

Альгиновые кислоты и альгинаты: методы анализа, определения состава и установления строения

А.И.Усов

Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук
117913 Москва, Ленинский просп., 47, факс (095) 135–5328

Рассмотрены история и современное состояние проблемы обнаружения, количественного определения и характеристики первичной структуры альгиновых кислот и их солей (альгинатов). Дано краткое описание строения и свойств этих полисахаридов. Обсуждены многочисленные аналитические приемы, включая химические, физико-химические и ферментативные методики, используемые для структурного анализа альгинатов, которые могут найти применение при исследовании других полисахаридов, содержащих остатки уроновых кислот.

Библиография — 211 ссылок.

Оглавление

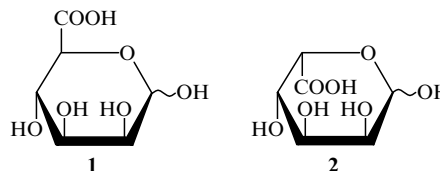
I. Введение	1051
II. Химические методы анализа альгиновых кислот	1053
III. Ферментативные и иммунологические методы анализа	1056
IV. Недеструктивные физико-химические методы анализа	1057
V. Заключение	1058

I. Введение

Альгиновые кислоты впервые были выделены более 100 лет назад из нескольких бурых водорослей Стенфордом.¹ Позже эти полисахариды были найдены во всех без исключения видах бурых водорослей, где они являются компонентами клеточной стенки и межклеточного вещества. Их содержание в биомассе может достигать 40% от сухого веса и существенно зависит от вида водоросли и условий ее произрастания.^{2–4} Способностью продуцировать альгиновые кислоты наделены также некоторые бактерии, главным образом представители родов *Azotobacter*⁵ и *Pseudomonas*.⁶ В 1982 г. довольно неожиданно альгинаты были обнаружены в одном из видов известковых красных водорослей, принадлежащем к семейству *Corallinaceae*.⁷ Наши недавние работы^{8,9} показали, что наличие альгинатов действительно является отличительным признаком представителей этого семейства. В прочих растениях эти полисахариды не найдены.

Альгиновые кислоты являются полиуронидами, т.е. полисахаридами, молекулы которых построены из остатков уроновых кислот. В составе альгиновых кислот были

найжены вначале D-маннуронозная (1),^{10,11} а затем L-гулуринозная (2)¹² кислоты.



С помощью частичного гидролиза и выделения соответствующего дисахарида было установлено, что остатки обеих уроновых кислот входят в состав одной и той же молекулы полимера.¹³ Согласно современным представлениям, основанным на многочисленных результатах метилирования,^{14,15} периодатного окисления^{16,17} и ряда физико-химических методов структурного анализа (главным образом спектроскопии ЯМР^{18–21}), молекулы альгиновых кислот линейны и построены из остатков β-D-маннуронозной и α-L-гулуринонозной кислот, находящихся в пиранозной форме и связанных 1→4-связями.

Бактериальные альгиновые кислоты отличаются от водорослевых тем, что часть их гидроксильных групп обычно ацетилирована,^{22,23} причем ацетильные группы занимают положения 2 или 3 (иногда сразу оба) в остатках D-маннуронозной кислоты.²⁴ Степень полимеризации нативных полимеров достаточно велика и число моносахаридных остатков может достигать 1000–10 000.

Альгиновые кислоты из разных источников могут различаться соотношением маннуронозной и гулуринонозной кислот (величиной M/G),²⁵ а также распределением мономерных звеньев вдоль цепи полимера. С помощью частичного гидролиза и фракционирования олигомерных продуктов было установлено, что в молекулах альгиновых кислот имеются участки, построенные практически только из остатков

А.И.Усов. Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией растительных полисахаридов ИОХ РАН.

Телефон: (095)137–6791, e-mail: usov@ioc.ac.ru

Область научных интересов: химия углеводов, выделение из природных источников и установление строения растительных полисахаридов, разработка методов структурного анализа полисахаридов морских водорослей и изучение их биологической активности.

Дата поступления 18 мая 1999 г.

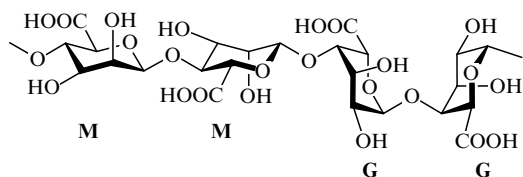


Рис. 1. Конформации моносахаридных звеньев в молекуле альгиновой кислоты.

какой-либо одной уроновой кислоты (М-блоки и G-блоки). Эти блоки разделены участками, которые содержат приблизительно равные количества обоих моносахаридов, расположенных в виде более или менее строго чередующейся последовательности (MG-блоки).^{26,27} Такое своеобразное строение является результатом ступенчатого биосинтеза молекул полисахарида, при котором вначале образуются линейные полиманнуронаны, а затем в этих полимерных предшественниках происходит эпимеризация при атоме C(5) части остатков β -D-маннурановой кислоты под действием специфического фермента — полиманнуронан-С(5)-эпимеразы, что приводит к появлению в составе полимера остатков α -L-гулурановой кислоты.²⁸

Размер и взаимное расположение отдельных блоков оказывают решающее влияние на свойства альгиновых кислот и их солей — альгинатов. Дело в том, что остатки β -D-маннурановой и α -L-гулурановой кислот при всей их структурной близости (эти остатки различаются только конфигурацией при одном из асимметрических центров, а именно при атоме C(5)) имеют противоположную конформацию пиранозного цикла (соответственно 4C_1 и 1C_4), что приводит к совершенно различной форме полимерных молекул в участках поли-М и поли-G (рис. 1). При этом в G-блоках создаются пространственные условия для прочного связывания двухвалентных катионов металлов. Более того, координация с такими катионами приводит к кооперативному связыванию друг с другом разных молекул полимера,²⁹ следствием чего является образование ионотропных гелей (рис. 2). Поэтому общее содержание остатков α -L-гулурановой кислоты (в первом приближении), а точнее, относительная длина G-блоков, служит важнейшим критерием наиболее ценного свойства альгинатов — способности к

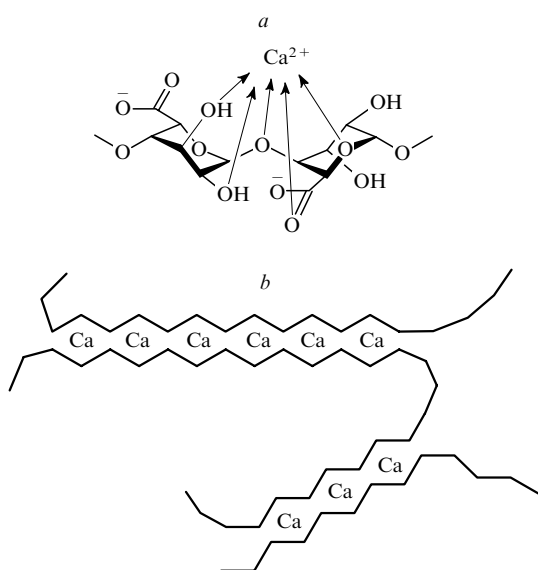


Рис. 2. Координация ионов кальция остатками α -L-гулурановой кислоты в молекуле альгината (a) и роль этих ионов в обеспечении межмолекулярных взаимодействий при гелеобразовании (b) («egg-box model»).²⁹

гелеобразованию.^{30–32} Блочный состав определяет и многие другие характеристики альгинатов, включая биологическую активность.^{33–35}

Благодаря уникальным физико-химическим свойствам альгиновые кислоты и их соли нашли широкое применение в пищевой и ряде других отраслей промышленности,^{36,37} в том числе в биотехнологии и медицине.³⁸ Это объясняет тот факт, что в большинстве имеющихся в литературе обзоров, посвященных альгиновым кислотам, содержатся главным образом сведения об их строении, механизме биосинтеза и практически ценных свойствах этих полисахаридов, однако в них сравнительно мало внимания уделяется проблемам аналитической химии альгинатов. В частности, так построен материал специального выпуска журнала *Carbohydrates in Europe*, целиком посвященного альгинатам и содержащего четыре обзорных статьи по химии и физическим свойствам альгинатов,³⁹ генетике и биосинтезу,⁴⁰ применению альгинатных гелей в биотехнологии и медицине⁴¹ и коммерческому использованию альгинатов.⁴²

Практическая ценность альгинатов привела к тому, что их производство из морских бурых водорослей является главным направлением переработки последних. Очевидно, что для оценки содержания альгиновых кислот в биомассе водорослей и для стандартизации получаемых из водорослей препаратов альгиновых кислот и различных продуктов, содержащих альгинаты, необходимы удобные аналитические методы, а для определения наиболее рациональных путей использования конкретных препаратов альгиновых кислот нужна структурная характеристика этих полисахаридов. При этом необходимо учитывать, что аналитическая химия альгинатов своеобразнее химии других полисахаридов.

Альгиновые кислоты образуют с одновалентными катионами растворимые в воде соли, но при подкислении выпадают в осадок. Альгинаты многих двухвалентных катионов, особенно Ca^{2+} , Sr^{2+} и Ba^{2+} , не растворимы в воде. На этом свойстве основано выделение альгиновых кислот из водорослей.⁴³ Вначале из биомассы экстрагируют разбавленной минеральной кислотой двухвалентные катионы и сопутствующие водорастворимые полисахариды, а затем извлекают щелочным раствором альгиновые кислоты, которые осаждают из экстракта этанолом,⁴⁴ подкислением или переводом в Ca^{2+} -соль.⁴⁵ Препаративный выход альгиновых кислот можно использовать для оценки их содержания в биомассе водоросли, однако следует иметь в виду, что разные методики выделения, в зависимости от применяемых реагентов, числа переосаждений и достигаемой степени чистоты конечного препарата, могут давать сильно расходящиеся результаты для одного и того же исходного образца водоросли. Так, специально проведенное сравнение трех весьма популярных лабораторных методик^{46–48} показало, что относительный разброс величин препаративного выхода альгинатов может достигать 20–40%.⁴⁹ При применении подобного подхода для анализа пищевых композиций, в которых пектиновые вещества могут обладать сходным с альгинатами поведением при экстракции и осаждении, возникают дополнительные ограничения.

Ряд методик определения альгиновых кислот основывается на специфических реакциях уроновых кислот. К таким реакциям относятся декарбоксилирование и деградация под действием концентрированной серной кислоты с последующим образованием окрашенных продуктов в присутствии карбазола, индола, 3-гидроксифенила и т.д. Эти методы нашли широкое применение, хотя очевидно, что присутствие в анализируемом объекте других полисахаридов, содержащих уроновые кислоты, неизбежно будет искажать результаты определения альгинатов.

Применение кислотного гидролиза альгинатов для получения мономерных уроновых кислот — достаточно сложная проблема. Гликозидные связи остатков уроновых кислот обладают повышенной устойчивостью к кислотному гидро-

лизу. Дополнительную трудность создает нерастворимость альгиновых кислот в кислой среде. При полном кислотном гидролизе альгиновых кислот происходит деструкция части мономеров, причем остатки L-гулурановой кислоты разрушаются быстрее остатков D-маннурановой кислоты, а конкретные потери каждого из мономеров зависят от их распределения по блокам в полимерной молекуле. Поэтому очень трудно подобрать универсальные условия гидролиза и ввести поправки на деструкцию мономеров, одинаково пригодные для использования этого подхода при определении состава альгинатов, сильно различающихся соотношением и расположением остатков уроновых кислот в их молекулах.

Для структурной характеристики альгиновых кислот очень большое значение приобрели неdestructивные физико-химические методы исследования, в первую очередь спектроскопия ЯМР ^1H и ^{13}C . С помощью этих методов удается не только определить соотношение мономеров в молекулах альгиновых кислот, но и охарактеризовать их распределение по отдельным блокам. Ниже все перечисленные аналитические приемы рассмотрены более подробно и проиллюстрированы, главным образом, исследованиями морских водорослей, хотя эти методики в равной степени пригодны и для характеристики бактериальных альгинатов. Дополнительную информацию можно почерпнуть из нескольких обзоров, посвященных в основном альгинатам бактериального происхождения.^{50–55}

II. Химические методы анализа альгиновых кислот

1. Методы определения альгинатов, использующие катионный обмен

При наличии достаточного количества исходного материала (содержание альгиновой кислоты в образце не менее 100 мг) альгиновые кислоты можно определять весовым методом. Из слабощелочных растворов полимерные альгинаты осаждают подкислением, а из нейтральных растворов альгината натрия полимер осаждают в виде кальциевой соли, прибавляя хлорид кальция. При высушивании осадков необходимо помнить, что альгинаты хорошо удерживают воду, а при нагревании — довольно легко разлагаются. Для работы с меньшими количествами следует предпочесть методики объемного анализа. В этом случае полисахарид также осаждают в виде кальциевой соли, осадок промывают разбавленной кислотой для удаления катионов металлов и не растворимую в этих условиях альгиновую кислоту промывают водой и титруют гидроксидом натрия по фенолфталейну (можно использовать также кондуктометрическое⁵⁶ или потенциометрическое⁵⁷ титрование). Во избежание образования вязких растворов альгината натрия при титровании применяют следующий прием: к альгиновой кислоте приливают избыток раствора ацетата кальция и титруют выделяющуюся уксусную кислоту.⁵⁸ Для определения содержания альгиновой кислоты в водорослях описана также методика, сочетающая титрование с колориметрией.⁵⁹

Альтернативная, довольно продолжительная методика количественного анализа альгинатов заключается в определении способности биомассы водорослей, содержащей альгиновую кислоту, связывать ионы кальция.⁶⁰ С этой целью навеску измельченной биомассы диализуют против разбавленной соляной кислоты для удаления катионов металлов, минеральную кислоту удаляют диализом против воды, затем альгиновую кислоту превращают в кальциевую соль диализом против раствора ацетата кальция, а избыток этого реагента удаляют повторным диализом против воды. В результате этой обработки все остатки уроновых кислот в альгинате превращаются в соли кальция, где один катион приходится на два остатка кислоты. Далее связанные ионы

кальция количественно экстрагируют с помощью очередного диализа против разбавленной соляной кислоты. Содержание кальция в диффузате определяют с помощью атомной абсорбционной спектрофотометрии и рассчитывают содержание альгината в исходной биомассе водоросли. К недостаткам этого метода следует отнести то, что другие полианионы, присутствующие в биомассе водорослей, например сульфатированные полисахариды, завышают получаемые результаты.

Будучи полианионами, молекулы альгиновых кислот дают соли с разнообразными окрашенными катионами, как неорганическими (например, с катионом двухвалентной меди⁶¹ или рутениевым красным⁶²), так и органическими (например, с катионными красителями типа метиленового голубого^{63–65}). В этом случае для количественных измерений используют убыль оптической плотности исходного окрашенного раствора при образовании труднорастворимых солей или же изменение спектральных характеристик красителя (метахромазию) при его связывании с полимером. Такой метод, отличающийся высокой чувствительностью и точностью, предложен недавно для количественного определения альгината в микрокапсулах, используемых при трансплантации клеток.⁶⁶ Методика основана на метахроматическом изменении спектра 1,9-диметилметиленового голубого в результате его взаимодействия с альгинатом. К этому же типу реакций относится осаждение полианионов в виде солей с катионными детергентами (цетавлоновое осаждение).⁶⁷ Из реагентов такого класса в применении к альгиновым кислотам наиболее подробно исследован хлорид полигексаметиленбигуанидиния.⁶⁸ Осаждение альгиновых кислот этим реагентом мало зависит от присутствия в растворе солей ($< 2.5\%$), от pH (5.5–7.6), от температуры (10–60°C) и от соотношения M/G. Измерения проводят по убыли поглощения реагента при 235 нм. И хотя данный метод рекомендован для анализа промышленных экстрактов бурых водорослей,^{69,70} необходимо помнить, что вместе с альгиновыми кислотами катионные детергенты осаждают и другие кислые полисахариды. Для колориметрического определения альгинатов и их фрагментов помимо окрашенных солей предложено получать окрашенные гидразиды реакцией с 2-нитрофенилгидразином и водорастворимым карбодиимидом,⁷¹ но этот метод не нашел пока практического применения.

2. Методы, основанные на деградации уроновых кислот

Нагревание альгинатов приводит к декарбоксилированию и выделению CO_2 .⁷² Обычно анализируемые образцы нагревают с 19%-ной HCl, а выделяющийся CO_2 поглощают и взвешивают, как при микроаналитическом определении углерода в органических соединениях сжиганием.^{73,74} Хотя эта методика рекомендована в популярном практическом руководстве по биохимическим методам исследования водорослей,⁷⁵ необходимо отметить, что ее выполнение требует специального оборудования и навыков (ср.^{76–78}). Это справедливо и для модифицированного метода декарбоксилирования, в котором образцы полисахаридов нагревают с 57%-ной HI, а выделяющийся CO_2 определяют методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ)⁷⁹ или прямым неводным титрованием.⁸⁰ Очевидно, что другие полисахариды, содержащие уроновые кислоты, будут мешать определению альгинатов.

Гораздо большее распространение приобрели методы колориметрического определения полиуронидов, основанные на кислотной деградации входящих в их состав моносакхаридов. При нагревании производных уроновых кислот с концентрированной серной кислотой главным продуктом реакции является довольно устойчивая в этих условиях 5-формилфуран-2-карбоновая кислота.⁸¹ 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,^{82,83} индол,⁸⁴ 3-гидроксифенил⁸⁵ и 3,5-диметилфенол.⁸⁶

Наряду с очевидными преимуществами (главным преимуществом является возможность работы с микроколичествами) 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,⁸⁷ сама методика анализа неоднократно подвергалась модификациям. Так, для увеличения интенсивности окрашивания и выравнивания реакционной способности различных уроновых кислот было предложено вводить в реакционную смесь добавки борной кислоты,^{88,89} а для устранения влияния нейтральных сахаров прибавлять сульфат^{90,91} или изменять температурный режим.⁹² Было показано, что проведение реакции с карбазолом в четырех различных условиях позволяет, в принципе, рассчитать состав образца, содержащего три уроновые кислоты: глюкоуроновую, галактуоновую и маннуоновую.⁹³

Влияние примесей нейтральных сахаров было оценено при разработке методики определения пектиновых веществ.^{94,95} Найдено, что при анализе пектиновых веществ и гемицеллюлоз 3,5-диметилфенол⁸⁶ и 3-гидроксифенил⁹⁶ обладают существенными преимуществами перед карбазолом.

В более поздней работе⁹⁷ предложена методика колориметрического определения полиуронидов, в том числе альгиновых кислот, в значительной мере учитывающая рекомендации всех предыдущих исследований. В качестве реагента в ней использовали 3-гидроксифенил в комбинации с борат-анионом и сульфатом. Позже мы показали, что 3,5-диметилфенол является более предпочтительным реагентом при определении альгиновых кислот.⁸ Мы модифицировали методику, рекомендованную Скоттом⁸⁶ для анализа пектинов и гемицеллюлоз, в соответствии со специфическим составом альгинатов (а именно использовали большие количества бората и более продолжительное нагревание реакционных смесей при 70°C). В этих условиях результат определения мало зависел от изменения соотношения D-маннуоновой и L-гулуоновой кислот в различных образцах альгинатов.

Проблема избирательности цветной реакции и необходимость устранения помех, связанных с наличием в анализируемом объекте нейтральных сахаров, имеет первостепенное значение для гетерополисахаридов, к которым относятся гемицеллюлозы и сложные пектины растений, мукополисахариды животных, многие полисахариды бактерий и грибов. В случае альгиновых кислот влияние нейтральных сахаров можно в принципе исключить путем предварительного удаления посторонних веществ,⁹⁸ хотя такая процедура и усложняет проведение анализа. Например, ионообменная хроматография на Дауэксе 1×2 была использована для очистки альгината, выделенного из внеклеточного материала мукоидных штаммов бактерии *Pseudomonas aeruginosa*,⁹⁹ хотя DEAE-целлюлоза или DEAE-Сефадекс являются, по-видимому, более предпочтительными для этой цели.^{100,101} При определении альгинатов в пищевых продуктах рекомендуется вначале проводить ферментативную депротеинизацию, а затем осаждать альгинат кальция. Последний тщательно отмывают от растворимых углеводов, растворяют в холодной 80%-ной серной кислоте или в

растворе гексаметафосфата натрия и определяют альгинат в полученных растворах с использованием нафторезорцина,¹⁰² фенола^{103,104} или сульфата трехвалентного железа¹⁰⁵ в концентрированной серной кислоте, избирательность которых ниже, чем 3-гидроксифенила, 3,5-диметилфенола и карбазола. Реакция с $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ успешно использовалась для изучения сезонных изменений и анатомического распределения альгинатов в некоторых видах бурых водорослей.¹⁰⁶ В несколько более сложной методике, описанной в работе¹⁰⁷, после осаждения альгината в виде Cu^{2+} -соли к нему добавляли нафторезорцин-HCl; образующийся при этом окрашенный продукт экстрагировали бутилацетатом и количественно определяли с помощью ВЭЖХ.

В большинстве описанных выше реакций для разрушения уроновых кислот использовали концентрированную серную кислоту, однако сходные результаты при определении полиуронидов можно получить и с реагентом Биала (орцин в концентрированной соляной кислоте, обычно с добавлением FeCl_3 ¹⁰⁸). В случае альгинатов реакция с орцином обладает определенными преимуществами перед реакцией с карбазолом,¹⁰⁹ хотя аналитические результаты также зависят от состава исходного полимера.¹¹⁰ Очевидно, что такая зависимость является основным недостатком и многих других 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 цепи остатков β-D-маннуоновой и α-L-гулуоновой кислот.

3. Методы, основанные на кислотном расщеплении гликозидных связей

Выше уже отмечалось, что альгиновые кислоты, как и другие полиурониды, гидролизуются с большим трудом и в довольно жестких условиях, приводящих к деградации освобождающихся моносахаридов, в первую очередь гулуоновой кислоты. В продуктах гидролиза мономерные уроновые кислоты находятся в равновесии с лактонами. Все это делает достаточно сложной проблему анализа гидролизатов альгиновых кислот. Описанная в работе¹¹¹ методика определения соотношения M/G с помощью поляриметрии суммы продуктов гидролиза альгинатов в виде бруциновых солей не нашла практического применения, так как в этом случае необходимо располагать довольно значительными количествами высокоочищенного исходного материала (посторонние углеводы сильно искажают результаты поляриметрических измерений). Поэтому в подавляющем большинстве работ анализ гидролизатов основан на предварительном разделении продуктов гидролиза.

В свое время для разделения продуктов гидролиза было предложено использовать хроматографию на бумаге, с помощью которой впервые было доказано присутствие в полимере остатков гулуоновой кислоты.¹² Затем для разделения гулуоновой, маннуоновой, галактуоновой и глюкоуроновой кислот были найдены условия электрофореза на бумаге.¹¹² Однако эти методы более пригодны для качественного, чем для количественного анализа гидролизатов. Позже для обнаружения продуктов деполимеризации альгиновых кислот была применена хроматография в тонком слое силикагеля (ТСХ). Этот метод особенно удобен для обнаружения небольших количеств альгината в пиве^{113–115} и других пищевых продуктах, причем вместо гидролиза предпочтительно использовать кислотный метанолиз. Так, с помощью ТСХ продуктов метанолиза удается надежно отличать альгинаты от других пищевых полисахаридов, содержащих уроновые кислоты.^{116,117} Высокоэффективная ТСХ была

применена при изучении пути биосинтеза альгината у *Pseudomonas aeruginosa*.¹¹⁸

Для количественного определения уроновых кислот в гидролизатах и, следовательно, для расчета величины М/Г была разработана ионообменная хроматография.^{110, 119} Условия гидролиза, предложенные авторами работ^{110, 119}, почти без изменения использовали во многих последующих работах: альгинат обрабатывали вначале 80%-ной серной кислотой при 0°C, полученную смесь выдерживали 18 ч при 20°C, после чего приливали воду до концентрации кислоты 1 моль · л⁻¹ и нагревали 5 ч при 100°C. После охлаждения гидролизат нейтрализовали карбонатом кальция, подщелачивали до pH 8 и выдерживали 30 мин для раскрытия лактонов, после чего хроматографировали на колонке с Дауэксом-1 в ацетатной форме при промывании линейным градиентом уксусной кислоты (от 0.5 до 2 моль · л⁻¹). При этом гулууроновая кислота элюировалась с колонки раньше маннууроновой. Уроновые кислоты во фракциях определяли по реакции с орцином и найденное соотношение М/Г умножали на 0.66, чтобы скорректировать потери гулууроновой кислоты за счет ее преимущественной деградации в условиях гидролиза. С помощью этой методики были охарактеризованы (определена величина М/Г) альгинаты, выделенные из большого числа видов водорослей.²⁵

Более поздние усовершенствования этого подхода связаны в некоторой степени с отработкой условий гидролиза¹²⁰ и уточнением поправочных коэффициентов.¹²¹ В частности, для уменьшения деградации мономерных уроновых кислот было предложено использовать 88%-ную муравьиную кислоту вместо серной.²² Однако главные успехи связаны с разработкой новой техники разделения и определения продуктов гидролиза. Так, для ионообменного разделения уроновых кислот стали широко использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию,^{122–128} а определение этих веществ в элюате было предложено проводить по собственному поглощению при 210 нм,¹²⁷ с помощью рефрактометрического¹²⁴ или импульсного амперометрического детектора,¹²⁵ а также по реакции с цианацетамидом,¹²⁶ которая позволяет выполнять количественные измерения спектрофотометрическим или спектрофлуориметрическим¹²⁹ методами.

Новая техника разделения резко ускорила и упростила проведение анализа, но, естественно, не смогла устранить искажения, вносимые на стадии гидролиза альгинатов. Для анализа реальных образцов альгиновых кислот, выделяемых из разных видов бурых водорослей, наибольшей популярностью пользуется методика, предложенная в работе¹²⁷, где ионообменная хроматография проводится в изократическом режиме, а для построения выходной кривой применяется ультрафиолетовый детектор.

Другим широко распространенным методом количественного определения продуктов гидролиза альгиновых кислот является ГЖХ. В этом случае необходимы дополнительные химические превращения уроновых кислот в летучие производные. Продукты гидролиза представляют собой обычно смесь уроновых кислот с их лактонами. Если вместо гидролиза применять метанолиз, то также образуется многокомпонентная смесь метиловых эфиров метилгликозидов. Анализ таких смесей в виде, например, триметилсилилпроизводных представляет собой достаточно сложную задачу,^{130–132} и получаемые результаты не вполне годятся для количественных измерений.

Для упрощения состава разделяемых смесей было предложено переводить уроновые кислоты в лактоны альдоновых кислот (восстановлением альдегидных групп и последующей лактонизацией)^{133, 134} или в полиолы (более глубоким восстановлением) с последующим хроматографическим разделением в виде ацетатов.^{134–136} В последнем случае для того, чтобы отличить производные уроновых кислот от продуктов восстановления нейтральных моносахаридов, применяют

несколько подходов. Например, отделяют уроновые кислоты обработкой гидролизата ионообменной смолой перед стадией восстановления¹³⁶ или используют бордеитерид натрия для восстановления и хромато-масс-спектрометрию для идентификации продуктов.¹³⁷ Предложено также разделять гидролизат на две части, в одной из которых нейтральные сахара переводят в ацетаты альдононитрилов (уроновые кислоты при этом разрушаются), а другую часть используют для полного восстановления; сравнение аналитических данных позволяет затем рассчитать содержание и нейтральных моносахаридов, и уроновых кислот.¹³⁸ Нейтральные сахара и уроновые кислоты можно определять и одновременно, если переводить первые в ацетаты полиолов, а вторые (через лактоны альдоновых кислот) — в ацетаты *N*-пропилальдонамидов.¹³⁹

Обойти трудности, связанные с гидролизом альгиновых кислот, пытались также путем восстановления карбоксильных групп в молекуле полимера. Такое восстановление требует либо предварительной этерификации этих групп,^{140, 141} либо их активации водорастворимым карбодимидом с последующей обработкой боргидридом натрия при контролируемых значениях pH.¹⁴² Методика с восстановлением для определения состава альгиновых кислот была предложена в 1981 г.,¹⁴³ однако затем при изучении препаративного восстановления альгиновых кислот с помощью водорастворимого карбодимида было показано, что эту реакцию не удается провести полностью.^{144, 145} Так, в присутствии избытка карбодимида наблюдались сильная деструкция исходного полисахарида¹⁴⁴ и предпочтительное восстановление карбоксильных групп остатков *L*-гулууронозой кислоты,¹⁴⁵ а при его недостатке происходило предпочтительное восстановление карбоксильных групп *D*-маннууронозой кислоты.¹⁴⁴

Позже сравнению различных методов восстановления карбоксильных групп в полимерах, содержащих уроновые кислоты, было посвящено специальное исследование¹⁴⁶. Наилучшей признана методика, в которой карбоксильные группы уроновых кислот активируют мето-*n*-толуолсульфонатом 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимида в 8 М мочеvine,¹⁴⁷ хотя и в этом случае при последующей обработке боргидридом натрия происходит лишь частичное восстановление карбоксильных групп, кроме того с полисахаридами, дающими вязкие растворы, результаты плохо воспроизводятся. Мы упростили методику восстановления,⁸ используя для этерификации продолжительную обработку альгинатов так называемым «магическим метанолом»¹⁴⁰ (смесью метанола, хлороформа и концентрированной HCl в соотношении 10 : 1 : 1) и восстанавливая образующийся эфир большим избытком боргидрида натрия в концентрированном имидазольном буфере pH 7.0 при 0°C по аналогии с методом, предложенным для определения этерифицированных остатков галактууронозой кислоты в пектинах.¹⁴⁸ Продукты гидролиза восстановленных полисахаридов переводили в ацетаты альдононитрилов и исследовали методом ГЖХ. При этом на хроматограммах обнаруживались два пика производных гулозы (ацетаты 1,6-ангидро-β-*L*-гулозы и *L*-гулононитрила) и пик ацетилированного *D*-маннононитрила. Несмотря на неполную этерификацию и, следовательно, неполное восстановление, величины М/Г, рассчитанные из площадей пиков соответствующих производных маннозы и гулозы, совпадали с данными, полученными из спектров ЯМР ¹³C.

Предложенная в работе¹⁴⁹ процедура определения величин М/Г с помощью восстановления карбоксильных групп с последующим метилированием, восстановительным расщеплением полимера под действием триэтилсилана в присутствии триметилсилилметансульфоната и эфира трехфтористого бора и определением образующихся ангидроальдитолов в виде подходящих производных методами ВЭЖХ

или ГЖХ представляется слишком сложной для рутинного анализа альгиновых кислот.

4. Частичный гидролиз для определения блочного состава

Как было упомянуто во Введении, физико-химические свойства альгинатов определяются в значительной степени характером распределения остатков двух уроновых кислот вдоль цепи полимера. В качестве химического подхода для характеристики этого распределения был использован частичный кислотный гидролиз.^{26,27} При кратковременном нагревании суспензии альгиновых кислот в разбавленных минеральных кислотах (20 мин, 100°C, 0.3 М HCl) в раствор переходит фракция олигомеров со средней степенью полимеризации ~ 20, состоящая из приблизительно равных количеств остатков обеих уроновых кислот (MG-блоки). Нерастворившийся остаток после дополнительного нагревания в течение 20 ч с кислотой удастся разделить на две фракции, растворимую и нерастворимую при pH 2.85. Эти фракции также представляют собой олигомеры со средней степенью полимеризации ~ 20, но первая из них состоит практически только из М-блоков (содержание маннуроновой кислоты более 90%), а вторая — из G-блоков (содержание маннуроновой кислоты менее 10%). Определение выходов всех трех фракций дает, таким образом, картину распределения остатков уроновых кислот в линейной цепи альгината. С помощью частичного гидролиза было впервые установлено, что альгинаты разного происхождения действительно могут резко различаться по блочному составу.¹⁵⁰ Позже аналогичный прием неоднократно применялся для характеристики различных альгинатов (см., например,¹⁵¹).

В работе¹⁸ описана упрощенная методика анализа блочного состава альгинатов. Авторы вместо двухстадийного гидролиза предложили проводить однократную обработку альгината кислотой (5 ч, 100°C, 0.3 М HCl) и определять выходы растворимой и нерастворимой фракций колориметрически по реакции с фенолом и концентрированной серной кислотой, а вместо разделения нерастворимой фракции на блоки разного состава анализировали ее спектр ЯМР ¹H, полученный для раствора в D₂O при 80°C. В слабopольном участке этого спектра имеются синглет Н(1) остатка М при τ 5.34 м.д. (пик В), дублет Н(1) остатка G при τ 4.96 м.д. (пик А) и синглет Н(5) остатка G при τ 5.56 м.д. (пик С). Отношение интегральных интенсивностей сигналов В/А или В/С (эти величины можно усреднить) и выход растворимой фракции позволяют рассчитать блочный состав исходного полисахарида.

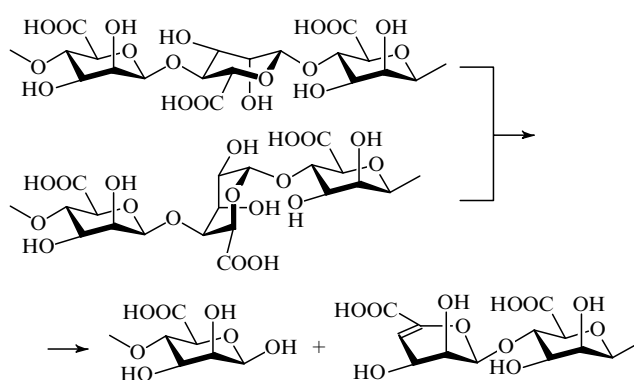
Другим усовершенствованием методики частичного гидролиза является применение ионообменной и гель-проникающей хроматографии для разделения олигомерных продуктов.^{152,153} С помощью этого подхода на примере нескольких коммерческих альгинатов было показано, что размеры М-блоков колеблются в пределах 3–10, G-блоков — в пределах 4–15 моносахаридных остатков, а распределение мономеров в MG-блоках носит случайный характер.¹⁵²

Для разделения и количественного определения олигоманнуроновых и олигогулуруновых кислот со степенями полимеризации 2–9, получаемых при частичном гидролизе альгинатов,¹⁵⁴ предложено использовать электрофорез в полиакриламидном геле.¹⁵⁵ Чтобы повысить электрофоретическую подвижность и чувствительность обнаружения олигосахаридов, в их молекулы предварительно вводили флуоресцентную метку реакцией восстановительного аминирования с 8-аминонафталин-1,3,6-трисульфокислотой.

III. Ферментативные и иммунологические методы анализа

Все известные ферменты, расщепляющие молекулы альгинатов, являются лиазами, т.е. они катализируют не гидролиз гликозидных связей, а β-элиминирование заместителя из положения 4 остатка уроновой кислоты.^{156–158} В результате такого расщепления на вновь образующемся конце одного из фрагментов появляется остаток 4,5-ненасыщенной уроновой кислоты (схема 1), предшественниками которой могут быть остатки как β-D-маннуроновой, так и α-L-гулуруновой кислот. Этот остаток имеет интенсивную полосу поглощения в области 230–240 нм, что может служить удобным методом определения ферментативной активности альгинатлиаз по возрастанию оптической плотности раствора при 230 нм.¹⁵⁹ Конечным продуктом ферментативного действия альгинатлиаз на полимерные молекулы альгиновых кислот является обычно смесь олигомеров с низкими степенями полимеризации.¹⁶⁰

Схема 1



Альгинатлиазы найдены во многих организмах, например в морских моллюсках, иглокожих, бактериях и грибах.¹⁶¹ Наиболее удобными источниками для их получения служат брюхоногие моллюски¹⁶² и бактерии.^{163–165} Альгинатлиазы различного происхождения существенно различаются по своей стабильности,¹⁶⁶ специфичности^{167–169} и способности расщеплять ацетилированные бактериальные альгинаты.^{170,171} Так, М-лиазы (полиманнуронатлиазы), обычно выделяемые из моллюсков, являются эндоферментами, легко расщепляющими М- и MG-блоки, но не затрагивающими G-блоки.^{172,173} Напротив, G-лиазы (полигулуруонатлиазы) расщепляют G- и MG-блоки, но инертны к М-блокам.¹⁶² Для демонстрации субстратной специфичности альгинатлиаз можно воспользоваться предложенным недавно простым методом деполимеризации альгинатов на агаровых пластинках в присутствии хлорида кальция¹⁷⁴ или гомополимерными субстратами, содержащими концевую флуоресцентную метку.¹⁷⁵

Для количественного определения разнообразных альгиновых кислот была предложена весьма удобная и универсальная методика, учитывающая особенности специфичности альгинатлиаз и пригодная для обнаружения и анализа альгинатов в растворах в области концентраций 0.01–1 мг·мл⁻¹ (см.¹⁷⁶). С этой целью исследуемый материал обрабатывали смесью двух ферментов различного происхождения, а именно смесью поли-М-лиазы, выделенной из моллюска *Haliotis tuberculata*, и поли-G-лиазы, выделенной из бактерии *Klebsiella pneumoniae*, и измеряли поглощение продуктов реакции при 230 нм. В опытах с избытком ферментов было показано, что достигаемые конечные величины оптической плотности пропорциональны начальной концентрации субстрата. Комбинация двух ферментов позволяет исключить влияние переменного состава различных альгинатов. В то же время при раздельном применении эти ферменты могут дать информацию о типе

блочной структуры альгината. Этот метод анализа, разработанный сравнительно недавно, явно имеет большое будущее, особенно если станут доступными коммерческие препараты альгинатлиаз.

Альгинатлиазы известной специфичности используются также для получения сведений о распределении остатков уроновых кислот и размерах отдельных блоков в молекулах альгинатов. Именно с помощью бактериальных ферментов было впервые установлено, что последовательность уроновых кислот в поли-MG отличается от строгого чередования.^{160, 177} В нескольких альгинатах были обнаружены блоки поли-M, однородные по размеру, со средней степенью полимеризации 24,¹⁶⁰ однако позже на других объектах была показана более пестрая картина распределения по размерам блоков поли-G и поли-M.^{178, 179}

Наиболее тщательно исследована специфичность действия фермента из морского моллюска *Haliotis tuberculata*. Для этого были специально усовершенствованы методики высокоэффективной жидкостной хроматографии для разделения насыщенных и ненасыщенных олигогулуронатов и олигоманнуронатов, образующихся в результате ферментативного расщепления альгинатов,¹⁸⁰ и методики определения строения этих олигосахаридов с помощью спектроскопии ЯМР.¹⁸¹ Установлено, что данный фермент расщепляет связи M–M и G–M, но не действует на связи G–G и M–G, а связыванию в активном центре фермента наилучшим образом соответствует пентамер маннуриновой кислоты.

В аналогичном исследовании рекомбинантного бактериального фермента¹⁸² было показано, что он способен расщеплять только связи M–M, причем характерное для бактериальных альгинатов наличие ацетильных групп в остатках маннуриновой кислоты блокирует действие фермента. Этот фермент предложено использовать для препаративного получения блоков поли-M из ацетилированного полиманнуроната бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, а также блоков поли-MG из другого бактериального альгината, содержащего остатки обеих уроновых кислот.¹⁸³

Альгинаты обладают антигенной активностью. Известно несколько попыток получить антитела к определенным структурным фрагментам молекул альгинатов и использовать эти антитела для анализа альгинатов с помощью стандартных иммунологических приемов.¹⁸⁴ Против альгинатов были получены как поликлональные,^{185, 186} так и моноклональные¹⁸⁷ антитела, которые использовались для локализации полисахарида в отдельных участках водорослевых тканей, однако данный процесс осложнялся гелеобразованием. Учитывая, что гелеобразование снижает способность соответствующих участков молекул альгината связываться с антителами, а условия реакции, такие как pH, температура, доступность ионов Ca^{2+} и природа других компонентов буфера, оказывают существенное влияние на результаты иммунологического анализа,¹⁸⁸ можно заключить, что эти эксперименты еще далеки от завершения: и иммунологическое поведение альгинатов, и специфичность соответствующих антител нуждаются в дополнительном изучении.

IV. Недеструктивные физико-химические методы анализа

1. ИК-спектроскопия

Общее содержание полимеров, состоящих из уроновых кислот, можно определить по интенсивности полосы поглощения ионизованного карбоксила при 1607 см^{-1} в ИК-спектре раствора образца в D_2O -фосфатном буфере.¹⁸⁹ Величину M/G в альгинатах предложено полуколичественно оценивать, измеряя соотношение интенсивностей полос поглощения при 808 (M) и $787\text{ см}^{-1}\text{ (G)}$ в ИК-спектрах

специально приготовленных пленок.¹⁹⁰ Для той же цели можно сравнивать интенсивности полос при 1320 (M) и $1290\text{ см}^{-1}\text{ (G)}$.¹⁹¹ Однако из-за невысокой точности и возможных многочисленных помех оба метода не нашли широкого применения. Вместе с тем ИК-спектры дают ценную информацию о наличии в бактериальных альгинатах ацетильных групп,^{22, 99, 101} характеризующихся интенсивными полосами поглощения при 1250 и 1730 см^{-1} .

Недавно для определения содержания альгинатов в биомассе бурых водорослей было предложено использовать спектроскопию в ближней ИК-области ($400\text{--}2500\text{ нм}$).¹⁹² Спектры отражения, регистрируемые для образцов измельченной биомассы, подвергаются компьютерной обработке по девяти параметрам. Получаемый калибровочный график позволяет с высокой точностью определять содержание альгината в исходном материале. Метод был успешно использован для характеристики процесса биodeградации водоросли *Laminaria hyperborea*, причем содержание альгината в исследованных образцах колебалось от 2.2 до 40.8%. Авторы¹⁹² высоко оценивают простоту и надежность данного метода, хотя для такого анализа требуется специальный спектрофотометр. Отмечено также, что помехи в определении альгината могут быть связаны с переменным содержанием влаги и полифенолов в анализируемых образцах.

2. Круговой дихроизм

Три типа блоков, присутствующие в молекулах альгинатов, обладают существенно различными спектрами кругового дихроизма (КД): если спектр поли-G целиком расположен в области отрицательных значений молярной эллиптичности $[\theta]$, то спектр поли-M имеет интенсивную положительную полосу, а спектр поли-MG характеризуется промежуточными значениями $[\theta]$.^{193, 194} Спектры КД природных альгинатов имеют пик при 200 нм и впадину при 215 нм . Было показано, что соотношение высоты этого пика к глубине впадины связано довольно простой зависимостью с соотношением M/G.¹⁹⁵ Тем самым, по спектрам КД можно определять этот важный параметр, располагая даже миллиграммовыми количествами альгината и не прибегая к деструкции полимера.

Поскольку смешанные блоки (поли-MG) имеют спектры КД, не идентичные спектрам эквимольных смесей поли-M и поли-G, в принципе возможна оценка блочного состава альгината по спектру КД. Для этой цели предложен сравнительно несложный компьютерный расчет, моделирующий реальный спектр путем линейной комбинации трех типов спектров, характерных для изолированных блоков.¹⁹⁵ Несмотря на то, что вид спектра КД поли-MG зависит от распределения остатков уроновых кислот внутри этого блока, которое не учитывается в методике расчета, результаты, полученные для известных образцов альгинатов, показали хорошее совпадение с данными, найденными ранее при частичном гидролизе или из спектров ЯМР. Спектры КД были впоследствии использованы для характеристики блочного состава альгинатов, выделенных из многих видов бурых водорослей или из разных типов водорослевых тканей.^{47, 196, 197}

3. Спектроскопия ЯМР ^{13}C

Предварительное сообщение об интерпретации спектров ЯМР ^{13}C альгинатов появилось в 1977 г.²⁰ Авторы обнаружили, что в области резонанса аномерных атомов углерода спектры альгинатов, полученные с помощью спектрометра на 25 МГц , содержат не два (как можно было бы ожидать для полисахарида, построенного из остатков двух уроновых кислот), а четыре сигнала. Это означало, что положение сигналов атомов $\text{C}(1)$ обоих моносахаридов (как M, 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 M 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 M . Было установлено, что центральная линия этого сигнала отвечает центральным остаткам M 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 $F_{MMM} + F_{GMM} = F_{MM}$ и $F_{GMG} + F_{MMG} = F_{MG}$. Расчетные данные для нескольких альгинатов хорошо совпали с результатами химического анализа. В то же время провести аналогичную оценку содержания триплетов с центральным остатком G в этой пионерской работе не удалось.

В последующей подробной работе²¹ тех же авторов с помощью более высокоразрешающего спектрометра ЯМР на 50 МГц и тщательного подбора условий съемки удалось получить 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 $C(4)$ и $C(5)$ остатка M , также имеющих мультиплетную форму, и из сравнения расчетных данных с результатами химического определения. По содержанию триплетов можно рассчитать среднюю длину гомополимерных блоков: $N_{G > 1} = (F_G - F_{GMM})/F_{GGM}$ и $N_{M > 1} = (F_M - F_{GMG})/F_{GMM}$.

Интересно отметить, что 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- $C(5)$ -эпимеразы.^{198, 199}

Спектроскопия ЯМР ^{13}C является чрезвычайно удобным методом структурной характеристики альгинатов, выделенных из различных природных источников (см., например,^{8, 9, 200}) или модифицированных с помощью ферментативной обработки.²⁰¹ Этот прием был использован также для контроля за процессом биосинтеза альгината у бактерий.²⁰² В то же время, как показали последние работы^{49, 203}, надежность определения блочного состава в известной степени зависит от величины M/G исследуемого образца. Более точные результаты получаются для альгинатов с высоким содержанием одного из мономеров; если же величина M/G близка к единице, то значения длины отдельных блоков, рассчитанные из спектров, могут заметно расходиться с данными, полученными в результате химического или ферментативного гидролиза.

Спектры ЯМР ^{13}C получены не только для растворов, но и для твердых образцов альгинатов.²⁰⁴ В последнем случае разрешение пиков существенно хуже, особенно для сигналов аномерных атомов углерода. Тем не менее в работе²⁰⁴

сложную спектральную кривую удалось представить как сумму отдельных симметричных сигналов, относящихся к атомам $C(2)$ – $C(5)$ остатков обеих уруновых кислот, что позволило с достаточной точностью оценить величину M/G .

4. Спектроскопия ЯМР 1H

Спектры ЯМР 1H альгинатов были изучены параллельно со спектрами ЯМР ^{13}C в надежде разработать более чувствительный и точный метод определения содержания мономеров и блочного состава. Показано,¹⁹ что вполне удовлетворительные спектры альгинатов, подвергнутых кратковременной мягкой кислотной обработке, снижающей вязкость растворов, можно получить, используя спектрометр на 100 МГц. И хотя в получаемых спектрах не удалось добиться разрешения всех сигналов, тем не менее в слабом поле были выявлены три пика — A ($H(1)$ остатка G), B (сумма $H(1)$ остатка M и $H(5)$ остатка MG) и C ($H(5)$ остатка GG), интенсивности которых позволили рассчитать величины $F_G = I_A/(I_B + I_C)$ и $F_{GG} = I_C/(I_B + I_C)$. Учитывая, что $F_G + F_M = 1$, $F_{GG} + F_{GM} = F_G$ и $F_{MM} + F_{MG} = F_M$ (а для достаточно длинных цепей $F_{MG} = F_{GM}$), можно рассчитать величину M/G и содержание четырех возможных пар мономеров в молекулах альгинатов. Результаты, полученные для хорошо известных образцов, совпали с данными химических методов анализа и спектроскопии ЯМР ^{13}C .

В продолжение этих исследований были изучены спектры ЯМР 1H альгинатов и их фракций, снятые при 400 МГц.²⁰⁵ Как и в описанной выше работе¹⁹, по спектрам ЯМР 1H удалось рассчитать величины M/G и вклады димерных последовательностей MM , $MG = GM$ и GG . В дополнение к этому более высокое разрешение позволило выделить четыре сигнала, соответствующие атому $H(5)$ центрального остатка α - L -гулуруновой кислоты во всех четырех возможных триадах: GGG , MGG , GGM и MGM . Данные о содержании этих тримеров хорошо коррелировали с величинами, полученными при использовании других методов анализа.

Протонные спектры поли- M и поли- G компонентов бактериального альгината, продуцируемого *Azotobacter vinelandii*, были позже проанализированы с помощью как одномерной, так и более современной двумерной техники ЯМР.^{206, 207} Однозначное отнесение сигналов было выполнено с применением теории химических сдвигов, анализа констант спин-спиновой взаимодействия и измерений ядерных эффектов Оверхаузера. Эти данные были использованы для изучения взаимодействия блоков поли- M и поли- G с ионами Ca^{2+} в водной среде. Предложена модель связывания ионов кальция, основанная на измерении относительной интенсивности кросс-пиков в двумерных спектрах NOESY свободного полимера и его кальциевой соли. Полученные результаты важны для объяснения гелеобразующих свойств альгинатов в присутствии ионов кальция и для выявления роли кальция как необходимого кофактора для работы полиманнуронан- $C(5)$ -эпимеразы.

Спектроскопия ЯМР 1H высокого разрешения была эффективно использована для характеристики многих природных альгинатов, как водорослевых,^{196, 208} так и бактериальных,^{209, 210} в том числе для определения степени ацетилирования и локализации ацетильных групп в альгинатах бактерий.²⁴ Отмечено, впрочем,²⁰⁴ что частичный гидролиз, традиционно применяемый для снижения вязкости растворов высокомолекулярных альгинатов перед съемкой протонных спектров ЯМР, может приводить к выпадению в осадок части альгината и тем самым существенно искажать получаемые результаты (величины M/G).

V. Заключение

Как следует из приведенного обзора литературы, аналитическая химия альгиновых кислот разработана весьма осно-

вательно. Предложены многочисленные подходы для решения аналитических задач разной степени сложности от количественного определения альгинатов в смесях с другими природными соединениями до анализа последовательности уоновых кислот в линейных молекулах этих полисахаридов.

Альгиновые кислоты отличаются от прочих природных полиуронидов тем, что состоят из уникальных моносахаридов и имеют своеобразное распределение мономеров вдоль полимерной цепи. Для выяснения этих структурных особенностей были разработаны специальные подходы, из которых наиболее эффективны частичный кислотный гидролиз, ферментативное расщепление и ряд неdestructивных физико-химических методов, в первую очередь спектроскопия ЯМР. Полученные сведения позволили сформулировать концепцию блочной первичной структуры и получить представление о путях биосинтеза, приводящих к такой структуре. Кроме теоретического значения, эти результаты имеют большую практическую ценность, поскольку позволяют целенаправленно изменять физико-химические свойства альгинатов с помощью ферментативной обработки.^{201,211} В то же время нужно иметь в виду, что конкретные аналитические методики разрабатывались для решения вполне определенных задач и имеют ограничения, на которые указывалось в обзоре. Углубление знаний о структуре и свойствах альгинатов, по всей вероятности, потребует дальнейшего усовершенствования методов структурного анализа этих полисахаридов.

Значение аналитической химии альгинатов выходит за рамки этого класса биополимеров. Поскольку полисахариды, содержащие уоновые кислоты, широко распространены в природе, многие химические методы обнаружения и количественного определения альгинатов, особенно приемы, основанные на специфической деградации уоновых кислот или на хроматографии кислотных гидролизатов, в равной степени можно использовать для анализа растительных слизей, пектиновых веществ, гемицеллюлоз, полисахаридов бактерий и грибов, а также гликуроногликанов животных тканей.

Литература

1. E.C.C.Stanford. *J. Chem. Soc.*, **44**, 943 (1883)
2. E.Percival, R.H.McDowell. *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*. Academic Press, London, 1967. P. 99
3. E.Percival, R.H.McDowell. In *Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. 13B*. (Eds W.Tanner, F.A.Loewus). Springer-Verlag, Berlin, 1981. P. 277
4. T.J.Painter. In *The Polysaccharides. Vol. 2*. (Ed. G.O.Aspinall). Academic Press, New York, 1983. P. 195
5. P.A.J.Gorin, J.F.T.Spencer. *Can. J. Chem.*, **44**, 993 (1966)
6. A.Linker, R.S.Jones. *Nature (London)*, **204**, 187 (1964)
7. M.Okazaki, K.Furuya, K.Tsukayama, K.Nisizawa. *Bot. Mar.*, **25**, 123 (1982)
8. A.I.Usov, M.I.Bilan, N.G.Klochkova. *Bot. Mar.*, **38**, 43 (1995)
9. А.И.Усов, М.И.Билан. *Биоорг. химия*, **22**, 126 (1996)
10. W.L.Nelson, L.H.Cretcher. *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 1914 (1929)
11. W.L.Nelson, L.H.Cretcher. *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 2130 (1930)
12. F.G.Fischer, H.Dorfel. *Z. Physiol. Chem.*, **302**, 186 (1955)
13. E.L.Hirst, E.Percival, J.K.Wold. *J. Chem. Soc.*, 1493 (1964)
14. E.L.Hirst, D.A.Rees. *J. Chem. Soc.*, 1182 (1965)
15. D.A.Rees, J.W.B.Samuel. *J. Chem. Soc. C*, 2295 (1967)
16. T.J.Painter, B.Larsen. *Acta Chem. Scand.*, **24**, 813 (1970)
17. T.J.Painter, B.Larsen. *Acta Chem. Scand.*, **27**, 1957 (1973)
18. A.Penman, G.R.Sanderson. *Carbohydr. Res.*, **25**, 273 (1972)
19. H.Grasdalen, B.Larsen, O.Smidsrod. *Carbohydr. Res.*, **68**, 23 (1979)
20. H.Grasdalen, B.Larsen, O.Smidsrod. *Carbohydr. Res.*, **56**, C11 (1977)
21. H.Grasdalen, B.Larsen, O.Smidsrod. *Carbohydr. Res.*, **89**, 179 (1981)
22. A.Linker, R.S.Jones. *J. Biol. Chem.*, **241**, 3845 (1966)
23. L.R.Evans, A.Linker. *J. Bacteriol.*, **116**, 915 (1973)
24. G.Skjak-Braek, H.Grasdalen, B.Larsen. *Carbohydr. Res.*, **154**, 239 (1986)
25. A.Haug. *Composition and Properties of Alginates. Rep. 30*. Norwegian Institute of Seaweed Research, Trondheim, 1964. P. 1
26. A.Haug, B.Larsen, O.Smidsrod. *Acta Chem. Scand.*, **20**, 183 (1966)
27. A.Haug, B.Larsen, O.Smidsrod. *Acta Chem. Scand.*, **21**, 691 (1967)
28. G.Skjak-Braek. *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 27 (1992)
29. D.A.Rees, E.J.Welsh. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **16**, 214 (1977)
30. B.T.Stokke, O.Smidsrod, P.Bruheim, G.Skjak-Braek. *Macromolecules*, **24**, 4637 (1991)
31. B.T.Stokke, O.Smidsrod, F.Zanetti, W.Strand, G.Skjak-Braek. *Carbohydr. Polym.*, **21**, 39 (1993)
32. K.I.Draget, G.Skjak-Braek, O.Smidsrod. *Carbohydr. Polym.*, **25**, 31 (1994)
33. M.Fujihara, T.Nagumo. *Carbohydr. Res.*, **224**, 343 (1992)
34. M.Fujihara, T.Nagumo. *Carbohydr. Res.*, **243**, 211 (1992)
35. T.Suzuki, K.Nakai, Y.Yoshie, T.Shirai, T.Hirano. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 545 (1993); *Chem. Abstr.*, **119**, 94363 (1993)
36. W.H.McNeely, D.J.Pettitt. In *Industrial Gums, Polysaccharides and Their Derivatives*. (Ed. R.L.Whistler). Academic Press, New York, 1973. P. 49
37. K.Clare. In *Industrial Gums, Polysaccharides and Their Derivatives*. (Eds R.L.Whistler, J.N.BeMiller). Academic Press, New York; San Diego, 1993. P. 105
38. G.Skjak-Braek, A.Martinsen. In *Seaweed Resources in Europe, Uses and Potential*. (Eds M.D.Guiry, G.Blunden). Wiley, New York, 1991. P. 219
39. O.Smidsrod, K.I.Draget. *Carbohydr. Eur.*, (14), 6 (1996)
40. S.Valla, H.Ertesvag, G.Skjak-Braek. *Carbohydr. Eur.*, (14), 14 (1996)
41. G.Skjak-Braek, T.Espevik. *Carbohydr. Eur.*, (14), 19 (1996)
42. E.Onsoyen. *Carbohydr. Eur.*, (14), 26 (1996)
43. V.J.Chapman, D.J.Chapman. *Seaweeds and Their Uses*. Chapman and Hall, London; New York, 1980. P. 194
44. А.Хайг. В кн. *Методы химии углеводов*. (Пер. с англ.). Мир, Москва, 1967. С. 317
45. D.W.Drummond, E.L.Hirst, E.Percival. *J. Chem. Soc.*, 1208 (1962)
46. K.G.Rosell, L.M.Srivastava. *Can. J. Bot.*, **62**, 2229 (1984)
47. J.S.Craigie, E.R.Morris, D.A.Rees, D.Thom. *Carbohydr. Polym.*, **4**, 237 (1984)
48. D.J.Wedlock, B.A.Fasihuddin. *Food Hydrocolloids*, **4**, 41 (1990)
49. R.Panikkar, D.J.Brasch. *Carbohydr. Res.*, **293**, 119 (1996)
50. P.Gacesa. *Carbohydr. Polym.*, **8**, 161 (1988)
51. N.J.Russell, P.Gacesa. *Mol. Aspects Med.*, **10**, 1 (1988)
52. T.B.May, A.M.Chakrabarty. *Methods Enzymol.*, **235**, 295 (1994)
53. B.H.A.Rehm, S.Valla. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 281 (1997)
54. F.Clementi. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **17**, 327 (1997)
55. P.Gacesa. *Microbiology (UK)*, **144**, 1133 (1998)
56. T.Akahane, S.Takeuchi, A.Minakata. *Polym. Bull.*, **24**, 437 (1990)
57. M.Uddin. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **30**, 343 (1987)
58. M.C.Cameron, A.G.Ross, E.G.V.Percival. *J. Soc. Chem. Ind.*, **67**, 161 (1948)
59. G.O.Kim, C.G.Pu, M.H.Li, G.O.Lyu. *Punsok Hwahak*, (3), 13 (1982); *Chem. Abstr.*, **98**, 140058 (1983)
60. A.Jensen, M.Indergaard, T.J.Holt. *Bot. Mar.*, **28**, 375 (1985)
61. A.Haug, O.Smidsrod. *Acta Chem. Scand.*, **24**, 843 (1970)
62. E.Murano, S.Paoletti, A.Cesaro, R.Rizzo. *Anal. Biochem.*, **187**, 120 (1990)
63. G.R.Seely, R.R.Knotts. *Carbohydr. Polym.*, **3**, 109 (1983)
64. M.K.Pal, N.Mandal. *Biopolymers*, **29**, 1541 (1990)
65. D.F.Day, M.L.Marceau-Day. *Ann. New York Acad. Sci.*, **613**, 751 (1990)
66. J.P.Halle, D.Landry, A.Fournier, M.Beaudry, F.A.Lebland. *Cell Transplantation*, **2**, 429 (1993)
67. Дж.Е.Скотт. В кн. *Методы химии углеводов*. (Пер. с англ.). Мир, Москва, 1967. С. 288
68. J.F.Kennedy, I.J.Bradshaw. *Br. Polym. J.*, **16**, 95 (1984)
69. J.F.Kennedy, I.J.Bradshaw. *Carbohydr. Polym.*, **7**, 35 (1987)
70. J.F.Kennedy, I.J.Bradshaw. *Carbohydr. Polym.*, **7**, 409 (1987)
71. Y.Murata, S.Kawashima, E.Miyamoto, N.Masauji, A.Honda. *Carbohydr. Res.*, **208**, 289 (1990)
72. A.S.Perlin. *Can. J. Chem.*, **30**, 278 (1952)

73. R.M.McCready, H.A.Swenson, W.D.Maclay. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **18**, 290 (1946)
74. A.Jensen, I.Sunde. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **2**, 125 (1956)
75. B.Larsen. In *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. (Eds J.A.Hellebust, J.S.Craigie). Cambridge University Press, Cambridge, 1978. P. 143
76. D.M.W.Anderson. *Talanta*, **2**, 73 (1959)
77. J.N.C.Whyte, J.R.Englar. *Anal. Biochem.*, **59**, 426 (1974)
78. A.E.Castagne, I.R.Siddiqui. *Carbohydr. Res.*, **42**, 382 (1975)
79. L.P.Kosheleva, G.I.Iľchenko, L.I.Glebko. *Anal. Biochem.*, **73**, 115 (1976)
80. Л.И.Глебко, Г.Я.Ильченко, Л.П.Кошелева. *Химия природ. соединений*, 10 (1976)
81. R.W.Scott, W.E.Moore, M.J.Effland, M.A.Millett. *Anal. Biochem.*, **21**, 68 (1967)
82. Z.Dische. *J. Biol. Chem.*, **167**, 189 (1947)
83. Z.Dische. *J. Biol. Chem.*, **183**, 489 (1950)
84. B.E.F.de Arcuri, M.E.F.de Recondo, E.F.Recondo. *Carbohydr. Res.*, **85**, 165 (1980)
85. N.Blumenkrantz, G.Asboe-Hansen. *Anal. Biochem.*, **54**, 484 (1973)
86. R.W.Scott. *Anal. Chem.*, **51**, 936 (1979)
87. E.G.V.Percival, A.G.Ross. *J. Soc. Chem. Ind.*, **67**, 420 (1948)
88. J.D.Gregory. *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**, 157 (1960)
89. T.Bitter, H.M.Muir. *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962)
90. J.T.Galambos, J.R.McCain. *Anal. Biochem.*, **19**, 119 (1967)
91. J.T.Galambos, J.R.McCain. *Anal. Biochem.*, **19**, 133 (1967)
92. C.A.Knutson, A.Jeanes. *Anal. Biochem.*, **24**, 470 (1968)
93. C.A.Knutson, A.Jeanes. *Anal. Biochem.*, **24**, 482 (1968)
94. М.П.Филиппов, Т.В.Власьева. *Прикл. биохимия и микробиология*, **9**, 134 (1973)
95. М.П.Филиппов, Т.В.Власьева, В.И.Кузьминов, Н.П.Дзюба, В.Н.Чушенко, В.В.Саянова. *Изв. АН Молд. ССР. Сер. биол. и хим. наук*, (1), 75 (1976)
96. P.K.Kintner, J.P.Van Buren. *J. Food Sci.*, **47**, 756 (1982)
97. T.M.C.C.Filiseti-Cozzi, N.C.Carpita. *Anal. Biochem.*, **197**, 157 (1991)
98. D.A.T.Southgate. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry. Vol. 2*. (Eds G.O.Phillips, D.J.Wedlock, P.A.Williams). Pergamon Press, Oxford, 1984. P. 3
99. V.Sherbrock-Cox, N.J.Russell, P.Gacesa. *Carbohydr. Res.*, **135**, 147 (1984)
100. G.B.Pier, J.M.Saunders, P.Ames, M.S.Edwards, H.Auerbach, J.Goldfarb, D.P.Speert, S.Hurwitch. *New Engl. J. Med.*, **317**, 793 (1987)
101. S.S.Pedersen, F.Espersen, N.Hoiby, G.H.Shand. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 691 (1989)
102. K.Kawana, T.Nakaoka, S.Watanabe. *Kanagawa-ken Eisei Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, **21**, 25 (1991); *Chem. Abstr.*, **117**, 46824 (1992)
103. M.Dubois, K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers, F.Smith. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
104. H.D.Graham. *J. Dairy Sci.*, **52**, 443 (1969)
105. H.D.Graham. *J. Food Sci.*, **35**, 494 (1970)
106. N.E.Aponte de Otaola, M.Diaz-Piferrer, H.D.Graham. *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, **47**, 464 (1983); *Chem. Abstr.*, **100**, 65018 (1984)
107. M.Toyoda, C.Yomota, Y.Ito, M.Harada. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **26**, 189 (1985); *Chem. Abstr.*, **103**, 195032 (1985)
108. A.H.Brown. *Arch. Biochem.*, **11**, 269 (1946)
109. E.G.Brown, T.J.Hayes. *Analyst*, **77**, 445 (1952)
110. A.Haug, B.Larsen. *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1908 (1962)
111. I.R.Siddiqui. *Carbohydr. Res.*, **67**, 289 (1978)
112. A.Haug, B.Larsen. *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1395 (1961)
113. R.Fey, F.J.Mack. *Lebensm. Gerichth. Chem.*, **35**, 50 (1981)
114. F.Schur, P.Anderegg, H.Pfenninger. *Brau-Rundsch.*, **92**, 25 (1981)
115. H.B.Pfenninger, P.Anderegg, E.Vykoukal. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **41**, 40 (1983)
116. H.Scherz. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, **179**, 17 (1984)
117. H.Scherz. *Lebensm. Gerichth. Chem.*, **39**, 32 (1985)
118. J.Wingender, V.Sherbrock-Cox, P.Gacesa, N.J.Russell. *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 1148 (1985)
119. B.Larsen, A.Haug. *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1397 (1961)
120. H.Anzai, N.Uchida, E.Nishide. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 73 (1990); *Chem. Abstr.*, **113**, 37203 (1990)
121. M.-H.Ji, W.D.Cao, L.J.Han. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **12**, 240 (1981); *Chem. Abstr.*, **95**, 183279 (1981)
122. A.G.J.Voragen, H.A.Schols, J.A.De Vries, W.Pilnik. *J. Chromatogr.*, **244**, 327 (1982)
123. A.G.J.Voragen, H.A.Schols, W.Pilnik. *Progr. Food Nutr. Sci.*, **6**, 379 (1982)
124. G.Annison, N.W.H.Cheetham, I.Couperwhite. *J. Chromatogr.*, **264**, 137 (1983)
125. L.H.Krull, G.L.Cote. *Carbohydr. Polym.*, **17**, 205 (1992)
126. S.Honda, S.Suzuki, M.Takahashi, K.Takehi, S.Ganno. *Anal. Biochem.*, **134**, 34 (1983)
127. P.Gacesa, A.Squire, P.J.Winterburn. *Carbohydr. Res.*, **118**, 1 (1983)
128. C.Bouffar-Roupe, A.Heyraud. *Food Hydrocolloids*, **1**, 559 (1987)
129. S.Honda, K.Sudo, K.Takehi, H.Yuki, K.Takiura. *Anal. Chim. Acta*, **77**, 199 (1975)
130. J.R.Clamp, J.E.Scott. *Chem. Ind.*, 652 (1969)
131. J.F.Kennedy, S.M.Robertson, M.Stacey. *Carbohydr. Res.*, **49**, 243 (1976)
132. J.F.Kennedy, S.M.Robertson, M.Stacey. *Carbohydr. Res.*, **57**, 205 (1977)
133. M.B.Perry, R.K.Hulyalkar. *Can. J. Biochem.*, **43**, 573 (1965)
134. E.Sjöström, P.Haglund, J.Janson. *Acta Chem. Scand.*, **20**, 1718 (1966)
135. J.D.Blake, G.N.Richards. *Carbohydr. Res.*, **8**, 275 (1968)
136. T.M.Jones, P.Albersheim. *Plant Physiol.*, **49**, 926 (1972)
137. E.Sjostrom, K.Pfister, E.Seppala. *Carbohydr. Res.*, **38**, 293 (1974)
138. J.Lehrfeld. *Anal. Biochem.*, **115**, 410 (1981)
139. J.Lehrfeld. *J. Chromatogr.*, **408**, 245 (1987)
140. S.A.Fazio, D.J.Uhlinger, J.H.Parker, D.C.White. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1151 (1982)
141. G.L.Cote, L.H.Krull. *Carbohydr. Res.*, **181**, 143 (1988)
142. R.L.Taylor, H.E.Conrad. *Biochemistry*, **11**, 1383 (1972)
143. L.Vadas, H.S.Prihar, B.K.Pugashetti, D.S.Feingold. *Anal. Biochem.*, **114**, 294 (1981)
144. K.Larsson, O.Larm, K.Granath. *Acta Chem. Scand., Ser. B*, **38**, 15 (1984)
145. M.Fujihara, T.Nagumo. *Nippon Kagaku Kaishi*, (4), 576 (1986); *Chem. Abstr.*, **106**, 5362 (1987)
146. E.Quintero, K.Ishida, G.Gordon, G.Geesey. *J. Microbiol. Methods*, **9**, 309 (1989)
147. W.S.York, A.G.Darvill, M.McNeil, T.T.Stevenson, P.Albersheim. *Methods Enzymol.*, **118**, 3 (1986)
148. N.O.Maness, J.D.Ryan, A.J.Mort. *Anal. Biochem.*, **185**, 346 (1990)
149. S.G.Zeller, G.R.Gray. *Carbohydr. Res.*, **226**, 313 (1992)
150. A.Haug, B.Larsen, O.Smidsrod. *Carbohydr. Res.*, **32**, 217 (1974)
151. E.Nishide, H.Anzai, N.Uchida. *Hydrobiologia*, **151/152**, 551 (1987)
152. A.Heyraud, C.Leonard. *Food Hydrocolloids*, **4**, 59 (1990)
153. A.Heyraud, C.Leonard. *Carbohydr. Res.*, **215**, 105 (1991)
154. T.Shimokawa, S.Yoshida, T.Takeuchi, K.Murata, T.Ishii, I.Kusakabe. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1532 (1996)
155. T.Shimokawa, S.Yoshida, I.Kusakabe, T.Takeuchi, K.Murata. *Carbohydr. Res.*, **299**, 95 (1997)
156. R.J.Linhardt, P.M.Gallier, C.L.Cooney. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **12**, 135 (1986)
157. F.Haugen, F.Kortner, B.Larsen. *Carbohydr. Res.*, **198**, 101 (1990)
158. P.Gacesa. *Int. J. Biochem.*, **24**, 545 (1992)
159. H.I.Nakada, P.C.Sweeney. *J. Biol. Chem.*, **242**, 845 (1967)
160. J.Boyd, J.R.Turvey. *Carbohydr. Res.*, **66**, 187 (1978)
161. D.M.Butler, L.V.Evans, B.Kloareg. In *Introduction to Applied Phycology*. (Ed. I. Akatsuka). SPB Academic Publishing, The Hague, 1990. P. 647
162. C.Boyen, B.Kloareg, M.Polne-Fuller, A.Gibor. *Phycologia*, **29**, 173 (1990)
163. C.Boyen, Y.Bertheau, T.Barbeyron, B.Kloareg. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **12**, 885 (1990)
164. I.M.Aasen, K.Folkvord, D.Levine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 55 (1992)
165. K.Ostgaard, S.H.Knutsen, N.Dyrset, I.M.Aasen. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **15**, 756 (1993)
166. S.Takeshita, N.Sato, M.Igarashi, T.Muramatsu. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1125 (1993)
167. B.J.Brown, J.F.Preston. *Carbohydr. Res.*, **211**, 91 (1991)
168. F.Eftekhari, N.L.Schiller. *Curr. Microbiol.*, **29**, 37 (1994)
169. B.Larsen, K.Hooyen, K.Ostgaard. *Hydrobiologia*, **261**, 557 (1993)

170. T.Hisano, M.Nishimura, Y.Yonemoto, S.Abe, T.Yamashita, K.Sakaguchi, A.Kimura, K.Murata. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 332 (1993)
171. T.Hisano, H.Yamaguchi, Y.Yonemoto, K.Sakaguchi, T.Yamashita, S.Abe, A.Kimura, K.Murata. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 220 (1993)
172. K.Ostgaard, B.Larsen. *Carbohydr. Res.*, **246**, 229 (1993)
173. K.Ostgaard, B.T.Stokke, B.Larsen. *Carbohydr. Res.*, **260**, 83 (1994)
174. T.Hisano, M.Nishimura, T.Yamashita, T.Imanaka, T.Muramatsu, A.Kimura, K.Murata. *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 182 (1994)
175. F.S.Wusteman, P.Gacesa. *Carbohydr. Res.*, **241**, 237 (1993)
176. K.Ostgaard. *Carbohydr. Polym.*, **19**, 51 (1992)
177. K.H.Min, S.F.Sasaki, Y.Kashiwabara, M.Umekawa, K.Nisizawa. *J. Biochem.*, **81**, 555 (1977)
178. F.Haugen, B.Larsen. *Polym. Prepr.*, **30**, 363 (1989)
179. K.Ostgaard. *Hydrobiologia*, **260/261**, 513 (1993)
180. A.Heyraud, P.Colin-Morel, S.Girond, C.Richard, B.Kloareg. *Carbohydr. Res.*, **291**, 115 (1996)
181. A.Heyraud, C.Gey, C.Leonard, C.Rochas, S.Girond, B.Kloareg. *Carbohydr. Res.*, **289**, 11 (1996)
182. F.Chavagnat, A.Heyraud, P.Colin-Morel, M.Guinand, J.Wallach. *Carbohydr. Res.*, **308**, 409 (1998)
183. A.Heyraud, P.Colin-Morel, C.Gey, F.Chavagnat, M.Guinand, J.Wallach. *Carbohydr. Res.*, **308**, 417 (1998)
184. V.Vreeland, E.Zablackis, B.Doboszewski, W.M.Laetsch. *Hydrobiologia*, **151/152**, 155 (1987)
185. V.Vreeland, D.J.Chapman. *J. Immunol. Methods*, **23**, 227 (1978)
186. V.Vreeland, W.M.Laetsch. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **10**, 531 (1981)
187. V.Vreeland, M.Slomich, W.M.Laetsch. *Planta*, **162**, 506 (1984)
188. B.Larsen, V.Vreeland, W.M.Laetsch. *Carbohydr. Res.*, **143**, 221 (1985)
189. S.M.Bociek, D.Welti. *Carbohydr. Res.*, **42**, 217 (1975)
190. W.Mackie. *Carbohydr. Res.*, **20**, 413 (1971)
191. M.P.Filippov, R.Kohn. *Chem. Zvesti*, **28**, 817 (1974)
192. S.J.Horn, E.Moen, K.Ostgaard. In *The XVIth International Seaweed Symposium. (Abstracts of Reports)*. Cebu, 1998. P. 69
193. E.R.Morris, D.A.Rees, D.Thom. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 245 (1973)
194. E.R.Morris, D.A.Rees, G.R.Sanderson, D.Thom. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1418 (1975)
195. E.R.Morris, D.A.Rees, D.Thom. *Carbohydr. Res.*, **81**, 305 (1980)
196. B.Stockton, L.V.Evans, E.R.Morris, D.A.Powell, D.A.Rees. *Bot. Mar.*, **23**, 563 (1980)
197. B.Stockton, L.V.Evans, E.R.Morris, D.A.Rees. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 176 (1980)
198. B.Larsen. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **10**, 8 (1981)
199. B.Larsen, G.Skjak-Braek, T.Painter. *Carbohydr. Res.*, **146**, 342 (1986)
200. А.И.Усов, Е.А.Кошелева, А.П.Яковлев. *Биорг. химия*, **11**, 830 (1985)
201. G.Skjak-Braek, O.Smidsrod, B.Larsen. *Int. J. Biol. Macromol.*, **8**, 330 (1986)
202. A.Narbad, M.J.E.Hewlins, P.Gacesa, N.J.Russell. *Biochem. J.*, **267**, 579 (1990)
203. R.Panikkar, D.J.Brasch. *Carbohydr. Res.*, **300**, 229 (1997)
204. F.Llanes, F.Sauriol, F.G.Morin, A.S.Perlin. *Can. J. Chem.*, **75**, 585 (1997)
205. H.Grasdalen. *Carbohydr. Res.*, **118**, 255 (1983)
206. C.A.Steginsky, J.M.Beale, H.G.Floss, R.M.Mayer. *Carbohydr. Res.*, **225**, 11 (1992)
207. J.M.Beale, C.A.Steginsky, B.M.Mamiya. *Environ. Sci. Res.*, **44**, 209 (1992)
208. M.Indergaard, G.Skjak-Braek. *Hydrobiologia*, **151/152**, 541 (1987)
209. J.R.W.Govan, P.Sarasola, D.Taylor, P.J.Tatnell, N.J.Russell, P.Gacesa. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 595 (1992)
210. P.J.Tatnell, N.J.Russell, P.Gacesa. *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 310 (1994)
211. D.F.Day, R.D.Ashby, J.W.Lee. *ACS Symp. Ser.*, **684**, 175 (1998)

ALGINIC ACIDS AND ALGINATES: METHODS FOR ANALYSIS, DETERMINATION OF THE COMPOSITION AND STRUCTURE ELUCIDATION

A.I.Usov

*N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences
47, Leninsky prosp., 117913 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)135-5328*

The review is concerned with the history and the modern state of the problem of detection, quantitative determination, and primary structure characterisation of alginic acids and their salts (alginates). A short description of alginate structures and properties is given, and many analytical methods including chemical, physico-chemical, and enzymatic procedures, which have been used for structural analysis of alginates and may be suitable for investigation of other uronic acid-containing polysaccharides, are discussed.

Bibliography — 211 references.

Received 18th May 1999