

УДК 612.396.11: 615.322

СТРОНЦИЙ- И ИТРИЙСВЯЗЫВАЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПЕКТИНА ИЗ МОРСКОЙ ТРАВЫ *PHYLLOSPADIX IWATENSIS* MAKINO, 1931 И ЕГО МОДИФИЦИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО

© 2021 г. В. В. Ковалев¹, Е. В. Хожаенко², Е. А. Подкорытова^{1,2, *}

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690091, Россия

*e-mail: eapodkorytova@mail.ru

Поступила в редакцию 22.01.2020 г.

После доработки 22.04.2020 г.

Принята к публикации 28.09.2020 г.

Из морской травы *Phyllospadix iwatensis* Makino, 1931 был выделен низкоэтерифицированный пектин, который был модифицирован путем кислотного гидролиза в 0.5 М HCl. В исходном и гидролизованном пектинах определены содержание ангидрогалактуроновой кислоты, степень метоксилирования и молекулярно-массовое распределение. Оценена сорбционная способность данных пектинов в отношении ионов стронция и иттрия при pH 6.0. Установлено, что в ходе гидролиза молекулярная масса пектина уменьшилась в 2.9 раза, относительное содержание ангидрогалактуроновой кислоты увеличилось на 14%, а степень метоксилирования с 5.22% снизилась до нуля. Сорбционная способность гидролизованного пектина в отношении ионов стронция увеличилась на 40%, в отношении ионов иттрия – на 48%. При этом гидролизованный пектин в полной мере сохранил способность сорбировать ионы металлов из их растворов с низкой концентрацией.

Ключевые слова: пектин, морская трава, *Phyllospadix iwatensis*, молекулярно-массовое распределение, сорбционная емкость, итрий, стронций

DOI: 10.31857/S0134347521020066

Пектины – это широко распространенный в природе класс биополимеров, которые присутствуют во всех высших растениях, обнаружены в составе первичных клеточных стенок и межклеточного пространства. Пектины относятся к гетерополисахаридам, т.е. в их состав входят различные сахара. Структурной основой молекулы пектина является D-галактуроновая кислота, которая образует достаточно протяженные полимерные блоки, имеющие линейное строение. В этих галактуроновых блоках часть остатков D-галактуроновой кислоты находится в форме метиловых эфиров (Оводова и др., 2010; Mraevs et al., 2017; Gawkowska et al., 2018).

Основной областью использования пектинов традиционно является пищевая промышленность. Однако в настоящее время внимание исследователей направлено на физиологическое действие пектинов. В ряде работ показано присутствие у пектинов таких фармакологических эффектов, как иммунорегуляторный, гипохолестеремический, антибактериальный, противоопухолевый, гастропротекторный и др. (Correa-Ferreira

et al., 2018; Lara-Espinoza et al., 2018; Minzanova et al., 2018; de Godoi et al., 2019). Одно из перспективных направлений использования пектинов в медицине обусловлено способностью некоторых пектинов прочно связывать в комплекс и выводить из организма тяжелые металлы и радионуклиды. Этой способностью обладают пектины с достаточным количеством остатков D-галактуроновой кислоты, имеющих свободные карбоксильные группы, благодаря которым образуется связь между пектином и металлом. Большинство природных пектинов, в том числе все коммерческие, относятся к высокоэтерифицированным пектинам, в которых основная часть карбоксильных групп в остатках D-галактуроновой кислоты этерифицирована метиловым спиртом, поэтому не может образовывать комплекс с ионами металлов (Зелепукин и др., 2016; Lara-Espinoza et al., 2018).

Перспективным источником низкоэтерифицированных пектинов являются морские травы семейства Zosteraceae, большие промысловые запасы которых обнаружены у берегов Дальнего

Востока России (Боковня, Давидович, 2015). Ранее было показано, что пектины, полученные из морских трав зостеры и филлоспадикса, имеют степень этерификации менее 10% и способны образовывать прочные химические комплексы с некоторыми металлами, в том числе со стронцием (Коленченко и др., 2012; Khozhaenko et al., 2015, 2016). Это представляет большой практический интерес, так как радиоактивный изотоп стронция (^{90}Sr) является одним из основных факторов радиационного загрязнения окружающей среды при ядерных взрывах и выбросах с АЭС. ^{90}Sr обладает относительно длительным периодом существования и, будучи химическим аналогом кальция, способен откладываться в костной ткани, вызывая радиационное поражение организма. Дополнительную опасность представляет то, что при радиоактивном распаде ^{90}Sr образуется его дочерний продукт иттрий (^{90}Y), который является еще более мощным β -излучателем (Велешко и др., 2011; Koarai et al., 2016). Таким образом, возникает необходимость одновременного связывания и выведения из организма обоих указанных изотопов.

Цель настоящей работы – сравнительная количественная оценка сорбционной активности выделенного из филлоспадикса пектина и его модифицированного производного в отношении ионов стронция и иттрия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Морскую траву *Phyllospadix iwatensis* собирали в районе о-ва Русский в б. Аякс в конце сентября 2018 г. Для выделения пектина использовали свежесобраные растения, у которых удаляли корневища и отмершие части листьев. Затем морскую траву тщательно промывали в холодной водопроводной воде и измельчали до частиц размером не более 2 см. Выделение пектина из сырья проводили в соответствии с ранее описанной методикой, включающей кислотный гидролиз травы, экстракцию пектина оксалатом аммония и осаждение пектина этанолом (Khozhaenko et al., 2016). Полученный пектин дополнительно очищали переосаждением из 0.25% раствора трехкратным количеством этанола и сушили при температуре 80°C.

Модификацию пектина проводили путем его кислотного гидролиза по следующей методике. Сначала 5 г пектина на стеклянном фильтре промывали 50 мл 0.5 М соляной кислоты для перевода его в кислотную форму. Промытый пектин помещали в стеклянную колбу, добавляли 0.5 М соляной кислоты до объема 150 мл, затем проводили гидролиз пектина при температуре 90°C и непрерывном перемешивании в течение 2 ч. По окончании гидролиза оставшийся твердый остаток пек-

тина отделяли центрифугированием при 2.500 г в течение 30 мин, затем трижды промывали суспендированием в 100 мл 0.05 М соляной кислоты, каждый раз отделяя жидкую фазу центрифугированием. Отмытый осадок пектина растворяли в воде при добавлении 1 М натрия гидроксида до pH 6.0. Объем полученного раствора доводили до 400 мл и осаждали пектин добавлением трехкратного объема 95% этанола. Осадок пектина отделяли от жидкости с помощью фильтровальной ткани, промывали 10-кратным объемом 70% этанола, затем трехкратным объемом 95% этанола и сушили при температуре 80°C.

В качестве образца сравнения использовали коммерческий высокоэтерифицированный цитрусовый пектин марки Classic CS 401 (Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken, Германия).

Содержание галактуроновой кислоты в образцах пектинов определяли колориметрическим методом по реакции с м-гидроксифенилом (Blumenkrantz, Asboe-Hansen, 1973; Василенко, Седакова, 2005).

Степень метоксилирования определяли с помощью титриметрического метода (Позднякова, Бубенчиков, 2014).

Молекулярно-массовое распределение в образцах пектинов определяли методом эксклюзионной хроматографии на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence с рефрактометрическим детектором (Shimadzu, Япония). Сбор и расчет данных производили с помощью стандартного сертифицированного программного обеспечения, предусматривающего статистическую обработку данных LC Solution Version 1.25 с функцией расчета молекулярно-массовых характеристик (GPC). Образцы анализировали на колонке ОНрап SB-804HQ (8 × 300 мм, лимит эксклюзии 1×10^6 г/моль, размер частиц 10 мкм). Элюирование образцов проводили 37 мМ фосфатным буфером при pH 6.0, температуре 35°C и скорости 0.5 мл/мин. Определяемые образцы и стандарты готовили в концентрации 1–2 мг/мл. В качестве стандартов для калибровки колонки использовали набор пуллуланов с молекулярной массой от 11.8 до 788.0 кДа.

Сорбционную активность образцов пектинов оценивали в соответствии с ранее разработанной методикой (Коленченко и др., 2012). В емкость, снабженную магнитной мешалкой, вносили рассчитанное количество 0.1 М раствора солей иттрия или стронция, соответствующее концентрации металла в растворе от 40 до 1400 мг/л (в пересчете на 20 мл конечного объема), 1 мл 0.1 М ацетатного буфера с pH 6.0 и 10 мл 0.5% раствора пектинов. По показаниям pH-метра корректировали значение pH среды добавлением 0.1 М растворов гидроксида натрия или азотной кислоты. Затем объем реакционной смеси доводили до 20 мл,

Таблица 1. Физико-химические характеристики использованных пектинов

Показатель	Пектин из <i>Phyllospadix iwatensis</i>		Цитрусовый пектин
	нативный	гидролизованный	
Степень метоксилирования, %	5.22 ± 0.14	0	60.2 ± 0.45
Содержание ангидрогалактуроновой кислоты, %	70.5 ± 0.65	80.2 ± 0.97	79.4 ± 0.84
Содержание свободных карбоксильных групп, %	17.1 ± 0.16	20.5 ± 0.25	8.1 ± 0.09
Средневесовая молекулярная масса, кДа	325.45	119.93	319.36
Среднечисловая молекулярная масса, кДа	101.81	59.29	100.26
Полидисперсность	3.1969	2.023	3.1854

добавляя дистиллированную воду; смесь инкубировали при постоянном перемешивании в течение 60 мин при температуре 36–37°C. Раствор, содержащий свободные ионы иттрия или стронция, отделяли фильтрованием через гидрофильный фильтр Omnipore с размером пор 5 мкм. Остаточное содержание металла в жидкой фазе определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-6800 (Shimadzu, Япония).

Количество связанного пектином металла вычисляли по формуле:

$$q = V(C_i - C_e)/M,$$

где q – количество связанного металла, мг/г; V – объем раствора в инкубационной емкости, л; C_i – начальная концентрация иттрия или стронция в растворе, мг/л; C_e – конечная равновесная концентрация иттрия или стронция в растворе, мг/л; M – масса образца пектина, г.

Количественные параметры сорбции оценивали с помощью математической модели Лэнгмюра. По результатам пяти экспериментов были рассчитаны константы Лэнгмюра. Для оценки релевантности использования модели был рассчитан коэффициент аппроксимации (R^2).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-химические характеристики образцов пектинов, использованных в работе, приведены в табл. 1. По молекулярной массе пектин из филлоспадикса можно отнести к высокомолекулярным пектинам. Следует отметить, что характеристики молекулярно-массового распределения низкоэтерифицированного пектина из филлоспадикса и высокоэтерифицированного цитрусового пектина практически совпадают. В результате кислотного гидролиза молекулярная масса пектина из филлоспадикса значительно уменьшилась: средневесовая – в 2.9 раза, а среднечисловая – в 1.96 раза (табл. 1). При этом полидисперсность пектина снизилась в 1.5 раза, что свидетельствует о соответствующем повышении гомогенности образца. В ходе гидролиза пектина содержание в нем галактуроновой кислоты увеличилось в

1.14 раза. Это свидетельствует о том, что блоки галактуронана более устойчивы к воздействию кислоты, чем нейтральные сахара, которые в ходе кислотного гидролиза отщепляются от молекулы пектина в первую очередь. В результате гидролиза также произошло практически полное деметоксилирование пектина – степень метоксилирования снизилась до нуля. Это привело к дополнительному увеличению приблизительно на 4% содержания свободных карбоксильных групп в молекуле пектина.

При сравнении сорбционных характеристик высокоэтерифицированного цитрусового пектина и низкоэтерифицированного пектина из филлоспадикса установлено, что по максимальной сорбционной емкости данные пектины в отношении ионов стронция различаются в 1.82 раза, а ионов иттрия – в 1.53 раза (табл. 2). Это подтверждает более высокую сорбционную способность низкоэтерифицированных пектинов по сравнению с таковой высокоэтерифицированных.

Сравнение изотерм сорбции ионов стронция и иттрия данными пектинами (рис. 1, 2) показало, что пектин из филлоспадикса активно сорбировал ионы металлов уже при их начальных низких концентрациях, в то время как цитрусовый пектин проявлял сорбционные свойства лишь при достаточно высоких концентрациях ионов металлов. Различие в действии этих пектинов имеет большое практическое значение, так как количество изотопов стронция и иттрия (и других токсических металлов), попадающих в организм человека, очень мало, но их необходимо максимально полно связать и вывести из организма. В связи с этим именно низкоэтерифицированные пектины могут считаться перспективными сорбентами.

При сравнении сорбционных характеристик нативного и гидролизованного пектинов из филлоспадикса установлено, что по максимальной сорбционной емкости гидролизированный пектин превосходит нативный пектин в отношении ионов стронция в 1.4 раза, а ионов иттрия – в 1.48 раза. Эти результаты согласуются с данными, приведенными в табл. 1, которые свидетельствуют

Таблица 2. Экспериментальные константы Лэнгмюра для связывания ионов иттрия и стронция образцами пектина при pH 6.0

Показатель	Нативный пектин из <i>Phyllospadix iwatensis</i>	Гидролизированный пектин из <i>Phyllospadix iwatensis</i>	Цитрусовый пектин
Стронций			
Максимальная сорбционная емкость (q_{\max} , мг/г)	123.46 ± 0.35	172.41 ± 0.43	68.16 ± 0.49
Коэффициент аффинитета (b , л/мг)	0.0552 ± 0.0014	0.0897 ± 0.0021	0.0090 ± 0.0005
Коэффициент аппроксимации (R^2)	0.990	0.991	0.990
Иттрий			
Максимальная сорбционная емкость (q_{\max} , мг/г)	108.7 ± 0.71	161.29 ± 0.13	71.42 ± 0.08
Коэффициент аффинитета (b , л/мг)	0.0393 ± 0.0013	0.0569 ± 0.0018	0.0156 ± 0.0011
Коэффициент аппроксимации (R^2)	0.999	0.998	0.987

ют об увеличении содержания в гидролизованном пектине свободных карбоксильных групп, отвечающих за его сорбционную активность. Сравнение изотерм сорбции ионов иттрия нативным и гидролизированным пектинами из филлоспадикса (рис. 2) показало, что начальные участки изотерм, соответствующие области низких концентраций металла, практически совпадают. Это позволяет говорить о том, что в области низких концентраций иттрия данные пектины обладают одинаковой металлсвязывающей активностью. Изотермы сорбции стронция нативным и гидролизированным пектинами из филлоспадикса (рис. 1) заметно различаются на начальных участках: изотерма сорбции для гидролизованного пектина демонстрирует более крутой подъем. Таким образом, при одинаковой равновесной концентрации стронция в растворе гидролизированный пектин сорбировал больше металла, чем нативный пектин. Следовательно, несмотря на

существенное уменьшение молекулярной массы, гидролизированный пектин в полной мере сохранял способность сорбировать ионы металлов из их растворов с низкой концентрацией.

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным эксперимента из трех исследованных образцов пектинов наиболее эффективным сорбентом ионов стронция и иттрия оказался гидролизированный пектин из *Phyllospadix iwatensis*. В результате проведенного гидролиза сорбционная способность пектина из филлоспадикса в отношении ионов стронция и иттрия увеличилась на 40 и 48% соответственно. При этом заметно повысилась способность данного пектина сорбировать ионы стронция из растворов с низкой концентрацией металлов. Повышение сорбционных свойств пектина в результате гидролиза может быть связано со следующими причинами. В ходе

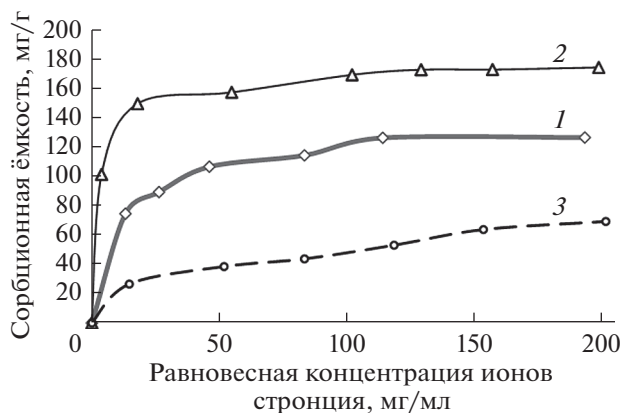


Рис. 1. Изотерма сорбции ионов стронция. 1 – пектин из *Phyllospadix iwatensis*, 2 – гидролизированный пектин, 3 – цитрусовый пектин.

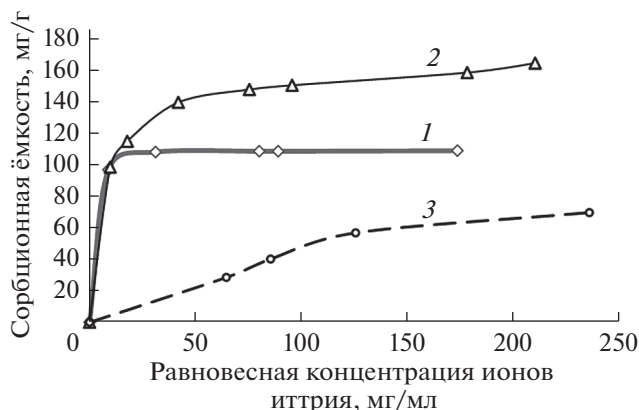


Рис. 2. Изотерма сорбции ионов иттрия. Обозначения, как на рис. 1.

гидролиза за счет отщепления нейтральных сахаров содержание ангидрогалактуроновой кислоты в пектине увеличилось на 14%. В то же время степень этерификации снизилась на 5.22%. В результате данных процессов относительное содержание свободных карбоксильных групп в пектине увеличилось на 20% (табл. 1). При этом соответствующим образом увеличилась и сорбционная способность пектина, которая, как отмечено ранее, зависит от содержания в нем свободных карбоксильных групп.

Механизм связывания ионов металлов пектинами предполагает, что отдельные участки галактуронана, входящие в состав разных молекул пектина, образуют межмолекулярную связь через ионы поливалентных металлов. Эта связь носит кооперативный характер, и для ее стабилизации необходимо плотное взаимодействие между достаточно протяженными участками галактуронана (Оводова и др., 2010; Gawkowska et al., 2018). Исходя из этого, повышение сорбционной способности пектина можно объяснить также тем, что в ходе кислотного гидролиза могло произойти разрушение участков молекулы пектина, тем или иным образом препятствовавших сближению блоков галактуронана, которое необходимо для образования прочной кооперативной связи. В результате гидролиза средняя молекулярная масса пектина снизилась в 2.9 раза. В образовавшихся фрагментах пектиновой молекулы содержание ангидрогалактуроновой кислоты достигло 80.2%, что в пересчете на ее натриевую соль (ангидрогалактуронозная кислота в пектине находится в форме натриевой соли) составляло около 90% массы молекулы. Таким образом, гидролизованный пектин фактически представляет собой блоки галактуронана разной величины, ранее входившие в состав молекулы пектина и высвободившиеся из нее в результате гидролиза. Эти блоки более подвижны и имеют больше возможностей для образования межмолекулярной связи, чем в случае их нахождения в исходной молекуле пектина.

Необходимо отметить, что помимо высокой сорбционной способности гидролизованный пектин имеет достаточно высокую степень однородности (полидисперсность составляет 2.15). Как известно, диапазон молекулярно-массового распределения лекарственного вещества является важным показателем качества в соответствии с требованиями большинства международных Государственных Фармакопей. Чем уже диапазон молекулярно-массового распределения, тем легче субстанция поддается контролю качества и стандартизации. Таким образом, гидролизованный пектин из филлоспадикса может быть рекомендован в качестве основы при создании лекарственных препаратов для профилактики и терапии интоксикации радионуклидами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боковня И.Е., Давидович В.В. Оценка содержания биологически активных веществ в морской траве семейства *Zosteraceae* при различных способах ее заготовки // Международ. науч.-исслед. журн. 2015. № 8(39). Ч. 2. С. 6–7.
- Василенко З.В., Седакова В.А. Методики количественного определения пектина // Вестн. фармации. 2005. № 3. С. 83–91.
- Велешко И.Е., Розанов К.В., Велешко А.Н. и др. Сорбция радионуклидов ^{90}Sr и ^{90}Y биополимером микитон для радиологического мониторинга и пострадиационной реабилитации природных и техногенных сред // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2011. Т. 13. № 5. С. 151–154.
- Зеленукин Ю.И., Зеленукин С.Ю., Федорук В.А., Бушмин И.С. К вопросу производства пектина из свекловичного жома // Вестн. Воронеж. гос. ун-та инженер. технол. 2016. № 2. С. 238–242.
- Коленченко Е.А., Хотимченко М.Ю., Хожжаенко Е.В., Хотимченко Ю.С. Сорбция стронция пектинами, выделенными из морских трав *Zostera marina* и *Phyllospadix iwatensis* // Биол. моря. 2012. Т. 38. № 4. С. 325–329.
- Оводова Р.Г., Головченко В.В., Попов С.В., Оводов Ю.С. Новейшие сведения о пектиновых полисахаридах // Изв. Коми науч. центра УрО РАН. 2010. № 3. С. 37–45.
- Позднякова Т.А., Бубенчиков Р.А. Количественное определение функциональных групп пектиновых веществ травы герани сибирской (*Geranium sibiricum* L.) // Фундамент. исслед. 2014. № 11. Ч. 1. С. 110–113.
- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids // Anal. Biochem. 1973. V. 54. P. 484–489.
- Correa-Ferreira M.L., Ferreira D.M., Dallazen J.L. et al. Gastroprotective effects and structural characterization of a pectic fraction isolated from *Artemisia campestris* subsp. *maritima* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 107. P. 2395–2403.
- De Godoi A.M., Faccin-Galhardi L.C., Rechenchoski D.Z. et al. Structural characterization and antiviral activity of pectin isolated from *Inga* spp // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 139. P. 925–931.
- Gawkowska D., Cybulska J., Zdunek A. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: a review // Polymers. 2018. V. 10. № 7. P. 762. <https://doi.org/10.3390/polym10070762>

- Khozhaenko E.V., Khotimchenko R.Y., Kovalev V.V. et al.* Metal binding activity of pectin isolated from seagrass *Zostera marina* and its derivatives // *Russ. J. Mar. Biol.* 2015. V. 41. № 6. P. 485–489.
- Khozhaenko E., Kovalev V., Podkorytova E., Khotimchenko M.* Removal of the metal ions from aqueous solutions by nanoscaled low molecular pectin isolated from seagrass *Phyllospadix iwatensis* // *Sci. Total Environ.* 2016. V. 565. P. 913–921.
- Koarai K., Kino Y., Takahashi A. et al.* ⁹⁰Sr in teeth of cattle abandoned in evacuation zone: Record of pollution from the Fukushima-Daiichi Nuclear Power Plant accident // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 24077. <https://doi.org/10.1038/srep24077>
- Lara-Espinoza C., Carvajal-Millán E., Baladrán-Quintana R. et al.* Pectin and pectin-based composite materials: beyond food texture // *Molecules.* 2018. V. 23. P. 942. <https://doi.org/10.3390/molecules23040942>
- Minzanova S.T., Mironov V.F., Arkhipova D.M. et al.* Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: a review // *Polymers (Basel).* 2018. V. 10. № 12. P. 1407. <https://doi.org/10.3390/polym10121407>
- Mravec J., Kracun S.K., Rydahl M.G. et al.* An oligogalacturonide-derived molecular probe demonstrates the dynamics of calcium-mediated pectin complexation in cell walls of tip-growing structures // *Plant J.* 2017. V. 91. P. 534–546.

Strontium- and Yttrium-Binding Activity of Pectin from the Seagrass *Phyllospadix iwatensis* Makino, 1931 and Its Modified Derivative

V. V. Kovalev^a, E. V. Khozhaenko^b, and E. A. Podkorytova^{a, b}

^a*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

^b*Far Eastern Federal University, Vladivostok 690091, Russia*

Low-esterified pectin was isolated from the seagrass *Phyllospadix iwatensis* and modified using acidic hydrolysis in 0.5 M HCl. The concentration of anhydrogalacturonic acid, the degree of esterification, and the molecular mass distribution were determined in the native and hydrolyzed pectins. The sorption capacity of these pectins with regard to strontium and yttrium ions was evaluated at pH 6.0. It was found that the molecular weight of the native pectin decreased 2.9-fold during hydrolysis; the relative content of anhydrogalacturonic acid in the native pectin increased by 14%, while the degree of esterification decreased from 5.22 to 0%. The sorption capacity of the hydrolyzed pectin increased regarding strontium and yttrium ions by 40 and 48%, respectively. In our study, hydrolyzed pectin fully retained the ability to bind metal ions from their solutions with a low concentration.

Keywords: pectin, seagrass, *Phyllospadix iwatensis*, molecular mass distribution, sorption capacity, yttrium, strontium