

УДК 577.114.15.593.95

## ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *SACCHARINA CICHORIOIDES* (Miyabe) НА ПИЩЕВЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ, ОПЛОДОТВОРЕНИЕ И РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* A. AGASSIZ, 1863

© 2019 г. М. И. Киселева<sup>1</sup>\*, Н. В. Звягинцев<sup>1</sup>, С. П. Ермакова<sup>1</sup>, Т. Н. Звягинцева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,  
Владивосток 690022, Россия

\*e-mail: mikiseleva@mail.ru

Поступила в редакцию 23.11.2018 г.

После доработки 06.05.2019 г.

Принята к публикации 30.05.2019 г.

Исследовали действие веществ водно-этанольных и водных экстрактов из образцов свежей и разрушенной бурой водоросли *Saccharina cichorioides* второго года жизни и из экскрементов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, питавшегося этими образцами водоросли, на пищеварительный фермент 1,3-β-D-глюканазу, спермии, яйцеклетки и развивающиеся эмбрионы морского ежа. Анализировали выход, состав и структуру веществ из свежей и разрушенной *S. cichorioides* и из экскрементов морского ежа. Установлено, что из разрушенных талломов *S. cichorioides* морские ежи усваивали маннит, белки и практически полностью ламинаран. Обнаружение в водно-этанольных экстрактах разрушенных водорослей активаторов 1,3-β-D-глюканазы морского ежа и ингибиторов процессов оплодотворения в экстрактах свежей водоросли совпадает с натурными наблюдениями. Биохимическое исследование показало, что метаболиты *S. cichorioides* в значительной мере контролируют процессы пищеварения и размножения *S. intermedius*.

**Ключевые слова:** 1,3-β-D-глюканаза, пищеварительный фермент, спермии, яйцеклетки, эмбрионы, морской еж, оплодотворение, бурые водоросли, ламинараны, фукоиданы, ингибиторы, активаторы, пищеварение, размножение

DOI: 10.1134/S0134347519060044

Морские ежи (тип Echinodermata, класс Echinoidea) широко распространены в Мировом океане. К настоящему времени известно около 900 видов этих беспозвоночных; в России описано 20 видов. Многие морские ежи служат объектом промысла.

Обитающий у побережья Приморского края морской еж *Strongylocentrotus intermedius* — один из основных потребителей бурых водорослей, предпочтительно семейства Laminariaceae, в местах произрастания которых наблюдаются его массовые скопления. В зал. Петра Великого Японского моря среди представителей семейства ламинариевых наиболее широко представлена *Saccharina cichorioides* (см.: Белоус и др., 2013). Ранее при натурных наблюдениях на севере Приморского края было отмечено, что морские ежи практически не поедали свежую бурую водоросль *Saccharina japonica*. Животные, активно поедавшие талломы водоросли, встречались в октябре–ноябре, когда растения заканчивали свой жизненный цикл после спороношения. Морские ежи охотно

потребляли проростки и слоевища ламинарии в притопленных выбросах растений, которые, оторвавшись от грунта, побывали на берегу и были вторично смыты волнами в море (Крупнова, Павлючков, 2003). Чтобы объяснить пищевые предпочтения морского ежа, были применены биохимические методы (Агаркова и др., 2007).

Биохимические процессы во взаимодействиях популяций в водных биоценозах играют большую роль благодаря выделяющимся в воду метаболитам, представленным разными типами соединений (Fitton, 2003; Агаркова и др., 2007). Изучение биотических взаимоотношений серого морского ежа и ламинариевых водорослей, обитающих на одних и тех же участках, представляет несомненный научный и практический интерес при создании аквакультуры как морских ежей, так и ламинарии.

Известны работы по влиянию веществ, содержащихся в ламинариевых (*S. japonica*, *S. cichorioides*), на эмбрионы морских ежей (Nakamura, Moriya, 1999; Киселёва и др., 2005, 2015; Kiseleva et al.,

2008). В определенные моменты жизненного цикла бурых водорослей их метаболиты способны привлекать или отпугивать морских животных, проявляя в последнем случае защитные функции (Крупнова, Павлючков, 2003; Агаркова и др., 2005). Исследовано влияние некоторых низкомолекулярных соединений бурых водорослей (полифенолов, стероинов, галактолипидов, серной кислоты, сульфатированных углеводов) на сосуществование водорослей и морских животных (Steinberg, van Altena, 1992; Duggins, Eckman, 1997; Schnitzler et al., 1998; Pelletreau, Muller-Parker, 2002; Taylor et al., 2002; Deal et al., 2003). Описано влияние метаболитов водорослей на выбор пищи морскими травоядными животными и на процессы их оплодотворения (de Nys et al., 1991; Pawlik, 1992). Данные исследования в подавляющем большинстве были основаны на составлении искусственно приготовленных пищевых композиций, включавших водорослевые метаболиты, и на изучении их отпугивающего или привлекающего действия на морских животных.

Показано, что наземные растения защищаются от травоядных животных, синтезируя ингибиторы их пищеварительных ферментов — амилазы и/или протеиназы (Broadway, 1996; Ono et al., 2001). У морских беспозвоночных пищеварительными ферментами прежде всего являются ламинариказы (1,3-β-D-глюканазы) (Sova et al., 1970). Известно единственное сообщение о защите макрофитов от морских ежей путем синтеза водорослями эффекторов пищеварительных ферментов морского ежа (Агаркова и др., 2005). Объектом исследования послужила распространенная у северного побережья Приморья *S. japonica*. Сведения о веществах из морских макрофитов, которые усваиваются морскими ежами, и о механизмах действия выделенных из макрофитов соединений на жизнедеятельность этих иглокожих малочисленны (Усов, Чижов, 1988; Steinberg, van Altena, 1992; Агаркова и др., 2007; Киселёва и др., 2015).

Цель настоящей работы — выяснение механизма влияния веществ из морских макрофитов на биотические взаимоотношения морских ежей и бурых водорослей. Для этого проведено сравнение состава веществ в образцах двухгодичной водоросли *S. cichorioides* (свежей и разрушенной) и в экскрементах морского ежа *S. intermedius*, питающегося этими образцами; изучено действие полученных веществ на пищеварительный фермент морского ежа, а также на процессы оплодотворения и развития эмбрионов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования служили бурая водоросль *Saccharina cichorioides* и серый морской еж *Strongylocentrotus intermedius*, собранные в августе–октябре 2009, 2011, 2015, 2016 и 2017 годов в

б. Троица зал. Петра Великого Японского моря. Действие веществ из *S. cichorioides* на 1,3-β-D-глюканазу, спермии, яйцеклетки и развивающиеся эмбрионы морского ежа *S. intermedius* изучали на морской экспериментальной станции Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (Хасанский район, Приморский край). В лабораторных условиях получали мужские и женские гаметы *S. intermedius* и проводили оплодотворение в соответствии с предложенными ранее методиками (Бузников, Подмарёв, 1975; Dinnel et al., 1987; Киселёва и др., 2005).

В работе тестировали вещества водно-этанольных и водных экстрактов, выделенные из свежей или разрушенной после хранения на берегу под брезентом в течение 4 сут при температуре 23–25°C водоросли *S. cichorioides* второго года жизни, а также из экскрементов морских ежей, питавшихся этими образцами водоросли. Методика разрушения водоросли под брезентом позволяет искусственно создать образцы ламинарии с разрушающимся талломом. Условия разрушения водоросли подобраны ранее (Агаркова и др., 2007).

### Основные аналитические методы

Нейтральные сахара определяли фенол-серно-кислотным методом (Dubois et al., 1956). Содержание маннита определяли модифицированным методом Нэша (Vaskovsky, Isay, 1969), белка — методом Лоури (Lowry et al., 1951), полифенолов — реакцией Фолина–Чеколте (Parys et al., 2009). Свободные аминокислоты в экстрактах определяли на аминокислотном анализаторе Biotronik (Швеция) (прибор Alpha Plus LKB 4151, колонка Ultraras 4.50.5 мкм, 200 × 4.5 мм). Водорастворимые полисахариды (ламинаран и фукоидан) из *S. cichorioides* выделяли и определяли по методу Звягинцевой с соавторами (Zvyagintseva et al., 1999). Степень сульфатирования исследуемых фракций фукоидана определяли после гидролиза образцов 4N HCl при 100°C (2 ч) с помощью турбодиметрического метода (Dodgson, Price, 1962).

### ЯМР-спектроскопия

Спектры <sup>13</sup>C ЯМР фракций были получены на Bruker Avance-III 500 HD спектрометре (Bruker, Karlsruhe, Germany) при частоте 500 МГц и температуре 35°C с маннитом как внутренним стандартом.

### Изучение биохимических особенностей питания морского ежа *S. intermedius* сахаринной

Для эксперимента отобрали 60 экз. морских ежей, обитавших в зарослях *S. cichorioides*. После выдерживания животных в аэрируемом аквари-

уме с морской водой в течение 3–4 сут до полного освобождения пищеварительного тракта от экскрементов их поместили в два 70-литровых аквариума (по 30 экз.) с проточной аэрируемой морской водой. Содержали и кормили морских ежей в соответствии с ранее описанной методикой (Левин и др., 1987). Перед кормлением талломы свежей или разрушенной водоросли разрезали вдоль; одну половину таллома использовали в качестве контроля (К1 или К2 соответственно), другой половиной кормили морских ежей: в одной емкости — свежей водорослью, в другой — разрушенной. Корм морским ежам давали ежедневно, и также ежедневно сифоном собирали выделенные ими экскременты (О1 и О2 — экскременты животных, питавшихся соответственно свежей и разрушенной водорослью).

Пищевую привлекательность оценивали как разницу в процентах между сухой массой контрольных образцов водоросли ( $P_K$ ) и соответствующих экскрементов морского ежа ( $P_O$ ) по формуле:  $(P_K - P_O)/P_K \times 100\%$ .

Образцы, полученные из свежей и разрушенной водоросли и из экскрементов морского ежа (оба варианта), последовательно экстрагировали водным этанолом и водой. Экстракты использовали для сравнительной характеристики состава и биологических свойств веществ, содержащихся в разных образцах.

#### *Получение водно-этанольных экстрактов из *S. cichorioides**

Образцы *S. cichorioides* и экскрементов морского ежа экстрагировали этанолом (1 л этанола на 1 кг водоросли) при комнатной температуре в течение 2 нед. Водно-спиртовые экстракты высушивали под вакуумом и использовали в экспериментах в виде водных растворов. Остатки водоросли сушили для выделения полисахаридов.

#### *Получение полисахаридов*

Обезжиренный остаток *S. cichorioides* экстрагировали водой для извлечения полисахаридов, используя ранее описанные методы (Zvyagintseva et al., 1999, 2003). Ламиран и фукоидан разделяли с помощью хроматографии на гидрофобном носителе Полихром-1 (ПХ-1) — коммерческом препарате производства “Реахим” (Россия).

#### *Получение фермента и определение его активности*

Эндо-1,3-β-D-глюканазу (ламириназу ЛЕ) выделяли из пищеварительного тракта серого морского ежа *S. intermedium* по предложенному ранее методу (Сова и др., 2003). Активность 1,3-β-

D-глюканазы определяли по увеличению содержания восстанавливающих сахаров методом Нельсона (Nelson, 1944). В качестве субстрата использовали ламинаран из *S. cichorioides* (1 мг/мл) в 0.05 М сукцинатном буфере, pH 5.2. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль глюкозы за 1 мин в условиях определения.

#### *Влияние водно-этанольных экстрактов из *S. cichorioides* на активность 1,3-β-D-глюканазы *S. intermedium**

Водно-этанольные экстракты и 1,3-β-D-глюканазу разводили 0.025 М сукцинатным буфером (pH 5.2). Действие экстрактов на активность фермента определяли при концентрации от 0 до 600 мкг/мл. Растворы фермента и экстракта смешивали и инкубировали при температуре  $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. После добавления ламинарана (1 мг/мл) реакцию проводили в течение 20 мин при  $37^\circ\text{C}$  и определяли восстанавливающие сахара (Nelson, 1944). Оптическую плотность измеряли при  $\lambda = 750$  нм на спектрофотометре BioTek PowerWave XS (США) относительно соответствующих контрольных растворов. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяли по калибровочной кривой, используя глюкозу как стандарт.

#### *Выделение половых продуктов и оплодотворение *S. intermedium**

Самок и самцов отловленных морских ежей содержали в отдельных аквариумах; нерест стимулировали механическим встряхиванием. Яйцеклетки 2–3 раза промывали фильтрованной морской водой и пропускали через мельничный газ (размер ячеек  $100 \times 100$  мкм). Перед началом опытов проводили пробное оплодотворение. В опытах использовали яйцеклетки, степень оплодотворения которых составляла не менее 98%. Время от получения яйцеклеток до их осеменения — не более 1 ч.

Для определения действия водно-этанольных экстрактов и полисахаридов из разных образцов *S. cichorioides* на оплодотворяющую способность сперматозоидов морского ежа *S. intermedium* использовали стандартный протокол ОСС-биотеста (Диннел, 1995). Сперматозоиды ( $1.5 \times 10^7$  кл/мл) или зрелые яйцеклетки ( $2.5 \times 10^3$  кл/мл) предварительно выдерживали в фильтрованной морской воде в течение 30 мин с разными концентрациями исследуемых веществ (5–1000 мкг/мл). Затем суспензию спермиев (100 мкл) добавляли к 1 мл суспензии яйцеклеток ( $2.5 \times 10^3$  кл/мл) в морской воде. Влияние водно-этанольных экстрактов и полисахаридов на оплодотворение оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа “Motic AE 21” (Китай) по количеству опло-

**Таблица 1.** Состав веществ из свежей и разрушенной *Saccharina cichorioides* второго года жизни и из экскрементов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, питавшегося этими водорослями

Образец	Выход, %		Вещества, растворимые в водном этаноле, %			Водорастворимые вещества, %			
	обезжиренной водоросли <sup>1</sup>	веществ, растворимых в водном этаноле <sup>1</sup>	маннит <sup>2</sup>	полифенолы <sup>2</sup>	свободные аминокислоты <sup>2</sup>	выход <sup>3</sup>	белок <sup>4</sup>	ламинаран <sup>4</sup>	фукоидан/сульфаты <sup>4</sup>
K1	17.2	10.0	20.1	10.3	1.3	11.5	6.5	6.5	8.2/26
O1	6.3	19.0	9.7	н.о.	0.1	25.6	1.5	0.4	13.8/н.о.
K2	13.0	20.6	25.3	4.1	н.о.	16.2	3.0	25.3	10.7/н.о.
O2	6.1	19.8	5.3	н.о.	н.о.	30.5	0.8	1.3	19.3/н.о.

Примечание. Обозначения образцов здесь и в табл. 2–4: K1 – свежая водоросль; O1 – экскременты морского ежа, питавшегося свежей водорослью; K2 – разрушенная водоросль; O2 – экскременты морского ежа, питавшегося разрушенной водорослью. Процент: <sup>1</sup>от массы сырой водоросли; <sup>2</sup>от выхода веществ, растворимых в водном этаноле; <sup>3</sup>от массы обезжиренной водоросли; <sup>4</sup>от выхода водорастворимых веществ; н.о. – не определяли.

дотворенных яйцеклеток и дальнейшему развитию эмбрионов. В камере Горяева определяли степень оплодотворения (%), затем рассчитывали концентрацию веществ, при которой ингибирование оплодотворения составляло 50% (IC<sub>50</sub>) или 100% (IC<sub>100</sub>). Оплодотворение и инкубирование эмбрионов проводили при температуре 20 ± 0.5°C.

#### *Влияние экстрактов и полисахаридов из S. cichorioides на развивающиеся эмбрионы S. intermedius*

Жизнеспособность (продолжительность жизни) и выживаемость (изменения в стадиях развития, аномалии, гибель) эмбрионов морского ежа определяли после добавления экстрактов и полисахаридов из *S. cichorioides* в концентрации от 5 до 1000 мкг/мл в инкубационную смесь через 3–5 мин после оплодотворения яйцеклеток (стадия зиготы) (Киселёва и др., 2005). Инкубационная смесь состояла из 0.9 мл суспензии оплодотворенных яйцеклеток (2.5 × 10<sup>3</sup> кл/мл морской воды) и 0.1 мл раствора испытуемых веществ в морской воде. Эмбрионы с испытуемыми веществами инкубировали в течение 1–2 нед. (Киселёва и др., 2015); через каждые 3 сут инкубации во все пробы добавляли по 0.5 мл фильтрованной морской воды.

Достоверность полученных данных оценивали с помощью t-критерия Стьюдента в условиях заданной доверительной вероятности с использованием программы SigmaPlot 2000, версия 6.0 (SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс), с уровнями значимости  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты изучения пищевой привлекательности образцов свежей и разрушенной водоросли показали, что морские ежи съедали 3–5% свежей водоросли и 50–75% разрушенной.

#### *Выход и состав веществ из свежей и разрушенной S. cichorioides и из экскрементов морских ежей, питавшихся этими водорослями*

Содержание сухого вещества в разрушенной водоросли и в экскрементах морских ежей после употребления ими как свежей, так и разрушенной водоросли было в 1.5–3.0 раза меньше, чем в свежей водоросли. Данные о выходе некоторых веществ, экстрагированных водным этанолом (маннит, полифенолы, свободные аминокислоты) и водой (фукоидан, ламинаран, белок) из свежей и разрушенной водоросли и из экскрементов морских ежей, питавшихся образцами водоросли, представлены в табл. 1. Сведения о выходе полисахаридов, а также моносахаридный состав ламинаранов и фукоиданов, полученных из разных образцов водоросли водной экстракцией, приведены в табл. 2.

В <sup>13</sup>C-ЯМР-спектрах ламинаранов, выделенных из всех образцов, основными были сигналы, характерные для 1,3-β-D-глюканов C1 (104.08 м.д.), C2 (74.9 м.д.), C3 (86.1 м.д.), C4 (69.85 м.д.), C5 (77.3 м.д.) и C6 (62.47 м.д.). В качестве минорных отмечены сигналы, характерные для β-1,6-связанных остатков D-глюкозы и маннита. <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры ламинаранов, полученные из разных образцов водоросли, оказались подобны друг другу и аналогичны <sup>13</sup>C-ЯМР-спектрам ламинаранов, известным из литературы (Zvyagintseva et al., 2003).

<sup>13</sup>C-ЯМР-спектры фукоиданов, выделенных из свежей (K1) и разрушенной (K2) *S. cichorioides*, а также из экскрементов *S. intermedius* (O1 и O2 соответственно), приведены на рис. 1.

#### *Влияние экстрактивных веществ из разных образцов S. cichorioides на активность ламинариназы, оплодотворение и развитие эмбрионов морского ежа S. intermedius*

Водно-этанольный экстракт из разрушенного образца водоросли содержал вещества, которые в

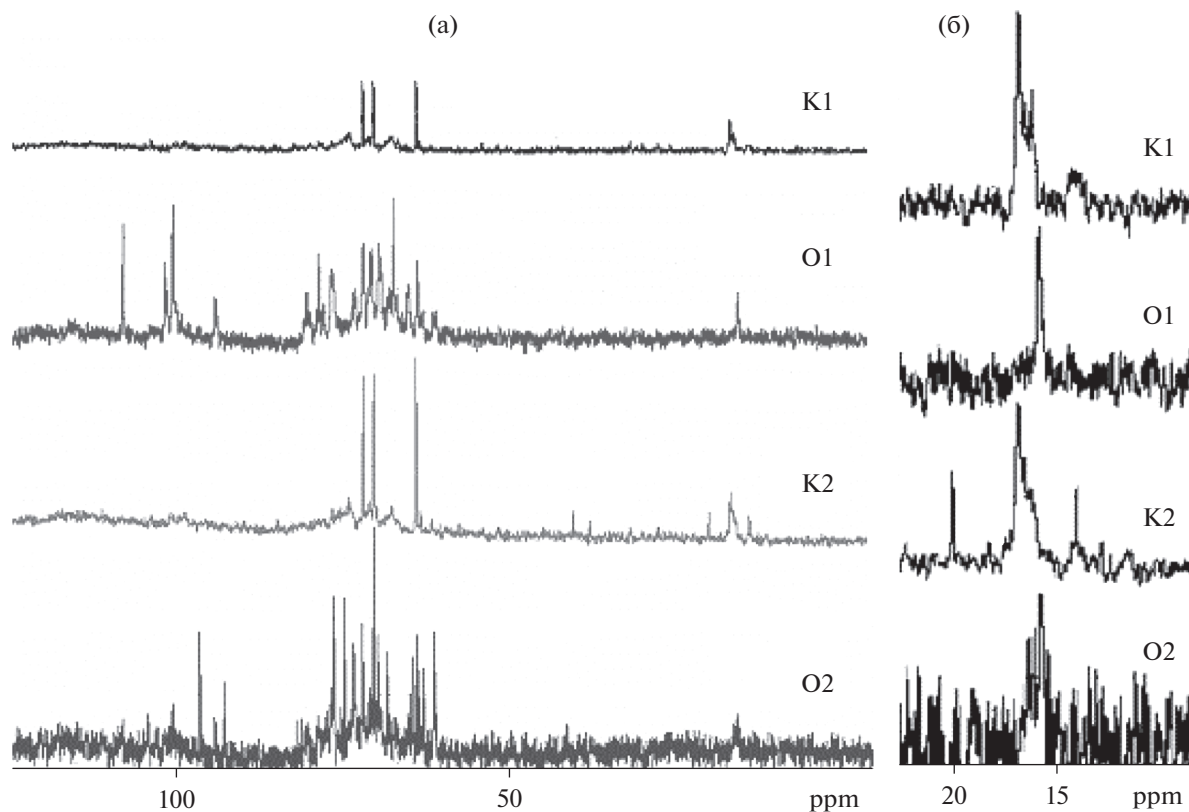
**Таблица 2.** Характеристика полисахаридов, полученных после разделения на гидрофобном носителе Полихром-1 (ПХ-1) водных экстрактов свежей и разрушенной *Saccharina cichorioides* и экскрементов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, питавшегося этими водорослями

Образец	Вещества, нанесенные на ПХ-1		Выход и характеристика веществ, элюированных с ПХ-1					
			Элюенты					
			H <sub>2</sub> O (фукоидан)			этанол–вода, 15% (ламинаран)		
	масса, мг	углеводы*, %	выход, мг	углеводы*, %	моносахаридный состав, % Fuc/Gal/Xyl/Glc/Man/Rha	выход, мг	углеводы*, %	Glc
K1	1000	73.5	422.5	82	93.8/1.2/2.4/0.5/1.4/0.5	281	92.5	100
O1	760	59	490.4	47	54.7/21.2/5.2/5.3/11.3/2.3	24	49.3	98.2
K2	1011	48.5	258	64	84.6/10.6/2.8/0.0/2.0/0.0	403	100	99.4
O2	1005	39	400	44	51.8/24.1/1.7/4.6/12.1/5.8	73	27	97.3

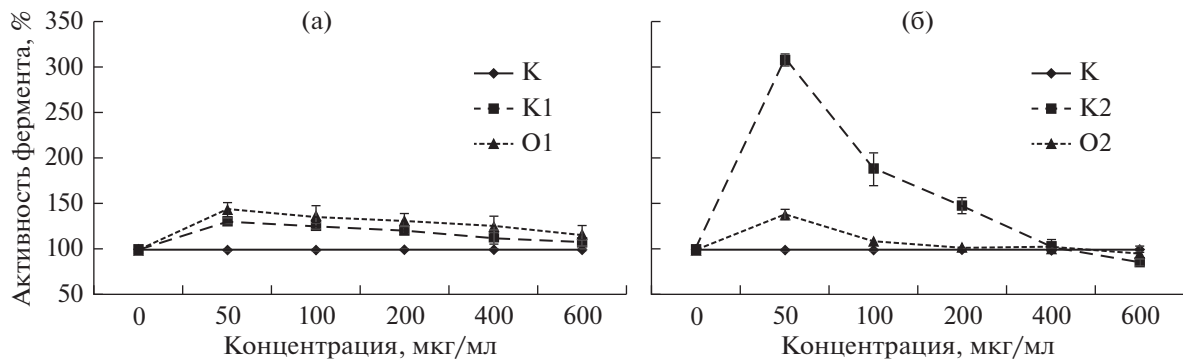
\* Содержание углеводов (% от навески) в исследованных образцах.

3.2 раза активировали ламинариназу морского ежа (рис. 2б). Водно-этанольные экстракты из других образцов водоросли активировали фермент в 1.4–1.8 раза (рис. 2а). При увеличении концентрации экстрактивных веществ активация фермента уменьшалась.

Водно-спиртовой экстракт из свежесобранной бурой водоросли *S. cichorioides* (K1) вызывал 50% ингибирование спермиев морского ежа при концентрации экстракта 100 мкг/мл (рис. 3а). Это указывает на присутствие в свежих водорослях веществ, оказывающих ингибирующее дей-



**Рис 1.** ЯМР-спектры фукоиданов. а – <sup>13</sup>С-ЯМР-спектры фукоиданов, выделенных из свежей (K1) и разрушенной (K2) водоросли *Saccharina cichorioides* и из экскрементов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, питавшегося свежей (O1) и разрушенной (O2) водорослями; б – сигналы С6 остатка фукозы в увеличенном масштабе.



**Рис 2.** Влияние на активность 1,3-β-D глюканазы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* веществ, извлеченных водным этанолом из образцов свежей водоросли *Saccharina cichorioides* (а) и экскрементов питавшегося ею морского ежа, а также из образцов разрушенной водоросли и соответствующих экскрементов морского ежа (б). Обозначения образцов, как на рис. 1. К – активность фермента в стандартных условиях принята за 100%. Приведены данные пяти экспериментов в трех повторах; доверительный интервал  $p \leq 0.05$ .

ствии на процессы оплодотворения *S. intermedius*. Вещества из разрушенной водоросли вызывали 50% ингибирование спермиев морского ежа при концентрации экстракта 375 мкг/мл (рис. 3а), а яйцеклеток – при концентрации  $\geq 1000$  мкг/мл. Вещества, выделенные из водно-спиртовых экстрактов экскрементов морского ежа после кормления животных обоими образцами водоросли, незначительно ингибировали оплодотворение, особенно после обработки ими яйцеклеток (рис. 3). Выделенные из водных экстрактов водоросли и из экскрементов морского ежа полисахариды до концентрации 1000 мкг/мл не оказывали ингибирующего действия на сперматозоиды и яйцеклетки морского ежа.

Вещества, извлеченные из водно-этанольных экстрактов свежей водоросли, обладали сильным токсическим действием при концентрации 100 мкг/мл и более. Экстракт свежей водоросли в концентрации 250 мкг/мл уже через 12 ч инкубации вызывал аномалии и гибель 50% эмбрионов (табл. 3). В концентрации  $\geq 500$  мкг/мл экстракт вызывал аномалии и гибель большинства эмбрионов на ранних стадиях. Водно-этанольные экстракты из разрушенной водоросли и экскрементов морского ежа не были токсичны по отношению к эмбрионам. Более того, выделенные из экскрементов морского ежа вещества оказывали положительное действие, увеличивая жизнеспособность эмбрионов до 30% (табл. 3).

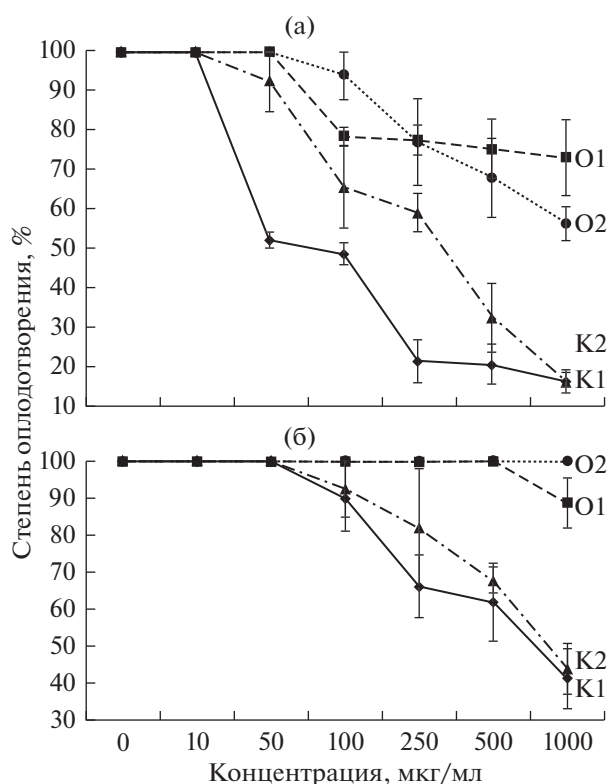
Водные экстракты из водоросли и из экскрементов морского ежа оказывали положительное действие на жизнеспособность эмбрионов. При обработке оплодотворенных яйцеклеток экстрактами из водоросли в концентрации 500–1000 мкг/мл продолжительность жизни эмбрионов увеличивалась в 1.5–2.5 раза. Экстракты из экскрементов оказывали положительное действие на эмбрионы в концентрации  $\geq 50$  мкг/мл (табл. 4). Влияние на

развитие морских ежей индивидуальных полисахаридов, полученных из этих экстрактов, различалось. Так, ламинаран из свежей и разрушенной водоросли в низких дозах (10–250 мкг/мл) не влиял на жизнеспособность эмбрионов, однако увеличение концентрации до 500–1000 мкг/мл приводило к аномалиям и ранней гибели эмбрионов (табл. 4). Ламинаран из экскрементов, полученных после кормления морских ежей разрушенной водорослью, не оказывал какого-либо влияния на эмбриональное развитие. Фукоидан из всех образцов водоросли увеличивал жизнеспособность эмбрионов преимущественно в низких дозах ( $\geq 10$  мкг/мл). Фукоидан из экскрементов, наоборот, заметнее увеличивал их жизнеспособность в более высоких дозах ( $\geq 250$  мкг/мл). В присутствии фукоиданов продолжительность жизни эмбрионов увеличивалась в 2 раза (табл. 4). Отметим, что более благоприятное влияние на развивающиеся эмбрионы оказывал фукоидан из разрушенной водоросли.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее сообщалось, что морские ежи практически не едят свежие водоросли, но активно поедают разрушающиеся в конце жизненного цикла растения (Крупнова, Павлючков, 2003). Сравнительное исследование пищевой привлекательности свежей и разрушенной водоросли *S. cichorioides* подтвердило эти наблюдения и показало, что морской еж *S. intermedius* почти не питался свежими растениями, но за сутки съедал более 50% разрушенной *S. cichorioides*. Для выяснения причин предпочтения морским ежом разрушающихся водорослей исследовали влияние на пищеварительный фермент, оплодотворение и развитие эмбрионов морского ежа водно-этанольных экстрактов из свежей и разрушенной водоросли, а также из экскрементов, полученных после поедания жи-





**Рис. 3.** Влияние веществ, извлеченных водным этанолом из разных образцов бурой водоросли *Saccharina cichorioides* и из экскрементов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, питавшегося свежими и разрушенными водорослями, на оплодотворение после обработки спермиев (а) и неоплодотворенных яйцеклеток (б). Обозначения образцов, как на рис. 1. Действие веществ в концентрации выше 1000 мкг/мл не исследовали. Приведены данные пяти экспериментов в трех повторах; доверительный интервал  $p \leq 0.05$ .

вотными этих образцов водоросли. Было выяснено, как изменяются выход и состав ключевых веществ в процессе разрушения и поедания водоросли морским ежом, что позволило определить спектр веществ, усваиваемых этими животными.

#### *Выход и состав веществ из образцов свежей и разрушенной *S. cichorioides**

Состав веществ водно-этанольных и водных экстрактов различался в зависимости от образца *S. cichorioides* (табл. 1). Доля водорастворимых веществ значительно возрастала в разрушенной водоросли и в экскрементах животных при обоих вариантах кормления. Показано, что морской еж хорошо усваивал маннит (особенно из разрушенной водоросли), аминокислоты, белок и ламинаран (табл. 1), но не усваивал фукоидан. Более того, в экскрементах животных в 1.5 и в 2 раза увеличивалось относительное количество фукоидана по сравнению с его содержанием в свежей и разру-

шенной *S. cichorioides* соответственно. Ранее было показано, что экскременты морского ежа, питавшегося *S. japonica*, содержали в 3–5 раз больше фукоидана, чем контрольные образцы водоросли (Агаркова, 2007). Это значительно выше количества фукоидана, содержавшегося в экскрементах животных, питавшихся *S. cichorioides*. Различия касаются и структурных характеристик фукоиданов. В экскрементах морского ежа, питавшегося *S. japonica*, фукоидан являлся гетерополисахаридом, а в экскрементах животных, питавшихся *S. cichorioides*, – галактофукоаном, обогащенным остатками маннозы (табл. 2).

#### *Характеристика полисахаридов водных экстрактов из разных образцов *S. cichorioides**

Полисахариды были выделены из всех образцов водоросли. Сравнительное изучение деталей их структуры химическими методами (табл. 2) и ЯМР-спектроскопией показало, что ламинараны из исследуемых образцов являлись 1,3;1,6- $\beta$ -D-глюканами, имевшими не более 10%  $\beta$ -1,6-связанных остатков D-глюкозы в качестве разветвлений, что типично для основной структурной группы этих полисахаридов (Zvyagintseva et al., 2003). По сравнению с исходными водорослями, в экскрементах морского ежа возрастала доля фукоидана и значительно изменялась его структура (табл. 2, рис. 1). Ранее установлено, что фукоидан свежей *S. cichorioides* представляет собой сполна сульфатированный 1,3- $\alpha$ -L-фукоан (Zvyagintseva et al., 2003). Из свежей *S. cichorioides* нами выделен высокосульфатированный фукоидан (сигналы при 17 м.д. наиболее интенсивные) (рис. 1), что согласуется с литературными данными. Фукоидан, выделенный из экскрементов, был гетерогенен, и кроме остатков фукозы в его состав в заметных количествах входили остатки маннозы и галактозы (табл. 2, рис. 1).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры нативных фукоиданов трудно интерпретируемые, но отчетливо отражают качественные различия между фукоиданами, выделенными из свежей и разрушенной *S. cichorioides*, а также из экскрементов морского ежа (рис. 1). В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах фукоиданов можно выделить сигналы C6 остатков фукозы (16–17 м.д., см. рис. 16) и соотнести эти сигналы со степенью сульфатирования. Сигналы при 16 м.д. принадлежат слабосульфатированным, а при 17 м.д. – высокосульфатированным остаткам фукозы. Фукоидан, выделенный из экскрементов морского ежа, низкосульфатирован (наиболее интенсивные сигналы при 16 м.д., см. рис. 1). Таким образом, в процессе переваривания водоросли животными фукоидан не усваивается, но видоизменяется: уменьшается степень его сульфатирования (рис. 1). Выделенные из исходных образцов *S. cichorioides* фукоиданы содержат примесь маннита (сигналы, соответствующие манниту: 64, 70

**Таблица 3.** Влияние на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* добавленных на стадии зиготы водно-этанольных экстрактов из разных образцов *Saccharina cichorioides*

Образец	Концентрация экстракта, мкг/мл	Время инкубации после оплодотворения, сут					Продолжительность жизни, сут
		0.5	1.5	2.5	5	10	
		Стадии развития**					
К	0.0	11 < 12	22–23	23–24	25–26, ан. 30%	25–26, ан. 10%, Г 30%	10.0 ± 1.5
K1	10–100*	11–12	23–24	23–24	23–25, ан. 50%	26, ан. 50%	10.0 ± 1.5
	250	10–11, ан. 50%, Г 50%	21–22, ан. 50%, Г 50%	22–23, ан. 50%, Г 50%	23–24, ан. 50%, Г 90%	Г	5.5 ± 1.5
	500–1000	10–11, ан., Г 90%	Г	–	–	–	1.0 ± 0.5
O1	10–1000	11–12, ан. 10%	22–24, ан. 10%	24–25, ан. 10%	24–25, ан. 50%, Г 30%	25–26, ан. 50%, Г 50%	13.0 ± 1.0
K2	10–250	11–12, ан. 10%	22–23, ан. 10%	23–25, ан. 10%	24–26, ан. 10%, Г 30%	25–26, ан. 10%, Г 50%	11.5 ± 1.5
	500–1000	10–12, ан. 20%	21–22, ан. 10%, Г 50%	21–23, ан. 10%, Г 50%	24–26, ан., Г 50%	25–26, ан., Г 70%	10.0 ± 1.5
O2	10–500	11 < 12	23 < 24, ан. 10%	23–25, ан. 50%, Г 10%	24–26, ан. 50%, Г 20%	25–26, ан. 50%, Г 50%	10.0 ± 0.5
	750–1000	11 < 12, ан. 10%	23 < 24, ан. 10%	23–24, ан. 10%, Г 30%	25–26, ан. 50%, Г 30%	25–26, ан. 50%, Г 60%	13.5 ± 0.5

Примечание. \*Интервал означает, что в пределах обозначенной концентрации результаты действия постоянны. \*\*Стадии развития: 10 и 11 – средняя бластула 1 и 2 соответственно; 12 – поздняя бластула 1; 21 – стадия призмы 2; 22, 23 и 24 – ранний плутеус 1, 2 и 3 соответственно; 25 и 26 – средний плутеус 1 и 2 соответственно (Бузников, Подмарев, 1975); плотность клеток в инкубационной среде 2500/мл. Обозначения: Г – гибель эмбрионов; ан. – аномальное развитие эмбрионов. Действие веществ в концентрации выше 1000 мкг/мл не исследовали. Приведены результаты пяти экспериментов, доверительный интервал  $p \leq 0.05$ .

и 72 м.д.). В экскрементах морских ежей исчезают сигналы, принадлежащие манниту (рис. 1), что подтверждает его усвоение животными (табл. 1). Таким образом, сравнение химического состава экскрементов с исходными образцами позволило идентифицировать ряд веществ, усваиваемых морскими ежами. Ранее подобные данные были получены для *Saccharina japonica*, поедающую которую морские ежи также усваивали маннит и аминокислоты, но не усваивали фукоидан (Агаркова и др., 2005, 2007).

*Влияние водно-этанольных экстрактов из разных образцов водоросли на активность ламинариназы S. intermedius*

Привлечение морских животных или защита от животных, поедающих водоросли, могут быть связаны с индукцией водорослями биосинтеза веществ, активирующих или подавляющих ферменты пищеварительного тракта животных. В во-

доросли при разрушении накапливается активатор пищеварительного фермента морского ежа  $1 \rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-}$ глюканазы. Действие активатора достигает максимума при концентрации 50 мкг/мл и уменьшается с увеличением концентрации (рис. 2). Возможно, это связано с присутствием в экстракте ингибитора ламинариназы морского ежа, действие которого начинает проявляться при высоких концентрациях экстракта. В свежей водоросли и в экскрементах животного содержание активатора намного меньше (рис. 2). Таким образом, при разрушении водоросли накапливаются вещества, активирующие пищеварительный фермент морского ежа, что хорошо согласуется с наблюдаемым в природе предпочтением морскими ежами разрушенных водорослей в качестве пищи (Крупнова, Павлючков, 2003). Ранее было установлено, что маннит, глутаминовая кислота и флоротанины не влияют на активность  $1 \rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D-}$ глюканазы *S. intermedius* (Агаркова и др., 2007). Химическую природу активатора предстоит выяснить.



**Таблица 4.** Влияние на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* полисахаридов до и после разделения водных экстрактов из разных образцов *Saccharina sichoioides* и экскрементов морского ежа на гидрофобном носителе Полихром-1

Полисахариды	Концентрация экстракта, мкг/мл	Время инкубации после оплодотворения, сут					Продолжительность жизни, сут
		0.5	1.5	3.5	5		
		Стадии развития**					
Контроль	Морская вода	10–11	22–23, Г 5%	23–25, ан. 30%, Г 70%	24–25, ан. 30%, Г 70%	10.0 ± 1.5	
К1 Н <sub>2</sub> О-экстракт (фукоидан и ламинаран) Н <sub>2</sub> О-фракция (фукоидан) 15% этанол (ламинаран)	10–250*	10–11	22–23	25	26	12.0 ± 1.5	
	500–1000	10–11	22–23	23–25, ан. 30%	24–25, ан. 60%, Г 10%	19.5 ± 2.0	
	10–250	10–11	22–23	24–25	25–26, ан. 10%	13.0 ± 1.0	
	500–1000	9–10 > 11	22–23, ан. 10%, Г 5%	24–25, ан. 10%, Г 50%	25–26, ан. 25%, Г 50%	10.5 ± 1.5	
	10–250	10–11	22–24, ан. 5%, Г 10%	24, ан. 30%, Г 10%	25–26, ан., Г, Л 50%	12.0 ± 1.5	
500–1000	9–10 > 11, ан. 5%	22–24, ан. 15%, Г 30%	24, ан., Г 95%	Г	4.0 ± 1.0		
О1 Н <sub>2</sub> О-экстракт Н <sub>2</sub> О-фракция (фукоидан)	10–25	10–11	22–23	24–26, ан. 30%	26, ан. 30%, Г 10%	10.0 ± 2.0	
	50–1000	10–11	22–23, ан. 50%	24–26, ан. 50%	26, ан. 50%, Г 10%	15.5 ± 1.5	
	10–100	10–11	22–23	23–25, ан. 50%, Г 30%	25–26, ан., Г 40%	11.5 ± 2.0	
	250–1000	10–11	22–23, ан. 10%, Г 20%	25–26, ан. 10%, Г 20%	25–26, ан., Г 20%	19.5 ± 1.5	
	10–250	11 > 12	22–23	24–25	25–26	13.5 ± 1.0	
К2 Н <sub>2</sub> О-экстракт Н <sub>2</sub> О-фракция (фукоидан) 15% этанол (ламинаран)	500–1000	11	22–23	24–26, ан. 30%	25–26, ан. 30%	25.0 ± 3.0	
	10–100	10–12	22–24	24–25, ан. 30%	25–26, ан. 30%, Г 5%	18.0 ± 2.0	
	250–500	9 < 10–11	22–24, ан. 5%, Г 10%	24–25, ан. 5%, Г 30%	25–26, ан. 50%, Г 40%	15.5 ± 2.0	
	1000	8–9 < 10 > 11, ан.	21–23, ан. 10%, Г, Л 30%	21–24, ан., Г, Л 40%	24, ан., Г, Л 50%	10.5 ± 2.0	
	10–250	10–11	22–24	24–25	25–26, Г 50%	10.5 ± 1.0	
500–1000	8–9 < 10 > 11, ан.	22–24, ан., Г 5%	24–25, ан., Г 75%	Г	4.5 ± 0.5		
О2 Н <sub>2</sub> О-экстракт Н <sub>2</sub> О-фракция (фукоидан) 15% этанол (ламинаран)	10–50	11 > 12	22–23	24–26, ан. 20%	25–26, ан. 40%, Г 10%	13.0 ± 1.5	
	100–1000	11	22–24, ан. 10%	24–26, ан. 40%	25–26, ан. 50%	21.5 ± 1.0	
	10–100	10–11	22–24, ан. 5%	24–25, ан. 5%, Г 30%	24–25, ан. 5%, Г 35%	13.5 ± 1.5	
	250–1000	10–11	22–24	25, Г 30%	25, ан. 50%, Г 40%	18.0 ± 2.0	
	10–1000	10–11	23–24, ан. 10%, Г 15%	24–25, ан. 10%, Г 30%	25, ан. 50%, Г 50%	10.5 ± 0.5	

Примечание. Вещества добавляли на стадии зиготы. Названия образцов, как в табл. 1 и 2. \*\*Стадии развития: 8, 9 – ранняя бластула 1 и 2 соответственно. Л – лизис бластомеров. Остальные стадии развития и обозначения, как в табл. 2 и 3.

*Влияние водно-этанольных экстрактов  
из разных образцов водоросли на оплодотворение  
и развитие эмбрионов морского ежа*

Полученные из бурых водорослей вещества, растворимые в водном этаноле, ингибируют процессы оплодотворения морского ежа, причем сперматозоиды более чувствительны к воздействию, чем яйцеклетки (рис. 3), что согласуется с литературными данными (Диннел, 1995; Киселёва и др., 2015). Экстрактивные вещества из свежей водоросли оказывали более сильное ингибирующее действие на оплодотворение, чем вещества из разрушенной водоросли (рис. 3). Таким образом, в зарослях, состоящих из крепких растений, процесс размножения морских ежей под воздействием выделяемых растениями веществ ингибируется более эффективно, чем среди разрушающихся талломов. Наблюдения за морскими ежами в природе подтверждают, что они охотнее заселяют заросли, состоящие из разрушающихся талломов водорослей, которые служат пищей и способствуют процессу размножения этих животных.

Водно-этанольные экстрактивные вещества из разрушенной водоросли и из обоих вариантов экскрементов стимулировали развитие эмбрионов, увеличивая продолжительность их жизни на 15–30% по сравнению с таковой в контроле. Это хорошо согласуется с тем, что в природе морские ежи предпочитают размножаться вдали от растущих водорослей (Крупнова, Павлючков, 2003).

Водные экстракты из образцов водоросли и полученные из них полисахариды оказывали положительное действие на развивающиеся эмбрионы (табл. 4), за исключением ламинарана в высокой дозе ( $\geq 500$  мкг/мл) как из свежей, так и из разрушенной водоросли.

Таким образом, пищевая привлекательность разрушенных или разрушающихся талломов бурой водоросли *S. cichorioides*, вероятно, обусловлена наличием в них активатора  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -D-глюканазы – пищеварительного фермента морского ежа, что, возможно, характерно и для других бурых водорослей. Химическая природа веществ, активирующих  $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -D-глюканазу морского ежа, может различаться. Кроме этого, среди вторичных метаболитов свежей бурой водоросли *S. cichorioides*, которые извлекаются водным этанолом, присутствуют вещества, ингибирующие процессы оплодотворения. Обнаружение активаторов пищеварительных ферментов морского ежа в разрушенных или разрушающихся бурых водорослях и ингибиторов процессов оплодотворения в свежих крепких водорослях подтверждено натурными наблюдениями.

Проведенное биохимическое исследование показало, что процессы пищеварения и размножения морского ежа *S. intermedius* контролируются выделяемыми водорослями веществами, состав и

структура которых зависят от вида водоросли. Так, *S. cichorioides* и *S. japonica* значительно различаются по содержанию ламинаранов (Elyakova, Zvyagintseva, 1974; Звягинцева и др., 1994), а также по содержанию и структурам фукоиданов (Zvyagintseva et al., 2003; Ozawa et al., 2006; Vishchuk et al., 2013). В *S. cichorioides* ингибирующее действие на ламинариназы морских беспозвоночных оказывало вещество белковой природы (Ермакова и др., 2001). Из *S. japonica* в качестве ингибитора ламинариназы морского ежа выделена фракция, состоящая из углеводов и полифенолов (Агаркова и др., 2007). Анализ данных, относящихся к экскрементам и содержащимся в них веществам, показал значительное отличие химического состава экскрементов от такового образца водоросли, из которой они получены, что позволило идентифицировать ряд соединений, усваиваемых морскими ежами. Интересным кажется изменение структуры фукоидана в процессе разрушения *S. cichorioides* или переваривания ее морским ежом *S. intermedius*, наглядно показанное с помощью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (рис. 1). Предстоит выяснить структуру активаторов пищеварительных ферментов морских ежей в разрушенных или разрушающихся талломах *S. cichorioides* и ингибиторов процессов оплодотворения. Для дальнейшего изучения деталей сосуществования морских ежей и водорослей необходимо расширять спектр изучаемых макрофитов, чтобы найти реальные корреляции между особенностями поведения морских ежей и биологическими свойствами метаболитов разных видов водорослей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке программы ДВО РАН П-42 “Дальний Восток” и гранта РФФИ № 18-04-00905.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Агаркова В.В., Крупнова Т.Н., Звягинцева Т.Н. Экстрактивные вещества бурой водоросли *Laminaria japonica* и их действие на эндо- $1 \rightarrow 3$ - $\beta$ -D-глюканазу серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Сб. статей II Международ. конф. “Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки”. М.: ВНИРО. 2005. С. 242–244.

- Агаркова В.В., Крупнова Т.Н., Ермакова С.П. и др. Действие экстрактивных веществ *Laminaria japonica* на 1,3-β-D-глюканазу — пищеварительный фермент морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Прикладная биохим. и микробиол. 2007. Т. 43. № 4. С. 511–517.
- Агаркова В.В. Биохимические основы биотических взаимоотношений серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и бурой водоросли *Laminaria japonica*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 2007. 20 с.
- Белоус О.С., Титлянова Т.В., Титлянов Э.А. Морские растения бухты Троицы и смежных акваторий // Морские растения бухты Троицы и смежных акваторий (залив Петра Великого, Японское море). Владивосток: Дальнаука. 2013. С. 152–214.
- Бузников Г.А., Подмарёв В.К. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachinensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Методы биологии развития. М.: Наука. 1975. С. 188–216.
- Диннел П.А. Эволюция и современный статус биотеста, основанного на оценке оплодотворяющей способности сперматозоидов морского ежа (Sea urchin sperm test) // Биол. моря. 1995. Т. 21. № 6. С. 390–397.
- Ермакова С.П., Бурцева Ю.В., Сова В.В. и др. Белки бурых водорослей — ингибиторы эндо-1,3-β-D-глюканаза морских беспозвоночных // Биохимия. 2001. Т. 66. № 2. С. 234–241.
- Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А. Структура ламинанов из некоторых бурых водорослей // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. № 12. С. 1349–1358.
- Киселёва М.И., Шевченко Н.М., Крупнова Т.Н., Звягинцева Т.Н. Влияние фукоиданов на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2005. Т. 41. № 1. С. 51–57.
- Киселёва М.И., Ермакова С.П., Звягинцева Т.Н. Действие белков и полисахаридов бурых водорослей на оплодотворение яйцеклеток и развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* A. Agassiz, 1863 // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 6. С. 437–446.
- Крупнова Т.Н., Павлючков В.А. Пищевые потребности морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в естественных условиях на ламинариевых полях // Изв. ТИНРО. 2003. Т. 134. С. 195–208.
- Левин В.С., Найденов В.П., Туркина Н.А. Интенсивность питания морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в экспериментальных условиях // Сб. науч. тр. “Исследования иглокожих дальневосточных морей” ДВО АН СССР. Владивосток: ИБМ ДВО АН СССР. 1987. С. 56–82.
- Сова В.В., Широкова Н.И., Кусайкин М.И. и др. 1 → 3-β-глюканаза из неоплодотворенных яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Сравнение с 1 → 3-β-глюканазами морского и наземного моллюсков // Биохимия. 2003. № 68. Вып. 5. С. 650–655.
- Усов А.И., Чижов О.С. Химические исследования водорослей // Новое в жизни, науке, технике. Сер. Химия. М.: Знание. 1988. № 5. С. 48.
- Broadway R.M. Resistance of plants to herbivorous insects: Can this resistance fail? // Can. J. Plant Pathol. 1996. V. 18. P. 476–481.
- de Nys R., Coll J.C., Price I.R. Chemically mediated interactions between the red alga *Plocamium hamatum* (Rhodophyta) and the octocoral *Sinularia cruciata* (Alcyonacea) // Mar. Biol. 1991. V. 108. P. 315–320.
- Deal M.S., Hay M.E., Wilson D. et al. Galactolipids rather than phlorotannins as herbivore deterrents in the brown seaweed *Fucus vesiculosus* // Oecologia. 2003. V. 136. P. 107–114.
- Dinnel P.A., Link J.M., Stober O.J. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters // Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1987. V. 16. P. 23–32.
- Dodgson K.S., Price R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides // Biochem. J. 1962. V. 84. P. 106–110.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
- Duggins D.O., Eckman J.E. Is kelp detritus a good food for suspension feeders? Effects of kelp species, age and secondary metabolites // Mar. Biol. 1997. V. 128. P. 489–495.
- Elyakova L.A., Zvyagintseva T.N. A study of the laminarins of some far-eastern brown seaweeds // Carbohydr. Res. 1974. V. 34. P. 241–248.
- Fitton J.H. Brown marine algae: A survey of therapeutic potentials. Altern. Complementary Ther. 2003. V. 9. № 1. P. 29–33.
- Kiseleva M.I., Balabanova L.A., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N. Effect of 1,3;1,6-β-D-glucans on developing sea urchin embryos // Mar. Biotechnol. 2008. V. 10. № 4. P. 466–470.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Nakamura N., Moriya M. Purification and partial characterization of a lectin-like protein from the sea algae *Laminaria diabolica* that induces fertilization envelope formation in sea urchin eggs // Zool. Sci. 1999. V. 1. 6. № 2. P. 247–253.
- Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 375–381.
- Ono S., Umezaki M., Tojo N. et al. Cyclic and linear peptides derived from α-amylase inhibitory protein tendamistat // J. Biochem. 2001. V. 129. P. 783–790.
- Ozawa T., Yamamoto J., Yamagishi T. et al. Two fucoidans in the holdfast of cultivated *Laminaria japonica* // J. Nat. Med. 2006. V. 60. № 3. P. 236–239.
- Pawlik J.R. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates // Oceanogr. Mar. Biol.: Annu. Rev. 1992. V. 30. P. 273–335.
- Parys S., Kehraus S., Pete R. et al. Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae) // Eur. J. Phycol. 2009. V. 44. P. 331–338.
- Pelletreau K., Muller-Parker G. Sulfuric acid in the phaeophyte alga *Desmarestia munda* deters feeding by the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* // Mar. Biol. 2002. V. 141. P. 1–9.
- Sova V.V., Elyakova L.A., Vaskovsky V.E. The distribution of the laminarins in marine invertebrates // Comp. Biochem. Physiol. 1970. Vol. 32. No. 3. P. 459–464.

- Steinberg P.D., van Altena I. Tolerance of marine invertebrate herbivores to brown algal phlorotannins in temperate Australasia // *Ecol. Monogr.* 1992. V. 62. P. 189–222.
- Schnitzler I., Boland W., Hay M.E. Organic sulfur compounds from *Dictyopteris* spp. deter feeding by an herbivorous amphipod (*Ampithoe longimana*) but not by an herbivorous sea urchin (*Arbacia punctulata*) // *J. Chem. Ecol.* 1998. V. 24. № 10. P. 1715–1732.
- Taylor R.B., Sotka E., Hay M.E. Tissue-specific induction of herbivore resistance: seaweed response to amphipod grazing // *Oecologia.* 2002. V. 132. P. 68–76.
- Vaskovsky V.E., Isay S.V. Quantitative determination of formaldehyde liberated with periodate oxidation // *Anal. Biochem.* 1969. V. 30. P. 25–31.
- Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: Anti-tumor activity and structure–function relationship // *Food Chem.* 2013. V. 141. № 2. P. 1211–1217.
- Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B. et al. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds // *Carbohydr. Res.* 1999. V. 322. P. 32–39.
- Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2003. V. 294. № 1. P. 1–13.

## Effect of Metabolites from the Brown Alga *Saccharina cichorioides* (Miyabe) on Feeding Habits, Fertilization, and Embryonic Development of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* A. Agassiz, 1863

M. I. Kiseleva<sup>a</sup>, N. V. Zvyagintsev<sup>a</sup>\*, S. P. Ermakova<sup>a</sup>, and T. N. Zvyagintseva<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

The substances contained in the aqueous–ethanol and aqueous extracts from freshly collected and destroyed brown algae *Saccharina cichorioides* in their second vegetation season and from excrements of sea urchins, fed these algae specimens, were studied for effects on the digestive enzyme 1,3-β-D-glucanase, sperm cells, eggs, and developing embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. The yield, composition, and structure of substances from fresh and destroyed *S. cichorioides* and from sea urchin excrements were analyzed. Sea urchins assimilate mannitol, proteins, and almost completely laminarans from destroyed thalli of *S. cichorioides*. The detection of activators of sea urchin 1,3-β-D-glucanase in the aqueous–ethanol extracts of destroyed algae and inhibitors of fertilization processes in the extracts of fresh algae is consistent with field observations. Biochemical studies have shown that the digestion and reproduction processes in sea urchins are controlled by algae metabolites to a significant extent.

**Keywords:** 1,3-β-D-glucanase, digestive enzyme, sperm, eggs, embryos, sea urchin, fertilization, brown algae, laminarans, fucoidans, inhibitors, activators, digestion, reproduction