

УДК 581.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА, СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ И АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ

© 2019 г. С. Е. Фоменко^{а, *}, Н. Ф. Кушнерова^а, В. Г. Спрыгин^а, Е. С. Другова^а, Л. Н. Лесникова^а,
В. Ю. Мерзляков^а, Т. В. Момот^б

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский океанологический институт
им. В.И. Ильичева Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

^бДальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

*e-mail: fomenko29@mail.ru

Поступила в редакцию 28.04.2018 г.

После доработки 30.11.2018 г.

Принята к публикации 04.12.2018 г.

Проведено сравнительное исследование качественного и количественного состава липидного комплекса и общего содержания полифенолов в водно-спиртовых экстрактах, выделенных из трех видов морских макрофитов, собранных в заливе Петра Великого Японского моря. Исследованные водоросли принадлежали к разным отделам: зеленая водоросль *Ulva lactuca* L. – ульва латук (салатная), бурая водоросль *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh – саргассум бледный и красная водоросль *Ahnfeltia tobuchensis* (Kanno et Matsubara) Makijenko – анфельтия тобучинская. Показано, что в составе общих липидов в экстрактах всех трех видов водорослей преобладали гликолипиды (30.3–41.5%) и нейтральные липиды (34–48.5%), на долю фосфолипидов приходилось 10–25.7% от суммы липидов. В составе нейтральных липидов всех водорослей преобладали триацилглицерины и свободные стеринны. Наибольшее количество триацилглицеринов отмечалось у *A. tobuchensis*, а свободных стериннов – у *S. pallidum*. В содержании индивидуальных фракций фосфолипидов были выявлены существенные различия как по составу, так и по содержанию. Преобладающими по содержанию фосфолипидными фракциями в экстракте *U. lactuca* были фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозит, *S. pallidum* – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерин, *A. tobuchensis* – фосфатидилхолин и фосфатидилглицерин. При анализе процентного содержания основных видов жирных кислот, входящих в состав липидной составляющей экстрактов исследованных видов водорослей, было выявлено, что наибольшее количество ПНЖК семейства n-6 содержится в экстракте бурой водоросли *S. pallidum*. В экстракте зеленой водоросли *U. lactuca* отмечалось наибольшее количество ПНЖК семейства n-3. В экстракте красной водоросли *A. tobuchensis* среди ПНЖК доминировали арахидоновая (семейство n-6) и эйкозопентаеновая (семейство n-3) кислоты. Наибольшее количество полифенолов было обнаружено в экстракте бурой водоросли *S. pallidum*, которые в 15–24 раза превышали соответствующие показатели у *U. lactuca* и *A. tobuchensis*. Также в экстракте *S. pallidum* отмечался более высокий уровень антирадикальной активности к АВТС⁺, который был выше в 5–12.5 раз по сравнению с *U. lactuca* и *A. tobuchensis*, соответственно.

Ключевые слова: *Ahnfeltia tobuchensis*, *Sargassum pallidum*, *Ulva lactuca*, морские макрофиты, нейтральные липиды, фосфолипиды, жирно-кислотный состав, полифенолы, антирадикальная активность

DOI: 10.1134/S0015330319050051

ВВЕДЕНИЕ

Не менее 70% всей поверхности нашей планеты занимает Мировой океан, который населяют разнообразные представители морских организмов. В их числе водоросли – важный компонент морских экосистем. Они служат поставщиками

органического вещества и энергии, являются основным звеном в пищевых цепях большинства морских организмов. В состав водорослей входят разнообразные химические соединения: полисахариды, каротиноиды, полифенолы, минеральные вещества, липиды, аминокислоты и др. [1].

Сокращения: АРА – антирадикальная активность, ГК – галловая кислота, ДГТС – 1,2-диацилглицеро-О-4-(N,N,N-триметил)-гомосерин, МНЖ – мононенасыщенные жирные кислоты, НЖК – насыщенные жирные кислоты, ПФ – полифенолы, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты, НЛ – нейтральные липиды, ТАГ – триацилглицерины, ФГЭГ – фосфатидил-О-[N-(2-гидроксиэтил) глицин], ФГ – фосфатидилглицерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФЛ – фосфолипиды, ФС – фосфатидилсерин, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин.

Большинство работ в отечественной и зарубежной литературе посвящено исследованию фармакологических и биомедицинских свойств полисахаридной составляющей водорослей, имеющих высокую практическую ценность. Бурые и красные водоросли служат источником природных гидроколлоидов — альгината, агара, каррагинана, а также сульфатированных полисахаридов, используемых в пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности. При этом недооценивается значение других не менее важных компонентов морских водорослей (липидов, незаменимых жирных кислот, полифенольных соединений), выполняющих определенные физиологические функции и имеющие широкое практическое применение. Содержание липидов в морских водорослях невелико, но благодаря большой биомассе, разнообразию и высокому содержанию незаменимых жирных кислот эти организмы все чаще рассматриваются как потенциальный источник липидов [2]. Липиды выполняют важные функции в клетках растений: являются источником энергии, структурными компонентами клеточных мембран, а также участвуют в процессах фотосинтеза. В морских макрофитах, как и в других пойкилотермных организмах, липиды клеточных мембран наиболее чувствительны к изменению параметров окружающей среды (температура, соленость, УФ-радиация и др.) и, в свою очередь, обеспечивают взаимосвязь клетки с внешней средой [3].

Другой значимой группой вторичных метаболитов, входящих в состав морских макрофитов, являются полифенольные соединения, обладающие антиоксидантными свойствами. Полифенолы играют важную роль в формировании и раннем развитии клеточной стенки, образуя комплекс с альгиновой кислотой — структурным полисахаридом клеточной стенки водорослей [4]. Они также участвуют в процессах роста и репродукции и защищают растения от патогенных бактерий, травоядных животных, УФ-радиации [5].

В литературе представлено значительное количество обзорного материала по оценке биохимического состава и питательной ценности различных видов морских макрофитов, собранных из разных частей земного шара [1]. Однако климатические условия определенной местности оказывают существенное влияние на их биохимический состав. Используемые в данном исследовании водоросли были собраны в прибрежной акватории залива Петра Великого Японского моря. Они относятся к массовым видам Дальнего Востока и являются типичными представителями разных отделов (зеленые, бурые и красные водоросли). Ранее нами было установлено, что комплексы полярных липидов, выделенные из ряда морских гидробионтов (*Halocynthia aurantium*, *Saccharina japonica*, *Ulva lactuca*), проявляли выра-

женный защитный эффект в условиях различных экспериментальных моделей [6–8]. Важным этапом для получения фармацевтических и лечебно-профилактических препаратов из морских водорослей является определение их химического состава и дальнейший отбор видов с высоким содержанием требуемых компонентов. Кроме того, исследование химического состава морских водорослей дополнит имеющиеся сведения, необходимые для понимания физиологических процессов, которые происходят в них.

Цель работы — сравнительное изучение качественного и количественного состава липидного комплекса, общего содержания полифенолов и антирадикальной активности в экстрактах, выделенных из трех видов морских макрофитов, принадлежащих к разным отделам: *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Sargassum pallidum* (Phaeophyta) и *Ahnfeltia tobuchiensis* (Rhodophyta).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили морские водоросли: *Ulva lactuca* L. [= *Ulva fenestrata*] — ульва латук (салатная) (отдел Chlorophyta, класс Ulvotrichophyceae, порядок Ulvales); *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh — саргассум бледный (отдел Phaeophyta, класс Cyclosporophyceae, порядок Fucales, семейство Sargassaceae); *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara) Makijenko — анфельция тобучинская (отдел Rhodophyta, класс Floridophyceae, порядок Gigartinales, семейство Ahnfeltiaceae).

Образцы водорослей собирали в июле-августе 2015 г. в прибрежных водах залива Петра Великого Японского моря на морской экспериментальной станции Тихоокеанского океанологического института им. В.И. Ильичева ДВО РАН (о. Попова). Выборка водорослей составляла по 10 таллов каждого вида. Слоевища очищали от эпифитов и донного бентоса, промывали сначала морской, затем дистиллированной водой. После этого отжимали и погружали в кипящую воду на 2 мин для инактивации ферментов. Обработанные таким способом водоросли сушили до суховоздушного состояния. Высушенный таллом измельчали с помощью лабораторной мельницы до размеров частиц 0.5–1 мм и экстрагировали 70% этиловым спиртом методом реперколяции. Выход экстракта составлял 1 л на 1 кг сухого сырья. Экстрагирование этанолом является эффективным способом переработки водорослей, в процессе которого извлекается основная часть минеральных и органических веществ, проявляющих биологическую активность. В работах Hwang и Thi отмечалось, что для более полного извлечения полифенольных соединений из водорослей необходимо использовать 70% раствор этилового спирта [9].

Для выделения липидной составляющей экстракта и исследования ее состава, экстракт предварительно освобождали от спирта путем упаривания на ротормном испарителе при температуре не выше 37°C. Полученную маслообразную массу экстрагировали смесью хлороформ : метанол (2 : 1 по объему) в соответствии с общепринятым методом для выделения липидов из растительного и животного сырья [10]. Для разделения фаз к экстракту добавляли раствор хлористого натрия (0.73%) в количестве 20% от объема. После разделения фаз хлороформный слой, содержащий липиды, отделяли на делительной воронке и упаривали на ротормном испарителе до отсутствия запаха хлороформа. Общее содержание липидов определяли весовым методом.

Микротонкослойную хроматографию липидов осуществляли на отечественном силикагеле марки "КСК" (ООО "Лабхимос", Россия) по методу Svetachev и Vaskovsky [11]. Суспензию силикагеля получали по методу осаждения частиц в определенном интервале времени. Сначала освобождали раствор силикагеля от крупных частиц в течение 20 мин седиментации, затем из супернатанта получали осадок силикагеля, формирующийся через 40 мин седиментации. Осадок собирали и хранили в банке с хорошо притертой пробкой под слоем воды. Количество силикагеля определяли взвешиванием высушенной суспензии при 120°C. Хроматографическое распределение липидов проводили на стеклянных пластинках 6 × 6 см. Перед нанесением на пластинки силикагель тщательно встряхивали и к однородной массе добавляли тонко растертый гипс (10% к весу сухого силикагеля). Смесь помещали на магнитную мешалку. Суспензию, 1 мл которой содержал 200 мг сорбента, наносили пипеткой на пластинку и разравнивали (толщина слоя 200 мкм). Пластинки сушили на воздухе в течение 30 мин и хранили в защищенном от пыли и паров месте. Перед употреблением их активировали в сушильном шкафу 15 мин при 120°C.

Качественный анализ полярных липидов проводили с помощью двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя системы для разделения растительных гликолипидов [12] и фосфолипидов [13]. Для проявления фосфолипидных фракций применяли молибдатный реактив [13], для гликолипидов – антроновый реагент [14]. Фосфолипиды, содержащие аминокетильную группу, обнаруживали 0.2% раствором нингидрина в ацетоне [15], гидроксильную группу – с помощью периодатного реактива Шиффа [16], холинсодержащие соединения – реактивом Драгендорфа [17]. В качестве неспецифического реагента использовали 10% раствор серной кислоты в метаноле с последующим нагреванием пластинок до появления черных пятен. Количество общих фосфолипидов в экстракте и индивидуальных фракций на хроматограммах определяли с помощью универсального

молибдатного реактива [13]. Фракционное разделение фосфолипидов проводили методом двумерной ТСХ [11], используя следующие системы растворителей: в первом направлении – хлороформ : метанол : 28% аммиак (65 : 25 : 5 или 65 : 35 : 5 по объему), во втором – хлороформ : ацетон : метанол : ледяная уксусная кислота : вода (30 : 40 : 10 : 10 : 5 или 50 : 20 : 10 : 10 : 5 по объему) [15]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы фосфолипидов.

Общее содержание нейтральных липидов (НЛ) и отдельных фракций определяли по методу Amenta [18]. Исследование фракционного состава НЛ проводили методом одномерной ТСХ на силикагеле в системе растворителей гексан : серный эфир : уксусная кислота в соотношении 80 : 20 : 1 (по объему). Стандарты и пробы после хроматографии обнаруживали раствором фосфорномолибденовой кислоты, которая в дальнейшем не мешала определению. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы НЛ.

Определение жирно-кислотного состава липидной фракции из экстрактов водорослей проводили методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали переэтерификацией липидов по методу Carreau и Dubaco [19] и очищали с помощью ТСХ, используя систему гексан : диэтиловый эфир (95 : 5). Зону МЭЖК удаляли с пластинки и элюировали с силикагеля гексаном. Элюат упаривали, МЭЖК перерастворяли в определенном объеме гексана и анализировали методом ГЖХ на газовом хроматографе "ЛХМ-2000" (ОАО "Хроматограф", Россия) с пламенно-ионизационным детектором. ГЖХ-анализ МЭЖК проводили на капиллярной колонке (25–30 м), внутренний диаметр – 0.25 мм. Анализ проводили при температуре 220°C с фазой HP-5-MS с 5% фенилметилсилоксаном. Температура инжектора была 180°C. Газ-носитель – гелий, скорость потока – 50 мл/мин. Идентификацию МЭЖК проводили сравнением времен удерживания со стандартами МЭЖК по значениям "углеродных чисел" [20]. Результаты выражали в процентах от суммы жирных кислот.

Для выделения полифенольных фракций, водно-этанольные экстракты водорослей упаривали в вакууме до полного удаления этанола. Полученную водную составляющую последовательно экстрагировали двукратным объемом гексана и дихлорметана для удаления липофильных веществ и пигментов, затем центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин для удаления взвеси. Далее надосадочную жидкость дважды экстрагировали эквивалентным количеством этилацетата. Полученные этилацетатные фракции объединяли, упаривали в вакууме досуха, ресуспендировали в воде,

сушили на лиофильной сушке и хранили в плотно закрытых пластиковых контейнерах при -20°C до проведения анализов. Сухие экстракты растворяли в дистиллированной воде для получения исходного раствора (1 мг/мл), который использовали для определения общего содержания полифенолов (ПФ) и антирадикальной активности (АРА). Определение общего содержания ПФ проводили с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [21]. В качестве стандарта сравнения при определении общего содержания ПФ использовали галловую кислоту (ГК). Общее содержание ПФ выражали в мг-экв ГК/100 г сухой водоросли и в мг-экв ГК на 1 г сухого экстракта.

Уровень антирадикальной активности оценивали по отношению к катион-радикалу ABTS^+ , полученному в результате окисления 2,2'-азинобис(3-этилбензотиозолин-6-сульфоната) под действием персульфата калия [22] и алкоксил пероксильного радикала, полученного в результате термической декомпозиции 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) [23]. При определении антирадикальной активности в качестве стандарта сравнения использовали тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту), водорастворимый аналог витамина Е. Антирадикальную активность выражали в микромолях тролокса на мг ПФ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ InStat 3.0, используя статистическую программу (Graph Pad Software Inc. USA, 2005), включающую функцию проверки соответствия выборки закону нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенная оценка качественного и количественного состава липидов в экстрактах исследуемых морских водорослей с помощью ТСХ показала, что их содержание значительно варьирует у разных видов макрофитов. Количество общих липидов в красной водоросли было значительно ниже в сравнении с зеленой и бурой водорослями. Так, общие липиды составляли в среднем у *U. lactuca* — 28.05 ± 0.18 ; у *S. pallidum* — 26 ± 0.23 , и существенно ниже у *A. tobuchiensis* — 15.35 ± 0.22 (мг/г сухой ткани). Содержание липидов в морских водорослях может меняться в зависимости от условий обитания, сезона и температуры водоема, в котором обитают данные виды [24].

В содержании общих липидов в экстрактах всех трех видов водорослей преобладали гликолипиды (30.3–41.5%) и нейтральные липиды (34–48.5%), на долю фосфолипидов приходилось 10–25.7% от суммы липидов (табл. 1). Гликолипиды являются обязательным компонентом морских макрофитов и наряду с фосфолипидами являются важным источником полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). В составе нейтральных липидов (НЛ) в процентном

отношении преобладали триацилглицерины (ТАГ) и свободные стеринны. Наиболее высокое количество ТАГ отмечалось у *A. tobuchiensis* ($43.45 \pm 2.35\%$) и *S. pallidum* ($37.33 \pm 1.23\%$) по сравнению с *U. lactuca* ($33.68 \pm 0.87\%$). При этом ТАГ морских растений, как и наземных, исполняют роль запасных липидов, в то время как стеринны являются обязательными компонентами плазматических мембран, фотосинтетического аппарата мембран лизосом и мембран аппарата Гольджи [3]. Содержание свободных стериннов у исследованных макрофитов находилось в пределах от 13.21 ± 0.89 у *A. tobuchiensis* до 14.65 ± 0.27 у *U. lactuca*, и существенно выше у *S. pallidum* — $19.04 \pm 1.62\%$. Остальные фракции НЛ, среди которых были обнаружены диацилглицерины, свободные жирные кислоты и эфиры стериннов, составляли в среднем 9–12% от общего количества НЛ.

В содержании индивидуальных фракций фосфолипидов в водно-спиртовых экстрактах исследованных видов макрофитов отмечались существенные различия как по составу, так и по содержанию. При этом каждый из представленных видов морских водорослей имел характерные особенности фосфолипидного состава. Общими фосфолипидами (ФЛ) для всех трех видов водорослей были фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилглицерин (ФГ) и фосфатидилинозит (ФИ). Причем содержание ФЭ (в % от суммы всех ФЛ) было значительно выше у *S. pallidum* ($43.8 \pm 1.7\%$), по сравнению с *U. lactuca* ($21.29 \pm 1.52\%$) и *A. tobuchiensis* ($13.0 \pm 0.95\%$). Данный фосфолипид относится к структурным компонентам всех клеточных мембран как в морских, так и наземных видах. Отличительной особенностью бурой водоросли *S. pallidum* является отсутствие фосфатидилхолина (ФХ), но при этом в ней был выявлен редкий фосфолипид — фосфатидил-О-[N-(2-гидроксиэтил)глицин] (ФГЭГ), который не был обнаружен у двух других исследованных видов, что согласуется с литературными данными [2]. Важно отметить, что ФГЭГ является обязательным компонентом водорослей рода *Sargassum* sp. и, возможно, берет на себя роль отсутствующего ФХ. В свою очередь, *U. lactuca* так же как *S. pallidum*, не содержит ФХ, но при этом в ее состав входят фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидная кислота, отсутствующие у других исследованных макрофитов. Известно, что зеленые водоросли, в отличие от бурых и красных, способны синтезировать эти фосфолипиды [2]. Также характерной особенностью *U. lactuca* является наличие бетаиновых липидов, на долю которых приходилось до 12% от общего количества липидов. В частности, одним из представителей данного класса липидов является 1,2-диацилглицеро-О-4-(N,N,N-триметил)-госмосерин (ДГТС), который, имея определенное структурное сходство с ФХ, не является фосфолипидом, так как не содержит остатка фосфорной

Таблица 1. Химический состав липидного комплекса в экстрактах морских водорослей

Показатели	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Sargassum pallidum</i>	<i>Ahnfeltia tobuchiensis</i>
Общие липиды, мг/г сухой ткани	28.05 ± 0.25	26.0 ± 0.23	15.35 ± 0.22
Общие гликолипиды, мг/г сухой ткани	11.4 (40.6%)	10.8 ± 0.11 (41.5%)	4.64 ± 0.34 (30.3%)
Общие нейтральные липиды, мг/г сухой ткани	9.54 (34%)	12.6 ± 0.12 (48.5%)	6.76 ± 0.43 (44.0%)
Общие фосфолипиды, мг/г сухой ткани	3.75 (13.4%)	2.60 ± 0.02 (10%)	3.95 ± 0.23 (25.7%)
Бетаиновые липиды, мг/г сухой ткани	3.36 (12%)	—	—
<i>Фракции нейтральных липидов (в % от суммы всех фракций)</i>			
Диацилглицерины + моноацилглицерины	16.90 ± 0.28	15.02 ± 0.68	15.16 ± 0.56
Свободные стеринны	14.65 ± 0.27	19.04 ± 1.62	13.21 ± 0.89
Свободные жирные кислоты	13.32 ± 0.20	12.64 ± 0.97	13.31 ± 0.38
Триацилглицерины	33.68 ± 0.87	37.33 ± 1.23	43.45 ± 2.35
Эфиры стерина	15.95 ± 0.27	10.06 ± 0.56	10.95 ± 0.44
Остаточная фракция	5.50 ± 0.35	5.91 ± 0.37	3.92 ± 0.25
<i>Фракции фосфолипидов (в % от суммы всех фракций)</i>			
Фосфатидилхолин	—	—	64.8 ± 1.72
Фосфатидилэтаноламин	21.29 ± 1.52	48.3 ± 1.78	8.20 ± 0.12
Фосфатидилглицерин	27.35 ± 1.38	28.5 ± 0.81	20.85 ± 1.62
Фосфатидилинозит	20.20 ± 1.47	10.5 ± 0.54	6.15 ± 0.13
Фосфатидилсерин	16.73 ± 0.50	—	—
Фосфатидил-N-гидроксиэтилглицин	—	12.7 ± 0.38	—
Фосфатидная кислота	14.43 ± 1.38	—	—

кислоты. Согласно литературным данным, зеленые водоросли, накапливающие высокое количество ДГТС, не содержат ФХ [25]. Вероятно, они, в том числе *U. lactuca*, синтезируют ДГТС вместо ФХ, который и выполняет сходные функции в структуре мембран. Другим важным фосфолипидом во всех исследуемых макрофитах является ФГ, который, в отличие от ФХ и ФЭ, ассоциирован с хлоропластами и участвует в образовании ССК хлоропластов [3]. Количество ФГ в *S. pallidum* и *U. lactuca* в среднем составило 27–28%, и несколько ниже было зафиксировано в *A. tobuchiensis* (20%). В свою очередь, *A. tobuchiensis* отличалась высоким содержанием ФХ (64.8 ± 1.72%). Также во всех исследуемых водорослях был обнаружен ФИ: в *S. pallidum* – 10.5 ± 0.54%, *A. tobuchiensis* – 6.15 ± 0.13%, тогда как у *U. lactuca* данный показатель был существенно выше и составил 20.20 ± 1.47%. На основании вышеизложенного можно заключить, что по количественному составу преобладающими фосфолипидами были: в экстракте *U. lactuca* – ФГ, ФЭ и ФИ, *S. pallidum* – ФЭ и ФГ, *A. tobuchiensis* – ФХ и ФГ.

Следующим этапом проведенных исследований было сравнительное изучение жирно-кислотного состава общих липидов, выделенных из водно-спиртовых экстрактов морских водорослей. Было

отмечено, что их жирно-кислотный состав характеризовался большим разнообразием (табл. 2). Насыщенные жирные кислоты (НЖК) составили 26.5–33.4%, мононенасыщенные (МНЖК) – 13.3–24.85% и полиненасыщенные (ПНЖК) – 48,64–59,9% от суммы всех жирных кислот. Во всех трех видах водорослей среди НЖК доминирующей являлась пальмитиновая кислота (16:0). При этом наибольшее содержание пальмитиновой кислоты выявлено в экстракте *U. lactuca* (31%), далее в убывающем порядке *S. pallidum* (22.4%) и *A. tobuchiensis* (19.53%). На долю миристиновой (14:0) и стеариновой (18:0) кислот приходилось от 0.8 до 4.97% от суммы всех жирных кислот. Из МНЖК в общих липидах экстракта *A. tobuchiensis* преобладала олеиновая кислота (18:1 n-9; 19.66%), в *S. pallidum* ее содержание составляло 6.9%, в зеленой водоросли *U. lactuca* – 2.5%. В свою очередь, в липидной фракции *U. lactuca* была обнаружена другая МНЖК – цис-вакценовая кислота (18:1 n-7; 9.42%), содержание которой было выше в 3.7 раза, чем олеиновой кислоты. Наличие данной кислоты среди жирных кислот 18:1 характерно для зеленых водорослей рода *Ulva* и является таксономическим признаком [2]. Необходимо отметить, что среди основных идентифицированных жирных кислот у ис-

Таблица 2. Жирно-кислотный состав морских макрофитов (% от суммы всех фракций)

Жирные кислоты	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Sargassum pallidum</i>	<i>Ahnfeltia tobuchiensis</i>
14:0	1.44 ± 0.06	3.6 ± 0.1	2.00 ± 0.17
16:0	31.00 ± 1.34	22.4 ± 0.40	19.53 ± 0.65
18:0	1.0 ± 0.02	0.8 ± 0.1	4.97 ± 0.14
16:1	4.59 ± 0.07	6.1 ± 0.2	3.70 ± 0.11
16:4 n-3	12.06 ± 0.85	—	—
18:1 n-7	9.42 ± 0.54	0.3 ± 0.01	1.5 ± 0.03
18:1 n-9	2.5 ± 0.07	6.9 ± 0.30	19.66 ± 1.68
18:2 n-6	9.80 ± 0.22	15.0 ± 0.30	1.70 ± 0.07
18:3 n-3	16.45 ± 1.36	7.8 ± 0.7	0.5 ± 0.02
18:4 n-3	7.21 ± 0.15	7.3 ± 0.5	—
20:3 n-6	—	8.3 ± 0.1	—
20:4 n-6	2.82 ± 0.08	18.0 ± 0.6	26.24 ± 0.68
20:5 n-3	1.71 ± 0.43	3.5 ± 0.1	20.20 ± 0.43
Σ НЖК	33.44	26.8	26.5
Σ МНЖК	16.51	13.3	24.85
Σ ПНЖК	50.05	59.9	48.64
Σ n-6 ПНЖК	12.62	41.3	27.94
Σ n-3 ПНЖК	37.43	18.6	20.7

Примечание. НЖК – насыщенные жирные кислоты, МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты, ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты.

следованных видов морских макрофитов преобладали ПНЖК семейства n-6 и n-3, их количество составляло в среднем 50% от общей суммы жирных кислот. Главными представителями семейства n-6 являлись арахидоновая (20:4) и линолевая (18:2) кислоты. Причем среди рассматриваемых видов водорослей именно бурая водоросль *S. pallidum* отличалась высоким содержанием ПНЖК семейства n-6 (18:2, 20:3, 20:4), их суммарное содержание составило 41.3% от общего количества жирных кислот. В отличие от *S. pallidum* красная водоросль *A. tobuchiensis* отличалась более низким относительным содержанием жирных кислот семейства n-6 (27.94%), среди которых преобладала арахидоновая кислота (20:4; 26.25%). У зеленой водоросли *U. lactuca* содержание ПНЖК n-6 было еще ниже (12.62%) с преобладанием линолевой кислоты (18:2; 9.8%).

Важным элементом жирно-кислотного состава морских водорослей являются жирные кислоты семейства n-3, которые в большинстве случаев определяют ценность морских организмов в качестве источников лекарственного сырья. Из ПНЖК семейства n-3 были идентифицированы 16:4, 18:3, 18:4, 20:5, их содержание в сумме составило для *U. lactuca* – 37.43%, *S. pallidum* – 18.6%, *A. tobuchiensis* – 20.7%. В соответствии с литературными данными [24], для зеленых водорослей рода *Chlorophyta*, в том числе *U. lactuca*, характерно высокое содержание ПНЖК семейства n-3, в том числе α-линоленовой (18:3; 16.45%), гексадекатетраеновой (16:4; 12.06%) и стеариноновой (18:4; 7.21%) кислот. Важно отметить, что α-лино-

леновая (18:3 n-3) наряду с линолевой (18:2 n-6) кислотой относятся к категории незаменимых, которые не синтезируются в организме животных и человека, и могут быть получены только из пищи (преимущественно рыба, растительная пища, выделенные растительные масла). В связи с этим, наличие незаменимых жирных кислот в морских водорослях имеет большое практическое значение для их применения в различных сферах промышленности (пищевая, фармацевтическая и др.). Данные кислоты являются предшественниками других жирных кислот и основными компонентами фосфолипидов клеточных и субклеточных мембран. В составе бурой водоросли *S. pallidum* из ПНЖК семейства n-3 были обнаружены α-линоленовая (18:2; 7.8%), стеариноновая (18:4; 7.3%) и эйкозопентаеновая (20:5; 3.5%) кислоты. В красной водоросли *A. tobuchiensis* среди ПНЖК семейства n-3 доминировала эйкозопентаеновая кислота (20:5; 20.2%), содержание которой существенно превышало ее содержание у других исследованных макрофитов.

Большой интерес к морским водорослям связан также с их антиоксидантной активностью и прямым или опосредованным участием в подавлении свободно-радикальных процессов. Водоросли способны синтезировать вторичные метаболиты с антиоксидантными свойствами, к которым относятся, в первую очередь, полифенольные соединения. Как правило, максимальное содержание полифенолов в водорослях наблюдается в летний период, что положительно коррелирует с репродуктивным статусом водоросли [26]. Как видно из

Таблица 3. Содержание общих полифенолов и антирадикальная активность экстрактов из морских водорослей ($M \pm m$)

Биохимические показатели	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Sargassum pallidum</i>	<i>Ahnfeltia tobuchiensis</i>
Общие полифенолы, мг-экв ГК/100 г сухой водоросли	39.2 ± 3.2	583.8 ± 30.5	24.6 ± 2.3
Общие полифенолы, мг-экв ГК/г сухого экстракта	16.2 ± 1.8	218.2 ± 20.3	9.1 ± 1.6
Антирадикальная активность к АВТС ⁺⁺ , мкМ тролокса/мг ПФ	0.32 ± 0.03	1.62 ± 0.04	0.13 ± 0.03
Антирадикальная активность к пероксильным радикалам, мкМ тролокса/мг ПФ	0.15 ± 0.02	0.64 ± 0.02	0.06 ± 0.01

Примечание. ПФ – полифенолы; мг-экв ГК – миллиграмм-эквивалент галловой кислоты.

таблицы 3, общее содержание ПФ в выделенных фракциях исследуемых водорослей существенно различалось. Наибольшее количество полифенолов было обнаружено в экстракте бурой водоросли *S. pallidum*, общее содержание которых составило 583.8 ± 30.5 мг-экв ГК на 100 г сухой водоросли. Существенно меньше полифенольных соединений содержали экстракты зеленой водоросли *U. lactuca* (39.2 ± 3.2) и красной водоросли *A. tobuchiensis* (24.6 ± 2.3). Соответственно, общее содержание полифенолов в экстракте *S. pallidum* было в 15 раз выше, чем в *U. lactuca*, и в 24 раза выше, чем в *A. tobuchiensis*.

Уровень антирадикальной активности выделенных полифенольных фракций также существенно различался у исследуемых объектов. Оценка антирадикальной активности по отношению к катион-радикалу АВТС⁺ и пероксил-радикалу представляет собой важный аспект изучения антиоксидантного потенциала исследуемых экстрактов. Так, полифенольная фракция из *S. pallidum* имела более высокий уровень АРА по отношению к АВТС⁺ (1.62 ± 0.04 мкМ тролокса/мг ОПФ), который в 5 раз превышал соответствующие показатели у *U. lactuca* (0.32 ± 0.03) и в 12.5 раз – у *A. tobuchiensis* (0.13 ± 0.01). Аналогичная тенденция прослеживается в показателях АРА по отношению к пероксильному анион-радикалу. Пероксил-радикалы образуются в организме в процессе перекисидации липидов и являются одними из основных инициаторов свободно-радикальных реакций. Для полифенольной фракции *U. lactuca* данный показатель составил 0.15 ± 0.02 мкМ тролокса/мг ОПФ, который в 4 раза был ниже, чем в *S. pallidum* (0.64 ± 0.02). Еще более низкий уровень АРА по отношению к пероксильному радикалу был зафиксирован у *A. tobuchiensis* (0.06 ± 0.01), он был в 2.5 раза меньше такового у *U. lactuca* и в 10 раз меньше, чем у *S. pallidum*. Полученные столь выраженные различия в общем содержании полифенолов и уровне антирадикальной активности, по-видимому, могут быть обусловлены принадлежностью выделенных полифенольных фракций из *U. lactuca* и *A. tobuchiensis* к другому виду вторичных метаболитов фенольной группы в отличие от *S. pallidum*.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании вышеизложенного следует, что полученные существенные различия в содержании липидов, их жирных кислот и общем содержании полифенолов в экстрактах изученных видов водорослей, собранных в прибрежной полосе залива Петра Великого Японского моря, могут быть обусловлены систематическим положением этих морских растений, принадлежащих к трем разным отделам.

Экстракт зеленой водоросли *U. lactuca* характеризовался наибольшим содержанием липидов (2.8% от сухой массы) среди исследованных видов водорослей. Основными липидами являлись нейтральные липиды и гликолипиды. Из фосфолипидов по количественному составу преобладали ФГ, ФЭ и ФИ. Для *U. lactuca* характерно присутствие бетаиновых липидов, которые, по мнению авторов [25], способны заменить ФХ, отсутствующий у данной водоросли. В составе нейтральных липидов, как и во всех исследуемых водорослях, доминировали ТАГ. В летний период при высокой освещенности избыток энергии используется клетками фотосинтезирующих организмов для производства запасных ТАГ. В жирно-кислотном спектре общих липидов *U. lactuca* преобладали пальмитиновая (16:0), гексадекатетраеновая (16:4 n-3), цис-вакценовая (18:1 n-7), линолевая (18:2 n-6) и α -линоленовая (18:3 n-3) кислоты. Причем по сравнению с другими изученными видами водорослей, *U. lactuca* имела наивысшее содержание ПНЖК семейства n-3.

В экстракте красной водоросли *A. tobuchiensis* содержание общих липидов и гликолипидов примерно в 1.5–2.5 раза было меньше, чем в экстрактах зеленой и бурой водорослей. В то же время, по содержанию общих фосфолипидов среди трех видов макрофитов доминировала *A. tobuchiensis*. В составе идентифицированных фосфолипидов основными были ФХ и ФГ, при этом ФХ был обнаружен только в красной водоросли *A. tobuchiensis* и его содержание составляло около 60% от суммарного количества фосфолипидов. Среди жирных кислот в *A. tobuchiensis* преобладали пальмитиновая (16:0), олеиновая (18:1 n-9), арахидоновая (20:4 n-6) и эйкозопентаеновая (20:5 n-3)

кислоты. При этом по количеству доминировали арахидоновая и эйкозопентаеновая кислоты, которые являются предшественниками простагландинов, лейкотриенов и эйкозаноидов.

В экстракте бурой водоросли *S. pallidum* содержание общих липидов составляло около 2.6% от сухой массы, в составе которых преобладали гликолипиды и нейтральные липиды. Из нейтральных липидов преобладали ТАГ и свободные стерины, полярные липиды составляли более 50% от общих липидов. При этом по количественному составу основными фосфолипидами были ФЭ и ФГ. Также был обнаружен редкий фосфолипид - ФГЭГ, который, возможно, исполняет роль ФХ, отсутствующего во всех бурых водорослях семейства *Sargassaceae*. В жирно-кислотном составе преобладали пальмитиновая (16:0), линолевая (18:2 n-6), арахидоновая (20:4 n-6) кислоты. При этом экстракт *S. pallidum* отличался относительно высоким содержанием ПНЖК семейства n-6 (41.3%) с C₁₈ и C₂₀ атомами углерода, что является главной особенностью, отличающей бурые водоросли от красных и зеленых [2]. Известно, что потребление в пищу липидов, содержащих длинноцепочные жирные кислоты семейства n-6 и n-3, способствует профилактике атеросклероза.

Анализ содержания полифенольных соединений в экстрактах исследованных видов водорослей показал, что в бурой водоросли *S. pallidum* содержалось их значительное количество, в отличие от *U. lactuca* и *A. tobuchiensis*, что, вероятно, может быть обусловлено принадлежностью исследуемых объектов к разным таксономическим группам. Известно, что в составе бурых водорослей, наряду с традиционными группами фенольных соединений (фенольные кислоты и флавоноиды), входит характерная только для них группа, называемая флоротаннинами, которые представляют собой олигомеры флороглюкинола (1,3,5-тригидроксibenзола) [5]. Флоротаннины являются доминирующей группой среди полифенолов бурых водорослей и, благодаря наличию разветвленной структуры сопряженных двойных связей высокой подвижности и большого количества свободных гидроксильных групп, они обладают способностью связывать свободные радикалы. Этим, по видимому, объясняется высокая антрадикальная активность полифенольной фракции, выделенной из экстракта *S. pallidum*, как по отношению к катион радикалу ABTS⁺, так и пероксильному анион-радикалу.

С тех пор как впервые были описаны флоротаннины и до настоящего времени продолжают широко обсуждаться их возможные функции в организме растений. Считается, что одной из основных функций является защита водорослей от оксидативного стресса [27], вызванного, в том числе, ультрафиолетовым излучением. Предполагается, что флоротаннины играют важную роль

в защите растений от ультрафиолетового излучения. Поэтому именно в летний период сбора водорослей при высокой температуре и высоком уровне освещенности был отмечен высокий уровень полифенолов в бурой водоросли *S. pallidum*, произрастающей в литоральной зоне и находящейся длительные периоды в области прямого воздействия солнечной радиации. В свою очередь, в зеленых и красных водорослях фотозащитную функцию могут осуществлять другие соединения, отличные от флоротаннинов, участвующие в адсорбции коротковолновой (сине-зеленой) части видимого света, и передающие поглощенную энергию на молекулы хлорофилла *a*.

Известно, что основными компонентами полифенольного комплекса зеленой водоросли *U. lactuca* и красных водорослей являются мономерные флавоноиды [28, 29], которые, согласно литературным данным, обладают значительно меньшим антиоксидантным потенциалом по сравнению с флоротаннинами бурых водорослей [30], что, по видимому, и определяет более низкую антирадикальную активность полифенольных фракций, выделенных из *U. lactuca* и *A. tobuchiensis* как по отношению к катион-радикалу ABTS⁺, так и к пероксильному радикалу. Все это в совокупности с низким содержанием полифенольных соединений в исследуемых объектах и определяет их более низкий антиоксидантный потенциал по сравнению с *S. pallidum*.

Таким образом, исследование химического состава экстрактов, выделенных из трех видов морских водорослей, относящихся к разным отделам, выявило существенные различия в составе и содержании липидов, их жирных кислот и полифенольных соединений, что обусловлено, по нашему мнению, систематическими, морфологическими и экологическими различиями, существующими между ними. Также полученные в настоящей работе сравнительные данные липидного состава и общего содержания полифенолов позволяют получить дополнительные сведения к уже известным представлениям о физиологическом состоянии морских водорослей, относящихся к разным таксономическим группам, в летние месяцы.

На основании полученных данных можно заключить, что исследованные дальневосточные виды водорослей могут быть использованы после соответствующей переработки в качестве пищевых добавок и для получения фармацевтических препаратов в соответствии с заявленными свойствами. Распространенность и массовость исследованных видов водорослей в дальневосточных морях делает их перспективными для получения липидных комплексов и полифенольных фракций, которые, наряду с полисахаридами, определяют ценность морских макрофитов, что может найти широкое при-

менение в качестве биологически активных добавок и источников лекарственного сырья.

Авторы благодарны рецензентам и научному редактору за критические замечания и дополнения, что существенно помогло в работе над статьей.

Работа выполнена за счет бюджетных средств.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michalak I., Chojnacka K. Algae as production systems of bioactive compounds – A review // Eng. Life Sci. 2015. V. 15. P. 160–176.
2. Khotimchenko S.V. Lipids of marine macrophytic algae and grasses: structure, distribution, analysis. Vladivostok: Dalnauka, 2003.
3. Goncharova S.N., Kostetsky E.Y., Sanina N.M. The effect of seasonal shifts in temperature on the lipid composition of marine macrophytes // Russ. J. Plant Physiol. 2004. V. 51. P. 169–175.
4. Schoenwaelder M.E.A., Clayton M.N. The presence of phenolic compounds in isolated cell walls of brown algae // Phycologia. 1999. V. 38. P. 161–166.
5. Ragan M.A., Glombitza K.W. Phlorotannins, brown algal polyphenols // Progress in Phycological Research. Bristol: Biopress Ltd., 1986. P. 129–241.
6. Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Lesnikova L.N. Experimental assessment of the efficiency of erythrocyte membrane repair by an extract of the tunic of the ascidian purple sea squirt in carbon tetrachloride poisoning // Pharm. Chemistry J. 2013. V. 46, № 10. P. 606–611.
7. Sprygin V.G., Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Sizova L.A., Momot T.V. The hepatoprotective properties of an extract from the brown alga *Saccharina japonica* // Rus. J. Mar. Biol. 2013. V. 39. P. 65–69.
8. Fomenko S.E., Kushnerova N.F., Sprygin V.G., Momot T.V. The antioxidant and stress-protective properties of an extract from the green alga *Ulva lactuca* Linnaeus, 1753 // Rus. J. Mar. Biol. 2013. V. 42. P. 509–514.
9. Hwang, E.S., Thi N.D. Effects of extraction and processing methods on antioxidant compound contents and radical scavenging activities of laver (*Porphyra tenera*) // Prev. Nutr. Food Sci. 2014. V. 19. P. 40–48.
10. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue // Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497–509.
11. Svetachev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin-layer microchromatography of lipids // J. Chromatogr. 1972. V. 6. P. 376–378.
12. Vaskovsky V.E., Khotimchenko S.V. HPTLC of Polar lipids of algae and other plants // J. Chromatogr. 1982. V. 5. P. 635–636.
13. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. Universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatogr. 1975. V. 114. P. 129–141.
14. Van Gent C.M., Roseleur O.J., Van der Bijl P. Detection of cerebrosides on thin-layer chromatograms with an anthrone spray reagent // J. Chromatogr. 1973. V. 85. P. 174–176.
15. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A. Column chromatographic and associated procedures // Lipid chromatographic analysis / ed. Marinetti G.V. New York: Dekker, 1967. V. 1. P. 99–162.
16. Кёйме М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975.
17. Wagner H., Horhammer L., Wolf F. Thin-layer chromatography of phosphatides and glycolipides // Biochem. Z. 1961. V. 334. P. 175–184.
18. Amenta J.S. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-layer chromatography // J. Lipid Res. 1964. V. 5. P. 270–272.
19. Carreau J.P., Dubaco J.P. Adaptation of macro-scale method to the micro-scale for fatty acid methyl transesterification of biological lipid extracts // J. Chromatogr. 1978. V. 151. P. 384–390.
20. Christie W.W. Equivalent chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography: a reappraisal // J. Chromatogr. 1988. V. 447. P. 305–314.
21. Parys S., Rosenbaum A., Kehraus S., Reher G., Glombitza K.W., König G.M. Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts // J. Nat. Prod. 2007. V. 70. P. 1865–1870.
22. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // Free Radic. Biol. Med. 1999. V. 26. P. 1231–1237.
23. Bartosz G., Janaszewska A., Ertel D., Bartosz M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity // Biochem. Mol. Biol. 1998. V. 46. P. 519–528.
24. Sanina N.M., Goncharova S.N., Kostetsky E.Y. Seasonal changes of fatty acid composition and thermotropic behavior of polar lipids from marine macrophytes // Phytochemistry. 2008. V. 69. P. 1517–1527.
25. Dembitsky V.M., Rozetsvet O.A. Diacylglyceryltrimethylhomoserines and phospholipids of some green marine macrophytes // Phytochemistry. 1989. V. 28. P. 3341–3343.
26. Parys S., Kehraus S., Pete R. Seasonal variation of polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (Pheophyceae) // Eur. J. Phycol. 2009. V. 44. P. 331–338.
27. Tierney M.S., Soler-Vila A., Rai D.K., Croft A.K., Brunton N., Smyth T.J. UPLC-MS profiling of low molecular weight phlorotannin polymers in *Ascophyllum nodosum*, *Pelvetia canaliculata* and *Fucus spiralis* // Metabolomics. 2014. V. 10. P. 534–535.
28. Alagan V.T., Valsala R.N., Rajesh K.D. Bioactive chemical constituent analysis, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activity of whole plant methanol extracts of *Ulva lactuca* Linn. // Br. J. Pharm. Res. 2017. V. 15. P. 1–14.
29. de Quiros A.R.B., Lage-Yusty M.A., Lopez-Hernandez J. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption // Food Chemistry. 2010. V. 121. P. 634–638.
30. Shibata T., Ishimaru K., Kawaguchi S., Yoshikawa H., Hama Y. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese *Laminariaceae* // J. Appl. Phycol. 2008. V. 20. P. 705–711.