УДК 615.322:615.27

МОРСКИЕ ВОДОРОСЛИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ И КОМПЛЕКСОВ ЭССЕНЦИАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ

© 2012 В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова, С.Е. Фоменко, Л.А. Сизова

Тихоокеанский океанологический институт им В.И. Ильичева ДВО РАН, г. Владивосток

Поступила в редакцию 10.04.2012

Исследовано содержание полифенольных соединений и их антирадикальная активность в ряде морских водорослей, относящихся к классам бурых, красных, зеленых и морских трав, с прибрежной акватории залива Петра великого Японского моря. Показано, что содержание полифенольных соединений в *Sargassum pallidum*, *Cystoseira crassipes* и *Laminaria cichorioides* достигает 0,5% от веса суховоздушного сырья. Антирадикальная активность выделенных полифенольных комплексов составляет от 3,5 до 4,8 $\mu\text{MГК/мг}$. Изучен состав фосфолипидного комплекса в водно-спиртовом экстракте из бурой водоросли *Laminaria japonica*. Показано, что его содержание достигает 0,42% от веса сухой водоросли и характеризуется высоким содержанием основных компонентов мембранного матрикса – фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также важнейших предшественников биосинтеза фосфолипидов – фосфатидной кислоты и фосфатидилглицерина.

Ключевые слова: полифенольные соединения, флоротаннины, эссенциальные фосфолипиды, антирадикальная активность, переработка водорослей

В последнее время доказано, что многие патологические состояния животных и человека вызываются нарушением нормального уровня свободных радикалов в их органах и тканях, результатом чего является развитие деструктивных процессов на клеточном и органном уровне. Механизм формирования таких нарушений носит универсальный характер и проявляется в рассогласовании каскада реакций эндогенной антиоксидантной защиты, истощении пула эндогенных антиоксидантов (восстановленный глутатион), активизации свободно-радикальных реакций и, как следствие, повышении уровня перекисного окисления липидов, приводящее к формированию структурно-функциональных нарушений биологических мембран. При этом меняются естественные механизмы мембранного переноса ионов, что, в итоге приводит к развитию патологий в организме. Это в полной мере относится к естественному процессу старения, сердечно-сосудистым заболеваниям, воспалительным явлениям, болезням печени и, прямо или косвенно, к онкологическим заболеваниям.

Спрыгин Владимир Геннадьевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: vsprygin@poi.dvo.ru

Кушнерова Наталья Федоровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биохимии. E-mail: natasha50@mail.ru

Фоменко Светлана Евгеньевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии. E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Сизова Лилия Анатольевна, старший инженер лаборатории биохимии. E-mail: drugova_7@mail.ru

В современной клинической практике коррекция подобных нарушений нередко выполняется применением экзогенных антиоксидантов полифенольной природы [3] и комплексов эссенциальных фосфолипидов (ФЛ) [4], как источника пластических ресурсов для восстановления поврежденных мембранных структур. На протяжении многих лет и до настоящего времени основными источниками новых природных соединений были и остаются высшие наземные растения. При этом совершенно неоправданно недооценивается значение морских водорослей, в особенности бурых, которые могут служить практически неисчерпаемыми источниками, как полифенольных комплексов, так и комплексов эссенциальных ФЛ. Известно, что высокая практическая ценность альгинатов привела к тому, что переработка морских бурых водорослей направлена в основном на их получение. При этом из-за широкого диапазона температурных и кислотных характеристик процесса выделения альгината происходит необратимая деструкция таких важных биологически активных составляющих морских водорослей, как липидно-пигментная и полифенольная фракции. Одним из способов повышения эффективности переработки морских водорослей может быть введение этапа предварительной экстракции высушенного сырья водным раствором этилового спирта с концентрацией более 70%, что позволит извлекать основную часть липидно-пигментного комплекса и фракции олигомерных флоротаннинов, оставляя нетронутым полисахаридный комплекс.

Цель работы: проведение скринингового исследования ряда морских водорослей акватории залива Петра Великого Японского моря на предмет изучения количественного содержания и определения антирадикальной активности фракции полифенолов (ПФ), а также содержания и состава липидного комплекса из экстракта бурой водоросли *Laminaria japonica*.

Материалы и методы исследования. В работе использовали галловую кислоту (3,4,5-тригидроксibenзойную кислоту), 2,2'-азинобис-(3-этилбензотиозолин-6-сульфонат) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), обращеннофазовые колонки для экстракции ENVI C₁₈, (10 г) (Waters, USA). Все химические реактивы и растворители были категории не ниже «чда».

Морские водоросли, изученные в данном исследовании, включали следующие виды: бурые водоросли *Cystoseira crassipes*, *Sargassum pallidum*, *Agarum cribrosum*, *Laminaria cichorioides*, *Laminaria japonica*; зеленые водоросли *Ulva fenestrata*, *Codium fragile*; красные водоросли *Polysphytonia japonica*, *Ahnfeltia tobuchiensis*; морские травы *Zostera marina*. Образцы водорослей собирали в период с 1 июня по 30 сентября 2009-2011 гг. в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря. Собранные образцы промывали профильтрованной морской водой и обсушивали в тени на открытом воздухе. Далее водоросли сушили в помещении в потоке воздуха до суховоздушного состояния с остаточной влажностью 10-15%. Высушенные водоросли измельчали с помощью лабораторной мельницы Pulverisette 15 (Fritsch, Germany) до размера частиц 3-5 мм. Получение экстрактов проводили методом мацерации с 70% этиловым спиртом в течение 48 часов при периодическом перемешивании. Объем экстрагента на 100 г водоросли составлял 300 мл. Через 48 часов экстракт сливали, водоросли отжимали на сите и полученные извлечения объединяли. Для выделения полифенольной фракции 10 мл исходного экстракта упаривали на роторном испарителе ($t < 30^{\circ}\text{C}$) для удаления спирта и разводили дистиллированной водой до исходного объема. Полученный образец подкисляли 0,1 н HCl и экстрагировали петролейным эфиром 2 раза по 20 мл для удаления липофильных соединений. Затем образец наносили на экстракционную колонку ENVI C₁₈ и элюировали ее 50 мл воды (pH=7) для удаления углеводов, органических кислот и других соединений, не сорбирувавшихся на колонке. После просушивания колонки в токе азота, ПФ элюировали 20 мл метанола и использовали в дальнейшей работе. Суммарное содержание ПФ в выделенной фракции определяли с помощью реактива Фолина-Чокальтеу [1] и выражали в мг-экв галловой кислоты (ГК), которое определяли по калибровочной кривой в диапазоне 0-20 мкг ГК на пробу.

Уровень антирадикальной активности (АРА) определяли по способности полученных ПФ фракций восстанавливать стабильный катион-радикал ABTS^{•+} по методу, описанному в работе [6]. Количественно величину АРА выражали в μM ГК на 1 мг фракции общих полифенолов. Для этого строили калибровочный график в диапазоне от 0,46 до 11,04 нМ ГК. Значение величины ΔA_{734} в указанном диапазоне концентраций имело линейную зависимость от концентрации ГК. Каждое измерение проводили не менее 3 раз.

Суммарную липидную фракцию из экстракта *Laminaria japonica* получали по методу Фолча [2]. Для этого 10 мл исходного экстракта упаривали на роторном испарителе ($t < 30^{\circ}\text{C}$) для удаления спирта и разводили дистиллированной водой до исходного объема. Полученный образец подкисляли 0,1 н HCl и экстрагировали смесью растворителей хлороформ: метанол = 2: 1 два раза по 20 мл. Нижнюю фазу отбирали с помощью делительной воронки, упаривали на роторном испарителе и использовали в дальнейшей работе. Определение общих ФЛ в экстрактах и количественное определение отдельных фракций ФЛ проводили спектрофотометрически с помощью молибдатного реактива [8]. Фракционное разделение ФЛ осуществляли методом двумерной микротонкослойной хроматографии на силикагеле [7]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы ФЛ, соответственно. Результаты обрабатывали с помощью статистической программы InStat (Graph Pad Software Inc. USA, 2005).

Результаты и обсуждение. Как следует из таблицы 1 содержание ПФ соединений в различных видах водорослей существенно различается. Больше всего ПФ соединений было обнаружено в образцах, относящихся к классу бурых водорослей (*Cystoseira crassipes*, *Sargassum pallidum* и *Laminaria cichroides*), которое составляло, соответственно, 0,68%, 0,58 и 0,47% от сухого веса исходного сырья. Несколько меньше ПФ соединений содержат *Agarum cribrosum* и *Laminaria japonica* (0,15% от сухого веса). Однако необходимо отметить, что *Laminaria japonica*, несмотря на относительно невысокое содержание ПФ, представляет собой важный объект марикультуры и наряду с *Laminaria cichroides* широко используется в пищу. Вследствие этого человеческий организм эволюционно адаптирован к спектру биологически активных веществ, входящих в их состав, включая ПФ соединения и липидно-пигментный комплекс. Все это предполагает низкий уровень токсичности веществ в составе ламинарии, что, несомненно, дает преимущество данному виду сырья с точки зрения перспективы его использования для фармакологических целей.

Доминирующей группой ПФ в классе бурых водорослей являются флоротаннины, которые представляют собой полимеры флороглюкинола (1,3,5-тригидроксибензола) и, согласно литературным данным, могут составлять до 15% от сухого веса сырья [5]. Характерной чертой флоротаннинов вследствие особенности их химического строения является высокая антиоксидантная активность. Это определяется наличием разветвленной структуры сопряженных двойных связей, высокой подвижности и большого количества свободных гидроксильных групп. Химические соединения с таким строением способны выступать в роли самостоятельной буферной системы высокой емкости, обладающей выраженными доноро-акцепторными свойствами и способной вступать во взаимодействие со свободными радикалами, нейтрализуя их поражающее действие на биохимические системы организма. Это подтверждается высокой удельной АРА-фракции ПФ из бурых водорослей (табл. 1).

Таблица 1. Содержание и уровень АРА фракции ПФ соединений из морских водорослей прибрежной акватории залива Петра Великого Японского моря (M±m)

Виды водорослей	ОПФ мг-экв ГК/100 г сухой водоросли	АРА μМГК/мг
зеленые водоросли		
<i>Ulva fenestrata</i>	39,2±3,2	0,45±0,03
<i>Codium fragile</i>	30,9±2,1	0,21±0,02
бурые водоросли		
<i>Cystoseira crassipes</i>	683,9±34,6	4,88±0,31
<i>Sargassum pallidum</i>	583,8±30,5	4,46±0,25
<i>Agarum cribrosum</i>	153,6±9,2	3,56±0,21
<i>Laminaria cichorioides</i>	469,5±29,3	3,47±0,19
<i>Laminaria japonica</i>	156,8±8,6	1,94±0,15
красные водоросли		
<i>Polysiphonia japonica</i>	267,9±15,2	0,63±0,05
<i>Ahnfeltia tobuchiensis</i>	24,6±2,3	0,025±0,006
морские травы		
<i>Zostera marina</i>	82,0±5,1	1,88±0,25

Примечание: ОПФ – общая полифенольная фракция, АРА – антирадикальная активность, μМГК – микромоль галловой кислоты, ГК – галловая кислота

Содержание полифенольных соединений в изученных объектах относящихся к классу зеленых и красных водорослей незначительно, а уровень АРА фракции ПФ в разы ниже, чем таковой у образцов из класса бурых водорослей, что, по нашему мнению, обусловлено принадлежностью выделенной ПФ фракции к другому виду вторичных метаболитов ПФ природы. Поэтому в нашем случае они не представляют большого интереса как источники для выделения ПФ комплексов. Особо следует остановиться на классе морских трав, в частности, *Zostera marina*.

Морские травы, в отличие от бурых водорослей, содержат ПФ, которые по своему строению похожи на вторичные метаболиты наземных растений, имеющих флавоноидную структуру, что обуславливает достаточно высокий показатель удельной АРА, сравнимый с таковым у *Laminaria japonica*.

Наиболее эффективным способом сохранения структурно-функциональной целостности мембран является комплексное применение антиоксидантов и введение пластических ресурсов в виде добавки эссенциальных ФЛ для восстановления повреждений. В связи с этим нами был исследован состав липидной фракции, содержащейся в экстракте *Laminaria japonica*, с целью изучения возможности его применения в качестве источника эссенциальных ФЛ. Как следует из полученных результатов (табл. 2), экстракт из ламинарии японской содержит значимое количество общих липидов, которые составляют 0,9% от сухого веса водоросли, при этом 44% из них составляют эссенциальные ФЛ.

Таблица 2. Состав липидного комплекса из экстракта ламинарии японской (*Laminaria japonica*) M±m

Показатели	Единицы измерения	Количество
липиды		
общие	мг/г сух. водоросли	9,35±0,51
нейтральные	- « - « -	2,20±0,11
фосфолипиды	- « - « -	4,15±0,24
фосфолипиды		
фосфатидилхолин	% от суммы всех фракций	27,17±2,08
лизофосфатидилхолин		2,46±0,30
фосфатидилглицерин		18,97±1,40
фосфатидилэтаноламин		14,45±0,86
лизофосфатидилэтаноламин		1,44±0,18
фосфатидилсерин		4,38±0,41
фосфатидилинозит		3,98±0,15
фосфатидная кислота		20,40±2,61
дифосфатидилглицерин		6,75±0,09

В ходе изучения фракционного состава ФЛ было обнаружено, что основные структурные компоненты клеточных и субклеточных мембран (ФХ и ФЭ) составляют более 40% от суммы всех фракций. Также было отмечено высокое содержание фосфатидилглицерина (в среднем 20% от суммы фракций), который является основным ФЛ фотосинтетического аппарата водорослей. Фосфатидилглицерин является важным пластическим ресурсом, так как является предшественником дифосфатидилглицерина, основного ФЛ внутренней части мембраны митохондрий. По нашему мнению, одним из наиболее примечательных фактов, характеризующих состав ФЛ фракции *Laminaria japonica*, является высокое, более 20% от суммы фракций,

содержание фосфатидной кислоты. Она является важнейшим предшественником в биосинтезе ФЛ, что делает ее одним из наиболее значимых компонентов комплекса пластических ресурсов для восстановления структурно-функциональной целостности клеточных и субклеточных мембран. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что липидный комплекс, выделенный из экстракта *Laminaria japonica*, содержит в значительных количествах, как ФЛ являющиеся основными компонентами мембранного матрикса, так и целый ряд фракций, являющихся важнейшими предшественниками биосинтеза ФЛ в организме человека.

Выводы: на основании полученных результатов следует, что наиболее перспективными объектами для изучения и разработки безотходных технологий переработки морских макрофитов, включающих выделение ПФ фракции, являются *Laminaria cichorioides* и *Laminaria japonica*, *Sargassum pallidum*, *Cystoseira crassipes*, относящиеся к классу бурых водорослей. Выделенный из экстракта *Laminaria japonica* комплекс ФЛ характеризуется высоким содержанием основных компонентов мембранного матрикса – фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, а также важнейших предшественников биосинтеза ФЛ – фосфатидной кислоты и фосфатидилглицерина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *De Quiros, A.R.B.* Antioxidant compounds in edible brown seaweeds / *A.R.B. de Quiros, S. Frecha-Ferreiro, A.M. Vidal-Perez, J. Lopez-Hernandez* // *Eur. Food Res. Technol.* 2010. Vol. 231, N 3. P. 495-498.
2. *Folch, J.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / *J. Folch, M. Less, G.H. Sloane-Stanley* // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226, N 1. P. 497-509.
3. *Gordon, M.H.* Significance of Dietary Antioxidants for Health // *Int. J. Molec. Sci.* 2012. Vol. 13, N 1. P. 173-179.
4. *Gundermann, K.J.* Activity of essential phospholipids (EPL) from soybean in liver diseases / *K.J. Gundermann, A. Kuenker, E. Kuntz, M. Drozdzik* // *Pharm. Rep.* 2011. Vol. 63, N 3. P. 643-659.
5. *Ragan, M.A.* Phlorotannins, brown algal polyphenols / *M.A. Ragan, K.W. Glombitza* // *Progr. in Phycol. Res.* – *F. Round and D. Chapman.* Bristol: Biopress Ltd., 1986: Vol. 4. P. 177-241.
6. *Re, R.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / *R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente et.al.* / *Free Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 26, N 9-10. P. 1231-1237.
7. *Svetashev, V.I.* A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids / *V.I. Svetashev, V.E. Vaskovsky* // *J. Chromatography.* 1972. Vol. 67, N 2. P. 376-378.
8. *Vaskovsky, V.E.* A universal reagent for phospholipid analysis / *V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, I.M. Vasenden* // *J. Chromatography.* 1975. Vol. 114, N 1. P. 129-141.

MARINE ALGAE – PERSPECTIVE SOURCE OF POLYPHENOL ANTIOXIDANTS AND ESSENTIAL PHOSPHOLIPID COMPLEXES

© 2012 V.G. Sprygin, N.F. Kushnerova, S.E. Fomenko, L.A. Sizova

Pacific Oceanological Institute named after V.I. Ilyichev FEB RAS, Vladivostok

It was studied the contents of polyphenolic substances and its antiradical activity in number of marine algae belong to the class of brown, red and green algae and sea grasses from the littoral of Peter the Great bay (Vladivostok). It was shown, that polyphenols content in *Sargassum pallidum*, *Cystoseira crassipes* and *Laminaria cichorioides* up to 0,5% of the algae dry weight. Antiradical activity of the separated polyphenol complexes vary from 3.5 to 4.8 μ MGA/mg. It was studied the phospholipid pattern from brown algae *Laminaria japonica*. It was shown, that phospholipids contents makes up to 0,42% of the dry weight and featured by the high content of the main component of membrane matrix – phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine and also of important precursors of phospholipids biosynthesis – phosphatidic acid, and phosphatidylglycerol.

Key words: *polyphenolic substances, phlorotannins, essential phospholipids, algae processing*

Vladimir Sprygin, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: vsprygin@poi.dvo.ru

Nataliya Kushnerova, Doctor of Biology, Professor, Chief of the Biochemistry Laboratory. E-mail: natasha50@mail.ru

Svetlana Fomenko, Candidate of Biology, Leading Research Fellow at the Biochemistry Laboratory. E-mail: sfomenko@poi.dvo.ru

Liliya Sizova, Senior Engineer at the Biochemistry Laboratory. E-mail: drugova_7@mail.ru