sup>0</sup>С, выдерживая каждую пробу при определенной температуре в течение 30-40 мин.

*Методика приготовления желеобразных продуктов.* Массовую долю воды в жележном продукте типа мармелад определяют рефрактометрическим методом по ГОСТ 5900, массовую долю редуцирующих веществ - по ГОСТ 5903, общую кислотность - по ГОСТ 5898.

Для получения жележных изделий с заданной прочностью системы используют полисахаридные гидрогели (или определенной концентрации растворы агара, каррагинана и их смеси), а также различные фрукты. Фрукты с мягкой консистенцией (киви, абрикос, персик, клубника) перед заливанием раствором полисахарида (приготовление желе), обсыпают сахаром, выдерживают 30-60 мин для выделения сока, затем подсушивают 10-15 мин для удаления свободной влаги с поверхности при их обдуве холодным воздухом (20-30<sup>0</sup>С). Фрукты с твердой консистенцией (яблоко,

груша) бланшируют 5-10 мин, затем выдерживают в сиропе (концентрация сахара 50%) 40-60 мин. Подготовленные фрукты заливают раствором гелеобразующего полисахарида или раствором смеси полисахаридов, охлаждают на воздухе и выдерживают не менее 3-4 часов для завершения гелеобразования.

*Исследование эмульсионных систем.* При получении эмульсионных систем используют растворы альгината натрия в интервале концентраций от 0,5 до 2,0%, растворы каррагинана от 0,2 до 2,5% или растворы, состоящие из смеси альгината натрия и каппа-каррагинана. Хлорид калия растворяют в минимальном количестве воды и вносят в раствор каррагинана при температуре не ниже 70<sup>0</sup>С. Концентрация хлорида калия в эмульсионных системах должна составлять не более 0,1%. В качестве источника липидов используют подсолнечное, соевое, оливковое масла, рыбный жир в концентрациях от 5 до 70%. Эмульсии на основе каррагинанового гидрогеля или смеси альгинового и каррагинанового гидрогелей готовят взбиванием системы на гомогенизаторе (3 тыс. об./мин) при температуре не менее 40-45<sup>0</sup>С.

При исследовании влияния рН на вязкость эмульсии регулируют рН среды внесением раствора лимонной кислоты. Регистрируют изменение рН эмульсионных систем и водных растворов полисахаридов измерением водородного показателя на рН-метре любой марки, например, рН-673М.

Стойкость эмульсионных систем или % не разрушенной эмульсии определяют методом центрифугирования по ГОСТ 30004.2-93.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аймухамедова Г.Б., Щелухина Н.П. Пектиновые вещества и методы их определения.- Фрунзе: Илим.-1964. -120 с.
2. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Литвинова Л.С, Ефимова Васильковская В.Е., Хотимченко СВ., Дикарев В.П. Применение пластинок со слоем микрофракционированного силикагеля, закрепленного золем кремневой кислоты для анализа липидов // Биооргани. химия. 1984. - Т. -10. - № 2. - С. 244-250.

3. **Белозерский А.Н., Проскуряков Н.И.** Практическое руководство по биохимии растений.- М.: Красный пролетарий.- 1951.-388 с.
4. **Бемиллер Дж.Н.** Агар: Приготовление агара и агарозы; метанолиз; меркаптолиз. - В кн.: Методы химии углеводов: Пер. с англ. / Под ред. Н.К. Кочеткова - М.: Мир.- 1967. С. 314-317.
5. **Воюцкий С.С.** Курс коллоидной химии. - М.: Просвещение. 1975.- 512 с.
6. ГОСТ 5898-87 Изделия кондитерские. Методы определения кислотности и щёлочности.- М.: Изд-во «Стандарт».-1987. - 14 с.
7. ГОСТ 5900-73 Изделия кондитерские. Методы определения влаги и сухих веществ. - М.: Изд-во «Стандарт».- 1973. - 8 с.
8. ГОСТ 5903-89 Изделия кондитерские. Методы определения сахара. - М.: Изд-во «Стандарт», 1989. - 36 с.
9. ГОСТ 30004.1-93 Майонезы. Общие технические условия. - М.: Изд-во «Стандарт», 1993. - 12 с.
10. ГОСТ 26185-84 Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. - М.: Изд-во «Стандарт», 1984. - 53 с.
11. ГОСТ 16280-2002 Агар пищевой - М.: Изд-во «Стандарт».-2002. - 9 с.
12. ГОСТ 16280-2002 Агар пищевой. - М.: Издательство стандартов.- 2003.- 5 с.
13. ГОСТ 17206-96 Агар микробиологический. - М.: Издательство стандартов.-1997.- 9 с.
14. **Жуков А.В., Верещагин А.Г.** 1970. Гептадеценовая кислота как внутренний стандарт в газохроматографическом определении веса жирных кислот // Ж. Аналит. химия. - Т. 25, - № 11. - С. 2222-2227.
15. **Захарченко В.Н.** 1989. Коллоидная химия // М.: Высшая школа.- 1989. -214 с.
16. **Иванова Е. Г.** Новые полисахариды группы агара из красных водорослей Японского моря: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. - М.- 1986. - 23 с.
17. Иммуобилизованные клетки и ферменты. Методы. / Под ред. Вудворда.- М.: Мир.- 1988.- 215 с.
18. **Оводов Ю.С., Адаменко М.Н.** 1969. Предварительный анализ состава полисахаридных фракций //Химия природных соединений, - № 4.- С.203-206.
19. **Ковековдова Л.Т.** 1987.Методические рекомендации по подготовке объектов внешней среды и рыбной продукции к атомно-абсорбционному определению токсичных металлов. - Владивосток: ТИНРО. - 23 с.
20. **Кочетков Н.К., Бочков Н.Ф., Дмитриев Б.А., Усов А.И., Чижов О.С., Шibaев В.Н.** Химия углеводов. - М.: Химия.-1967.-670 с.
21. **Лоенко Ю.Н., Аргюков А.А., Козловская Э.П., Мирошниченко В.А., Еляков Г.Б. / Зостерин.** 1997. Владивосток: Дальнаука.- С. 211.

22. Методические рекомендации к контролю питательных сред по биологическим показателям/ **Андреева З.М., Бендас Л.Г., Ельчикова Е.А., Шепилова Р.Г.** Москва.-1980.- 15 с.

23. Методы химии углеводов/Пер. с англ. Под ред. **Кочеткова Н.К.** М.: Мир.- 1967.-С. 339-340.

24. Методы определения содержания альгиновой кислоты и соотношения в урановых кислот//**Подкорытова А.В., Аминина Н.М.** /Методические рекомендации. Минрыбхоз СССР.- ТИНРО.-Владивосток.- 1991.- 15 с.

25. Методические указания по определению пектиновых веществ в производстве / **Донченко Л.В., Нелина В.В., Карпович Н.С.** и др.- М.: Спектр.- 1997. – 40 с.

26. Общая органическая химия. Под ред. **Кочеткова Н.К.** - М.: Химия, 1986.-Т.11.-734 с.

27. **Оводов Ю.С.** 1970. Газожидкостная хроматография углеводов: Обзор. - Владивосток. - 120 с.

28. **Пейнтер Т.Дж.** В кн.: Методы химии углеводов/Пер. с англ. Под ред. Кочеткова Н.К. М.: Мир. – 1967. - с. 339-340.

29. **Петров К.П.** 1965. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья. М.:Пищевая промышленность.- 330 с.

30. **Подкорытова А.В., Аминина Н.М., Ковалева Е.А.** и др. 1992. Изменение сорбционной активности альгиновой кислоты при получении лечебно-профилактической продукции // Комплексное использование гидробионтов. - Известия ТИНРО.- Т. 114. - С. 146-149.

31. **Подкорытова А.В.** 2005. Морские водоросли-макрофиты и травы/М.:Изд-во ВНИРО.- 174 с.

32. **Стыскин Е.Л., Ицксон Л.Б., Брауде Е.В.** 1986. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. - М.: Химия, - 288 с.

33. **Суховеева М.В., Подкорытова А.В.** 2006. Промысловые водоросли и травы морей Дальнего Востока: биология, распространение, запасы, технология переработки. Владивосток:ТИНРО-центр, 243 с.

34. **Суховерхов С.В., Усов А.И., Подкорытова А.В., Кадникова И.А.** 1999. Хроматографическое исследование экстрактов из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis*//Биоорганическая химия.- Т.25.- №3.- С.212-217.

35. **Суховерхов С.В.** 2001. Физико-химические методы исследования полисахаридов красных водорослей. Биохимия и биотехнология гидробионтов. - Известия ТИНРО. - Т.129. - С. 154-162.

35. **Труус К.** 1994. Исследование строения и модификации агарозы из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiesis*.- Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. хим. наук. - М. -26 с.

36. **Усов А.И.** Сульфатированные полисахариды красных морских водорослей // Успехи биологической химии. - 1979. - Т. 20. - С. 169-191.

37. **Усов А.И.** 1985. Полисахариды красных морских водорослей // Прогресс химии углеводов. М.: Наука. - С. 77-96.
38. **Усов А.И.** 1999. Альгиновые кислоты и альгинаты: Методы анализа, определения состава и установления строения // Успехи химии. - Т.68.- №11. - С. 1051-1061.
39. **Усов А.И., Элашвили М.Я.** Количественное определение 3,6-ангидрогалактозы и специфических галактанов красных водорослей в условиях полного восстановительного гидролиза. Биоорганическая химия. - 1991, т.17, № 6, с. 839-848.
40. **Усов А.И., Ключкова Н.Г.** // Биоорганич. химия. 1994.- Т. 20.- С. 1236-124.
42. **Усов А.И., Смирнова Г.П., Ключкова Н.Г.** 2001. Полисахариды водорослей. Полисахаридный состав некоторых бурых водорослей Камчатки// Биоорганическая химия. - Т. 27.- С. 444-448.
42. **Хенглейн Ф.** Пектины в книге «Биохимические методы анализа растений» /Под ред. М.Н.Запрометова.- М.: Иностранная литература, 1960.-С. 280-323.
43. **Хотимченко С.В.** Липиды морских водорослей – макрофитов и трав. Структура, распределение, анализ. Владивосток: Дальнаука.- 2003. - 230 с.
44. **Чармс Ш.** 1986. Углеводы // Хроматография: Практическое приложение метода / Под ред. Э.Хефтмана. Ч. 2. - М.: Мир. - С. 5-87. Пер. с англ.
45. **Чижов О.С., Шашков А.С.** 1985. Масс-спектрометрия и ЯМР-спектроскопия в установлении структуры полисахаридов // Прогресс химии углеводов. - М.: Наука. - С. 30-54.
46. **Членов М.А.** 1991. Высокоэффективная жидкостная хроматография в разработке медицинских препаратов на основе биополимеров. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. д-ра хим. наук. - М. - 48 С.
47. **Членов М.А., Телкова Т.Н.** Определение молекулярно-массовых характеристик нейтральных полисахаридов с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии // VIII всесоюзная конференция “Химия и биохимия углеводов”. Тезисы докладов. Тбилиси, 1987.- Пушино.-1987.- С. 101.
48. **Членов М.А., Малолетнева О.Ю., Гаврилова Е.Ф., Коротаев Г.К.** 1989. Применение ВЭЖХ для анализа альгинатов // Всесоюзная конференция “Научно-технические проблемы марикультуры в стране”. Тезисы докладов. – Владивосток.- С. 216-217.
49. **Шатенштейн А.И., Вырский Ю.П., Правикова Н.А., Алиханов П.П., Жданова К.И., Изюмников А.Л.** 1964. Практическое руководство по определению молекулярных весов и молекулярно-весаового распределения полимеров. – М.: Химия.- 188 с.
50. **Шашков А.С., Усов А.И., Яроцкий С.В.** 1978. Полисахариды водорослей. XXIV. Применение спектроскопии <sup>13</sup>С-ЯМР для анализа

структуры полисахаридов группы агара // Биоорганич. химия. - Т. 4.-№ 1.- С.74-81.

51. Шелухина Н.П., Ашубаева З.Д., Аймухамедова Г.Б. Пектиновые вещества, их некоторые свойства и производные.- Фрунзе: Илим.-1970.-73 с.

52. Яроцкий С.В., Шашков А.С., Усов А.И. 1977. Анализ спектров <sup>13</sup>C-ЯМР некоторых галактанов красных водорослей // Биоорганич. химия. - Т. 3.- № 8. -С. 1135-1137.

53. Andersson B.A., Holman R.T. Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids // Lipids. 1974.- V. 9.- № 3. - P. 185-190.

54. Annison G., Cheetham N.W.H., Couperwhite J. 1983. Determination of the uronic acid composition of alginates by HPLC // J. Chromatogr. - V. 246. - P. 137-143.

55. Arakawa Y., Imanari T., Tamura Z. 1976. Determination of neutral and amino sugars in glycoproteins by gas chromatography // Chem. Pharm. Bull. - V. 24, № 9. - P. 2032-2037.

56. Bitter T., Muir H.M. The carbozol method for quantitation determination of hexuronic acid // Anal. Biochem. - 1962. - №4. - P. 330-334.

57. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can.J.Biochem.Physiol. -1959. -V. 37, - № 10. - P.911-917.

58. Carrol K.K. Quantitative estimation of peak areas in gas-liquid chromatography // Nature. -1961. -V. 191, -№4786. -P. 377-378.

59. Carreau J.P., Dubacq J.P. Adaptation of macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // J. Chromatogr. 1978. V. 151. P. 384-390.

60. Chiles T.C., Bird K.T., Koehn F.E. 1989. Influence of nitrogen availability on agar-polysaccharides from *Gracilaria verrucosa* strain G-16: structural analysis by NMR spectroscopy // J. Appl. Phycol. - V. 1. - P. 53-58.

61. Christie W.W. Equivalent chain length of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography // J. Chromatogr. 1988. -V. 447, - № 2.- P. 305-314.

62. Christie W.W. Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids // Lipids. 1998.- V. 33, - № 4.- P. 343-353.

63. Dawidson I.W., Sutherland I.W., Lawson C.J. Purification and properties of an alginate lyase from a Marine Bacterium // Biochem J. - 1976. - Vol. 159. - P. 707-713.

65. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances// Analytical chemistry. - 1956.- V. 28, №3, p.350-356.

66. Dodgson K.S. Price R.S. 1962. A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. - Biochem. - V.84, p.106.

67. **Draget K.I., Braek G.S., Smidsrod O.** Alginic acid gels – the effect of alginate chemical composition and molecular weight // Carbohydrate. Polym. 1994, V. 25, p. 31-38.

68. **Dudley P.A., Andersson R.E.** Separation of polyunsaturated fatty acids by argentation thin-layer chromatography // Lipids. 1975. -V. 10, -№ 2.- P. 113-115.

69. **Duckworth M., Yaphe W.** The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides // Carbohydr. Res. 1971. -V. 16. - P. 189-198.

70. **Elkin Yu.N.** 1979. Gas chromatographic separation of the methyl ether methyl-glycopyranoside series hexose, 6-deoxyhexose and pentose acetates // J. Chromatogr. - V.180. - P. 163-169.

71. **Ekstrom L., Kuiviner J.** 1983. Molecular weight distribution and hydrolysis behavior of carrageenans // Ibid. - V. 116. - P. 89-94.

72. **Falshaw R., Furneaux R.H.** 1994. Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigariina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta) // Carbohydr. Res. - V. 252. - P. 171-182.

73. **Falshaw R., Furneaux R.H., Pickering T.D., Stevenson D.E.** 1999. Agars from three Fijian *Gracilaria* species // Bot. Mar. - V. 42. - P. 51-59.

74. **Folch J.K., Lees M., Sloane-Stanley G.H.** A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues // J.Biol. Chem.- 1957. - V.226.- P.497-509.

75. **Fostier A.H., Kornprobst J.M., Combaut G.** 1992. Chemical composition and rheological properties of carrageenans from two Senegalese Solieriaceae *Anatheca montagnei* Schmitz and *Meristotheca senegalensis* Feldmann // Ibid. - V. 35. - P. 351-355.

76. **Furneaux R. H., Stevenson T.T., Miller I.J.** Agaroid from New Zeland of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) – a novel dimethylated agar// Hydrobiologia. 1990.-V. 204-205. P. 645-654.

77. **Garegg P.J., Lindberg B., Konradsson P., Kvanstriim I.** 1988. Hydrolysis of glycosides under reducing conditions // Carbohydr. Res. - V.176. - P. 145-148.

78. **Gasesa P., Squire A., Winterburg P.J.** The determination of the uronic acid composition of the alginates by anion exchange liquid chromatography. // Carbohydr. Res. 1983. V. 118. P. 1-8.

79. **Gerwig G.J., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F.G.** 1978. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary GLC // Ibid. - V. 62. - P. 349-357.

80. **Craigie I.S. and Leigh C.** 1978. Carrageenans and agars. In I.A.Hellebust and Craigie I.S. (eds), Handbook of Phycological Methods: Physiological and biochemical Methods. - Cambridge: Cambridge University Press.- p.109-131.

81. **Grasdalen H., Larsen B., Smidsrod O.** 1977. <sup>13</sup>C-NMR studies of alginates // Carb. Res. - № 56. - P. 11-15.

82. **Grasdalen H., Larsen B., Smidsrød O.** 1979. A PMR study of the composition and sequence of the uronic residues in alginates // *Carbohydr. Res.* V. 68. -P. 23-30.

83. **Grasdalen H., Larsen B., Smidsrød O.** 1981.  $^{13}\text{C}$ -NMR studies of monomeric composition and sequence in alginate // *Carbohydr. Res.* - V. 89.- № 2.- P. 179-191.

84. **Grasdalen H.** High-field  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy of alginates: sequential structure and linkage conformations // *Carbohydr. Res.* - 1983. - Vol. 118. - P. 255-260.

85. **Haug A.** Composition and properties of alginates. - Oslo: Norwegian Inst. of Seaweed Rept., 1964. - 123 p. Haug A., Larsen B. // *Acta Chem. Scand.*, 1961.- V.15, P.1395-1396.

86. **Haug A., Larsen B.** Quantitative determination of uronic acid composition of alginates // *Acta Chem. Scand.* - 1962. - V. 16, № 8. - P. 1908-1918.

87. **Iverson J.L., Bueno M.P.** 1981. Evaluation of high pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography for quantitative determination of sugars in foods // *J. Assoc. Anal. Chem.* - V.64.- № 1. - P. 139-143.

88. **Jankowski K., Gaudin D.** 1978. Critical examination of the use of gas chromatography mass-spectrometry in the identification of persilylated saccharides // *Biomedical Mass Spectrometry.* - V. 5, № 5. - P. 371-372.

89. **Kates M.** Techniques of lipidology: isolation, analysis and indentification of lipids//*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*/Eds. R.H. Burdon, van Knippenberg. Amsterdam: New York, Oxford: Elsevier, 1986. V. 3. pt 2. P. 326-425.

90. **Kennedy J.F., Robertson S.M., Stagey M.** G.L.C. of the O-trimethylsilyl derivatives of hexuronic acids // *Carbohydr. Res.*, 1976. V. 49, pp.243-258.

91. **Kennedy A.F.D., Sutherland I.W.** Analysis of the Bacterial exopolysaccharides // *Biotech. and App. Biochem.* - 1987. - V. 9. - P. 1219.

92. **Knutson C.A., Jeanes A.** 1968. *Anal. Biochem.*, V.24.- P.470- 482.

93. **Knutson S.H.** Isolation and analysis of red algal galactans. Dr. Sci. Thesis. University of Trondheim, Norway, 1992. - 96 p.

94. **Kramer J.K.G., Fouchar R.C., Jenkins K.J.** Differences in chromatographic properties of fused silica capillary columns, coated, crosslinked, bonded, or crosslinked and bonded with polyethylene glycols (Carbowax 20M) using complex fatty acid methyl ester mixtures // *J. Chromatogr. Sci.* 1985. V. 23. P. 54-56.

95. **Lahaye M., Yaphe W., Rochas C.** 1985.  $^{13}\text{C}$  NMR spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type // *Carbohydr. Res.* - V. 143. - P. 240-245.

96. **Lahaye M., Rochas C., Yaphe W.** 1986. A new procedure for determining the heterogeneity of agar polymers in cell walls of *Gracilaria spp.* (Gracilariaceae, Rhodophyta) // *Can. J. Bot.* - V. 64. - P. 579-585.

97. **Lazarus R., Seymour J.** 1980. HPLC determination of aldonic acids. // Anal. Biochem. - V.157. - P. 360-366.
98. **Lecacheux D., Panaras R., Brigand G., Martin G.** 1985. Molecular weight distribution of carrageenans by size exclusion chromatography and low angle laser light scattering // Carbohydr. Polym. - V. 5. - P. 423-440.
99. **Llanes F., Sauriol F., Morin F.G., Perlin A.S.** 1997. Can. J. Chem.- V.75.- P. 585.
100. **Matsuiro B., Zanlungo A.** Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides from seaweeds// Carbohydrate Res. - 1983, V.118, p.276-279.
101. **Miller I.J.** The structure of a pyruvylated carrageenan extracted from *Stenogramme interrupta* as determined by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy // Bot. Mar. - 1998.- V. 41. - P. 305-315.
102. **Miller I.J.** 1999. Further evaluation of the structure of the polysaccharide from *Plocamium costatum* with the use of set theory//Hydrobiologia.-V. 398-399. - P. 385-389.
103. **Mollion I., Andriantsiferana M., Sekkal M.** 1990. A study of the phycocolloids from *Gelidium madagascariense* and *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) collected on south coasts of Madagascar // Hydrobiologia. - V. 204-205. - P. 655-659.
104. **Murano E., Brandolin C, Zanetti F.** et al. 1990. Characterization of an agar fraction extracted from *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta) // Ibid.-V. 204/205. - P. 567-571.
105. **Perry M.B., Hulyalkar R.K.** 1965. Can. J. Biochem.- V. 43, p. 573.
106. **Pohl P., Glasl H., Wagner H.** Zur analytik pflanzlicher phospholipide und ihrer fettsauren. I. Eine neue dunnschichtchr tographische methode zur trennung pflanslicher lipoido und quant; bestmmung ihrer fettsauro-Zusammensetzung // J. Chromatogr. 1970. V. 49, №3. P. 488-492.
107. **Rees D.A.** 1969. Structure, conformations and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. - Advans. Carbohydr. Chem. Biochem.- № 24, p. 267-332.
108. **Rochas C, Lahaye M., Yaphe W.** 1986. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy // Bot. Mar. - V. 24. - P. 99-108.
109. **Russell B., Mead T.H., Polson A.** 1964. A method of preparing agarose // Biochem. Biophys. Acta.- V. 86.- P. 169.
110. **Seymour F.R., Chen E.C.M., Bishop S.H.** 1979. Identification of aldoses by use of their peracetylated aldononitrile derivatives: A GLC-MS approach // Carbohydr. Res. - V. 73. - P. 19-45.
111. **Singh S., Jacobsson S.** 1994. Kinetics of acid hydrolysis of k-carrageenan as determined by molecular weight (SEC-LALLS-RI), gel breaking strength, and viscosity measurements // Carbohydr. Polym. - V. 23. - P. 89-103.

112. **Smith D.B., Cook W.H.** 1953. Fractionation of carrageenan // *Arsh. Biochem. and Biophys.*- 45, P.232.
113. **Stevenson T.T., Furneaux R.H.** 1991. Chemical method for the analysis of sulphated galactans from red algae // *Carbohydr. Res.* - V. 210. - P. 277-298.
114. **Stockton B., Evans L.V., Morris E.R.** et al. 1980. Alginate Block Structure in *Laminaria digitata*: Implications for hold fast Attachment // *Bot. Mar.* - V. 23. - P. 563-567.
115. **Svetashev V.I., Vaskovsky V.E.** A simplified technique for chromatography of lipids // *J. Chromatogr.* 1972. V. 67, № 2, P. 376-378.
116. **Tagawa Sh.** Chemical studies on manufacture of agar-agar// *The Journal of the Shimonoski University of Fisheries*, 1968.-V.17.-№2.-P.1-52.
117. **Usov A.I., Ivanova E.G., Sashkov A.S.** 1983. Polysaccharides of algae. XXXIII. Isolation and <sup>13</sup>C-NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan sea red seaweeds // *Bot. Mar.* - V. 26. - P. 285-294.
118. **Usov A.I.** 1984. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans // *Bot. Mar.* -V. 27. - P.189-202.
119. **Usov A.I., Bilan V.I., Klochkova N.G.** 1995. *Bot. Mar.*, -V. 38.-P.43-51.
120. **Van Gent CM., Roseleur O.J., Van der Bijl P.** 1973. Detection of cerebrosides on thin-layer chromatograms with an anthrone spray reagent // *J. Chromatogr.* -V. 85, № 1. P. 174-176.
121. **Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M.** 1975. Universal reagent for phospholipid analysis//*J. Chromatogr.* - V. 114,- № 1.-P. 129-141.
122. **Vaskovsky V.E., Latyshev N.A.** 1975. Modified Jungnickel's reagent for detecting phospholipids and other phosphorus compounds on thin-layer chromatograms // *J. Chromatogr.* -V. 115, -№ 1. -P. 246-249.
123. **Yaphe W.** 1959. The determination of k-carrageenan as a factor in the classification of Rhodophyceae // *Canad.J. of Botany.*- V.37.- p.755-756.
124. **Yaphe W., Arsenault G.P.** 1965. Improved resorcinol reagent for determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides // *Analytical biochemistry.*- V.13,- p.143-148.
125. **Wagner H., Horhammer L., Wolf P.** 1961. Dunnschicht chromatographie von phosphatiden und glycolipiden // *Biochem. Z.* -Bd 334, №1. - S. 175-184.

**Качество, безопасность и методы анализа  
продуктов из гидробионтов**

**ВЫПУСК 3**

ФГУП «ВНИРО» — *А.В.Подкорытова*;  
ФГУП «ТИНРО-Центр» — *И.А.Кадникова*

**Руководство по современным методам  
исследований морских водорослей,  
трав и продуктов их переработки**

Подписано в печать 14.10.2009.  
Формат 60×84 1/16. Печ. л. 6,75.  
Тираж 50 экз. Заказ № 200

Издательство ВНИРО  
107140, Москва, Верхняя Красносельская, 17

Тел.: (499) 264-65-33  
Факс: (499) 264-91-87