

KVANTITETA ALGINSKE KISLINE V JADRANSKIH RJAVIH ALGAH

THE QUANTITY OF ALGINIC ACID IN ADRIATIC BROWN ALGAE

Ivka Munda

UVOD

Alginska kislina je visokopolimeren poliuronat in sestaven del celične membrane rjavih alg. Njene soli, alginati, tvorijo visoko viskozne raztopine ter so zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti uporabni v različnih panogah farmacije, medicine, agronomije ter živilske in tekstilne industrije.

Za industrijsko izkoriščanje se rjave alge nabirajo sistematsko. To se izplača predvsem na atlantskih obalah Evrope in Severne Amerike, kjer pokrivajo rjave alge rodov *Macrocystis* in *Laminaria* s svojimi velikimi steljkami obsežne areale.

Jadransko morje je revno glede kvantitete rjavih alg in prilike nabiranja so težavne, tako da že iz teh vzrokov ne moremo računati z jadranskimi feoficejami kot surovinami za industrijsko izkoriščanje v večjem merilu. Poleg tega so potrebni podatki o kvantiteti in kvaliteti njihove alginske kisline. Da bi rešila to vprašanje, sem določevala alginsko kislino v nekaterih najčesejših jadranskih feoficejah ter ocenila njeno kvaliteto. Na podlagi teh predhodnih informacij je možno oceniti jadranski material kot surovino za eventualno pridobivanje alginatov v manjšem merilu ter v specialne namene.

Alginska kislina variira v različnih vrstah rjavih alg glede na svojo kvantiteto, stopnjo polimerizacije ter razmerje med L-guluronsko in D-manuronsko kislino v molekuli (Fischer-Dörfel, 1955). Po raziskovanjih Haug-a (1959, 1961) alginska kislina ne predstavlja enostaven, linearen polimer, temveč zmes makromolekul različne sestave. Glede na to je možno, da ima vsaka vrsta feoficej drugačen kompleks alginske kisline.

Kvantiteta alginske kisline v posameznih vrstah feoficej variira v letnih časih in je tudi odvisna od rastišča. Sezonske variacije alginske kisline norveških laminariacej sta proučevala Haug in Jensen (1954, 1956), Kir-

ZAHVALA Na tem mestu se zahvaljujem vodstvu norveškega algološkega inštituta, NTH, Trondheim, zlasti ing. A. Haugu, za nasvete in delavne pogoje.

schnick (1955) feoficeje severno-nemške obale, Black (1948, 1950) laminariaceje škotske obale ter Munda (1962) sezonske variacije alginske kisline v jadranskih algah iz Splita in Rovinja.

RAZISKOVANI MATERIAL

Fucus virsoides J. Ag., *Cystoseira spicata* Erc. (syn. *C. amentacea*), *C. barbata* J. Ag., *C. abrotanifolia* C. Ag., *C. discors* C. Ag., *Sargassum vulgare* C. Ag., *S. hornschurchii* J. Ag., *Laminaria rodriguezii* Born., *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lam., *Dictyopteria membranacea* Batt., *Padina pavonia* (L.) Gaill., *Halopteris scoparia* (L.) Sauv., *Cladostephus verticillatus* (Lightf.) Lyngb., *Colpomenia sinuosa* (Mert.) Derb. et Sol., *Asperococcus bullosus* Lam.

Material, naveden v tabeli I, sem nabrala na otoku Krku v maju 1958, vrste *Colpomenia sinuosa*, *Asperococcus bullosus* in *Cladostephus verticillatus* pa istega meseca v Rovinju. Vrsta *Laminaria rodriguezii* je bila nabrana v južnem Jadranu (Sika od Trešijavca) v globini približno 100 m, avgusta 1957. V tabeli II opisani material sem nabrala, z izjemo laminarije, junija 1959. v Splitu. Viskoznost izoliranih alginatov je bila določena na istem materialu.

METODIKA DELA

Kot je razvidno iz tabele I, sem določevala alginsko kislino v jadranskih feoficejah po različnih metodah: manometrični, potenciometrični, gravimetrični ter po metodi Ca-acetata.

Tako manometrična kot potenciometrična metoda bazirata na procesu dekarboksilacije uronskih kislin.

1) Za manometrično določevanje pri dekarboksilaciji sproščenega CO_2 sem uporabila metodo, ki jo je uvedel Tracey (1948) in izpopolnil Ogston in Stanier (1951). Dekarboksilacijo sem izvedla na posušenih, zmletih algah z 12% HCl pri temperaturi vrelišča toluena (111°C). Po 5 urah sem proščeni CO_2 določala v van Slyke-Neilovi aparaturi (van Slyke-Folch, 1940).

2) Potenciometrično določevanje pri dekarboksilaciji uronskih kislin sproščenega CO_2 je uvedel Oelsen (1951), izpopolnili pa so jo Jensen, Sund e in Haug (1955). Potrebno je pretretiranje prob z 0,2n H_2SO_4 , da se odstranijo karbonati, nitrati in ostali ogljikovi hidrati, ki bi mogli vplivati na rezultate.

Dekarboksilacijo sem izvedla z 19% HCl pri 115°C .

3) Gravimetrična metoda je povezana z izolacijo alginske kisline in sledi v glavne stopnje industrijskega procesa. V alkalnem ekstraktu lahko:

a) precipitiramo Na-alginat s 96% etanolom,

b) precipitiramo Ca-alginat s 10% CaCl_2 ter sprostimo alginsko kislino v zmesi HCl -96% etanol (1:1).

4) Metoda Ca-acetata (Haug-Larsen) omogoča določevanje uronskih kislin direktno na tkivu alg. V teku preekstrakcije s 0,2 HCl se odstranijo vsi

kationi iz tkiva in nadomeste s Ca s pomočjo tretiranja z 0,03 M Ca-acetatom. Ca-ioni, ki so bili vezani na algininsko kislino, se ponovno odstranijo iz tkiva in določijo kompleksometrično.

S pomočjo te metode sem določevala tudi množino poliuronatov v izoliranih produktih.

5) Viskoznost (ur) 0,25% raztopin Na-alginatov v 3% sodi sem določevala v Ostwaldovem viskozimetru.

REZULTATI IN DISKUSIJA

V tabeli I so navedeni rezultati določevanja algininske kisline po potenciometrični, manometrični in gravimetrični metodi (Na-alginat) ter metodi Ca-acetata. Določen je bil tudi procent poliuronatov v izoliranih produktih.

Manometrična metoda nam je očividno dala previsoke rezultate (izjema le vrsta *Halopteris scoparia*).

Ostale metode so nam dale realnejše rezultate, ki se medsebojno zlasti dobro skladajo pri vrstah *Cystoseira barbata*, *C. discors* in *Sargassum vulgare*. Pri vrsti *Fucus virsoides* pa so gravimetrično dobljeni rezultati znatno višji od ostalih. Razvidno je, da v teku alkalne ekstrakcije tkiva druge substance slede poliuronatom.

Pri vrsti *Laminaria rodriguezii* pa so gravimetrično dobljene vrednosti nekoliko nižje od onih, dobljenih potenciometrično in po metodi Ca-acetata. To razliko lahko pripišemo izgubi materiala med procesom izolacije.

Slični odnosi veljajo tudi za vrsto *Colpomenia sinuosa*.

Pri diktioacejah in vrsti *Halopteris scoparia* je bila množina algininske kisline, določena gravimetrično, znatno nižja od vrednosti, dobljenih potenciometrično in po metodi Ca-acetata. V izoliranih produktih smo ugotovili le približno 50% uronatov. Mogli bi predpostaviti, da je v kompleksu algininske kisline diktioacej in vrste *Halopteris scoparia* več nižemolekularnih poliuronatov kot pri fukacejah in laminarijacejah in da se le-ti izgube med filtracijo.

Omembe vredno je še dejstvo, da smo pri vrsti *Padina pavonia* in *Dictyopteris membranacea* dobili relativno visoke vrednosti algininske kisline po potenciometrični metodi. To razliko z ozirom na vrednost, dobljeno po metodi Ca-acetata, lahko pripišemo reziduumu karbonatov v tkivih.

V tabeli II so navedene vrednosti algininske kisline, dobljene po metodi Ca-acetata (preekstrakcija s 0,2 n in 1 n HCl) in po gravimetrični metodi. Gravimetrični postopek sem izvedla z direktno precipitacijo z etanolom (Na-alginat) ter preko Ca-alginata (algininska kislina). Ponovno sem določala množino poliuronatov v izoliranih produktih. Iz tabele je razvidno, da se via Ca-alginata dobe čistejši produkti kot z direktno precipitacijo.

V večini primerov je množina algininske kisline, določena direktno na tkivih s pomočjo metode Ca-acetata, višja, kot če je določena gravimetrično. Kot omenjeno, pripisujemo to razliko izgubi nižje molekularnih poliuronatov med procesom izolacije.

Alginska kislina, izolirana iz vrste *Laminaria rodriguezii*, kaže vlaknato strukturo in je bele barve. Vlaknati karakter izoliranih produktov je manj izražen pri fukacejah. Njihovi alginati so temno rjave barve. Alginska kislina, izolirana iz ostalih proučevanih alg, je pri precipitaciji izpadla v fino dispergiranih, amorfni partiklih. Produkti so bili svetlo rjave barve.

Meritve relativne viskoznosti izoliranih alginatov so razvidne iz tabele III. Najvišjo viskoznost sem opazila pri alginatu iz vrste *Laminaria rodriguezii*. Le-ta za približno 10 krat presega vrednosti, opažene za ostali material. Najnižjo viskoznost pa kažejo alginati, izolirani iz vrst *Colpomenia sinuosa*, *Halopteris scoparia* ter iz diktioceje.

Rezultati določevanja alginske kisline v jadranskih feoficejah so nam pokazali, da vsebuje vrsta *Laminaria rodriguezii* največ alginske kisline in da je le-ta relativno najboljše kvalitete (vlaknati značaj, bela barva, relativno visoka viskoznost). Kljub temu bi ta vrsta težko prišla v poštev kot industrijska surovina, ker je težko pristopna in tvori naselja le sporadično v večjih globinah.

Fukaceje so, nasprotno, laže dostopne nabiranju, a njihove steljke so majhne in kvaliteta izolirane alginske kisline manj povoljna (nizka viskoznost raztopin). Alginska kislina fukacej je po izolaciji močno obarvana, kar bi pri eventualni proizvodnji zahtevalo proces beljenja.

Omembe vredno je, da vsebuje *Fucus virsoides* iz brakične vode manj alginske kisline kot oni iz morske. Slične razmere sem opazila pri nekaterih atlantskih fukacejah (*Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*) v skladu z lastnimi, še ne publiciranimi podatki.

Sezonske variacije množine alginske kisline sem predhodno proučevala na materialu iz Rovinja in Splita (Munda, 1962). V teku teh raziskav je bila uporabljena metoda Ca-acetata. V skladu z dobljenimi podatki kažejo cistozire nizko vsebnost alginske kisline pozimi in v zgodnji pomladi. Množina narašča v maju, simultano z intenzivnejšo rastjo in doseže maksimum v poletju. Ponoven minimum je opazen jeseni, ko primarne in sekundarne vejice propadajo. Iz tega bi mogli sklepati, da vsebujejo cistozire več alginske kisline v vejicah kot v perenanthnih bazalnih delih. *Fucus virsoides* kaže maksimum alginske kisline v pomladanskih mesecih. Pri tej vrsti je bil sezonski potek množine proteinov v negativni korelaciji z onim alginske kisline. Če smo primerjali sezonski potek množine pepela in alginske kisline v opazovanih fukacejah, smo mogli tudi ugotoviti negativno korelacijo. Glede na to je možno, da predstavljajo sezonske fluktuacije množine alginske kisline le sekundaren efekt, ki ga povzroče variacije v množini pepela.

Kot je bilo omenjeno, je alginat, izoliran iz jadranske laminarije, relativno najboljše kvalitete. Razlika med gravimetrično in po metodi Ca-acetata dobljenimi podatki je neznatna in izolirani produkt vsebuje visok procent uronatov. Tudi iz relativno visoke viskoznosti moremo sklepati, da ima alginska kislina laminarije višjo molekularno težo kot ona, izolirana iz ostalih opazovanih feoficej.

Pri ostalih rjavih algah, ki smo jih raziskovali, je bila razlika med gravimetrično in po metodi Ca-acetata dobljenimi podatki znatno večja. Procent uronatov v izoliranih produktih je tu nižji, torej slede tudi druge substance alginski kislini ob alkalni ekstrakciji tkiva. Kot kaže tabela II, se po postopku izolacije preko Ca-alginata dobe čistejši produkti kot s pomočjo direktne precipitacije z etanolom.

Omenjeno razliko med gravimetrično in titrimetrično dobljenimi podatki (ta razlika je najbolj izražena pri diktioacejah in vrsti *Halopteris scoparia*) bi lahko razlagali na ta način, da se pri tem materialu niže molekularni poliuronati izgube v teku procesa izolacije. Titrimetrična metoda, aplicirana direktno na tkivo, pa nam ponazaruje celokupno množino uronskih kislin v algah.

Po današnji konceptiji predstavlja alginska kislina zmes makromolekul različne sestave. Glede na to je možno, da vsebuje vsaka vrsta feoficej svoj lasten kompleks alginske kisline, čigar komponente se razlikujejo tako po sestavi kot po molekularni teži.

Na podlagi zgoraj omenjenega dejstva ter nizke viskoznosti alginatov iz fukacej, diktioacej ter vrst *Colpomenia sinuosa* in *Halopteris scoparia* lahko pričakujemo, da se alginska kislina teh feoficej bistveno razlikuje od one iz laminarij. Relativno visoke vrednosti, dobljene titrimetrično, nam ponazorujejo le množino uronskih kislin v tkivih. Vprašanje njihove stopnje polimerizacije ter molekularnega spektra kompleksa alginske kisline pa ostane še odprto.

Tab. I

ALGINSKA KISLINA (g/100 g suhe teže) — ALGINIC ACID (g/100 g dry matter)

določena: determined:	manometrično - potenciometrično — Ca acetat metoda - gravimetrično manometric - potentiometric — Ca acetate method - gravimetric izolirani produkt - % uronatov - korekcija isolated product - % uronates - correction					
<i>Cystoseira spicata</i>	37,5	28,58	24,3	24,1	91,0	22,2
<i>C. barbata</i>	33,9	18,70	18,2	20,4	87,1	17,8
<i>C. abrotanifolia</i>	39,1	23,06	22,5	20,5	86,9	17,8
<i>C. discors</i>	34,9	19,32	18,9	24,1	87,3	21,0
<i>Fucus virsoides</i> (brakična voda)	25,2	17,99	15,4	27,0	75,9	20,5
<i>F. virsoides</i> (morska voda)	31,6	21,73	19,2	28,9	77,3	22,4
<i>Sargassum vulgare</i>	40,2	18,15	18,7	20,8	87,3	18,1
<i>Laminaria rodriguezii</i>	50,5	30,13	30,3	28,0	88,2	27,6
<i>Halopteris scoparia</i>	4,5	17,56	17,4	13,7	57,8	7,7
<i>Dictyota dichotoma</i>	19,3	13,43	12,4	10,2	52,5	5,2
<i>Dictyopteris membranacea</i>	21,0	20,13	16,9	19,7	51,2	10,0
<i>Padina pavonia</i>	18,8	20,38	12,5	16,1	35,4	5,7
<i>Cladostephus verticillatus</i>	22,5	23,15	21,9	—	—	—
<i>Asperococcus bullosus</i>	16,2	8,18	8,8	—	—	—
<i>Colpomenia sinuosa</i>	33,0	16,58	16,5	14,8	89,6	13,3

brakična voda: saliniteta 7,2‰

brackish water: salinity

morska voda: saliniteta 34,5‰

sea water: salinity

Tab. II

ALGINSKA KISLINA (g/100 g suhe teže) — ALGINIC ACID (g/100 g dry matter)

	<i>Določena gravimetrično - Determined gravimetric</i>			<i>Metoda Ca acetata - Ca acetate method</i>				
	precipitacija z etanolom (Na alginat) - preko Ca alginata (alginska kislina) precipitation with ethanol (Na alginat) - via Ca alginate (alginic acid)						preekstrakcija z HCl preextraction with HCl	
	IP	% U	K	IP	% U	K	0,2n—1n	
Laminaria rodriguezii	34,4	80,5	26,8	28,6	93,5	26,8	30,3	—
Padina pavonia	11,0	55,6	6,1	7,8	87,0	6,8	6,9	—
Dictyopteris membranacea	14,0	70,0	9,8	11,1	89,0	9,9	15,9	15,8
Dictyota dichotoma	22,5	39,5	8,9	7,4	88,0	6,5	11,4	12,1
Halopteris scoparia	13,0	52,0	6,8	5,9	98,0	5,8	14,3	13,9
Sargassum hornschurchii	19,7	64,0	12,9	17,2	69,0	11,9	22,0	21,5
Fucus virsoides	18,7	65,0	12,2	17,6	70,0	12,3	18,4	18,4
Cystoseira spicata	29,5	63,0	18,7	21,1	65,0	13,8	23,4	23,0
C. barbata	19,3	62,0	12,0	12,5	94,5	11,8	18,6	19,4
C. abrotanifolia	23,9	67,5	16,6	16,2	92,3	15,0	23,3	23,3

IP izolirani produkt
isolated product% U % uronatov
% of uronatesK korekcija
correction

Tab. III

RELATIVNA VISKOZNOST

RELATIVE VISCOSITY

(η r/cp/)

0,25% raztopin Na alginata v 3% sodi
of 0,25% solutions of Na alginates in 3% soda

<i>Laminaria rodriguezii</i>	13,20
<i>Cystoseira spicata</i>	1,74
<i>C. barbata</i>	1,52
<i>C. abrotanifolia</i>	1,83
<i>Fucus virsoides</i>	1,34
<i>Sargassum hornschurchii</i>	1,95
<i>Dictyota dochotoma</i>	1,34
<i>Dictyopteris membranacea</i>	1,38
<i>Padina pavonia</i>	1,26
<i>Halopteris scoparia</i>	1,69
<i>Colpomenia sinuosa</i>	1,18

BIBLIOGRAFIJA

- Black, W. A. P. 1948: J. Soc. Chem. Ind. (London), 67 (165—176).
 Black, W. A. P. 1950: J. Mar. Biol. Assoc. UK 29 (45—72).
 Bird, G. M., Haas, P. 1931: Biochem. J. 25 (403).
 Donnan, F. G., Rose, R. G. 1950: Can. J. Res., 28 (2).
 Fischer, F. G., Dörfel, H. 1955: Z. physiol. Chem., 302 (186).
 Haug, A. 1959: Acta Chem. Scand., 13 (1250—1251).
 ——— 1959: Ibid., 13 (601—603).
 ——— 1961: Ibid., 15 (950—952).
 ——— 1961: Ibid., 15 (1794—1795).
 ——— 1955: Norw. Inst. Seaweed Res., Rep. 8.
 ———, Jensen, A. 1954: Ibid., Rep. 4.
 ———, Larsen, B. — Ibid. — to be published.
 Jensen, A., Haug, A. 1956: Ibid., Rep. 14.
 ———, Sunde, I., Haug, A. 1955: Ibid., Rep. 12.
 Mass, H., 1959: Alginsäure und Alginate.
 Moss, B. 1950: Ann. Bot., 17.
 Munda, I. 1962: Nova Hedwigia, 4 (1/2).
 Oelsen, W., Graue, E., Haase, H. 1951. Angew. Chem., 63 (557).
 Ogston, A., Stanier, J. 1951: Biochem. Journ., 49.
 van Slyke, D., Folch, J. 1940: J. Biol. Chem., 136.
 Tracey, M. V., 1948: Biochem. Journ., 43 (2).

THE QUANTITY OF ALGINIC ACID IN ADRIATIC BROWN ALGAE

Ivka Munda

SUMMARY

The amount of alginic acid in some Adriatic brown algae was determined by different methods.

Both manometric and potentiometric determinations of the carbon dioxide, evolved during decarboxylation with acid, were used. Further, the gravimetric and Ca-acetate methods were adapted.

It became obvious that the results obtained manometrically, were generally high. The values obtained by other methods did not too agree with each other in all the cases.

The results indicated that *Laminaria rodriguezii*, with 30 g alginic acid per 100 g dry matter, had the highest amount among the material investigated.

The amount of alginic acid, being rather high in the *Fucaceae*, *Cladostephus verticillatus* and *Colpomenia sinuosa*, was considerably lower in the *Dictyotaceae* and the species *Halopteris scoparia*.

The amount of uronic acids in the isolated products were estimated by means of the Ca-acetate method. It became evident, that other substances, besides alginic acid, were extracted with alkali.

As obvious from table II., the data obtained by means of the Ca-acetate method are considerably higher than those obtained gravimetrically, if the correction for the uronic acid contents in the isolated products was taken into account. This fact is true for all the material investigated, with the exception of *Laminaria rodriguezii*.

Measurements of the relative viscosity of the Na- alginates obtained indicated that it was about 10 times higher in *Laminaria rodriguezii* than in the rest of the material. One might assume that the alginates in question are of a lower molecular weight than the one obtained from *Laminaria rodriguezii*. It might be possible, too, that some of the low molecular polyuronates were lost during the isolation process, while they can be determined, if the Ca-acetate method is applied directly on the algal tissue.

The alginate obtained from *Laminaria rodriguezii* had a high relative viscosity, and was tread-like and of white colour. The rest of the alginates obtained were of a rather low relative viscosity and of a brown colour. Their production should then involve a bleaching process.

Previous investigations of the seasonal variations of the alginic acid contents in Adriatic brown algae (Munda, 1962) indicated that the latter was higher in the branches of the *Cystoseirae* than in their perennial basal parts. Finally, a negative correlation with their ash content was established.

