

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФИКОБИЛИПРОТЕИНОВ И СУЛЬФАТИРОВАННЫХ
ПОЛИСАХАРИДОВ КРАСНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *AHNFELTIOPSIS FLABELLIFORMIS* И
MASTOCARPUS PACIFICUS (PHYLLOPHORACEAE)

Кравченко А.О., Глазунов В.П., Володько А.В., Ермак И.М.
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Проспект 100 лет Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ
e-mail: kravchenko_25.89@mail.ru

Аннотация. Проведен сравнительный анализ фикобилипротеинов и сульфатированных полисахаридов, выделенных последовательной экстракцией различными способами из красных водорослей *Ahnfeltiopsis flabelliformis* и *Mastocarpus pacificus* (Phyllophoraceae) Японского моря. Установлено, что эффективная экстракция фикобилипротеинов достигается использованием 1.5 % раствора нитрата натрия. Методом спектрального анализа установлено, что основным пигментом в обеих водорослях является фикоэритрин, содержание которого в *A. flabelliformis* в 3 раза выше, чем в *M. pacificus*. Показано также, что водоросль *A. flabelliformis* продуцирует больше полисахаридов, чем *M. pacificus*. Согласно данным ИК-спектроскопии, полисахариды из *A. flabelliformis* и *M. pacificus* имеют гибридную структуру и представляют собой каппа/йота-каррагинаны. Методом динамического рассеяния света (ДРС) и электрокинетических измерений показано, что выделенные полисахариды характеризуются значительной полидисперсностью и высоким значением отрицательного поверхностного заряда.

Ключевые слова: фикобилипротеины, сульфатированные полисахариды, ИК-спектроскопия, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, *Mastocarpus pacificus*.

COMPREHENSIVE STUDY OF PHYCOBILIPROTEINS AND SULFATED POLYSACCHARIDES FROM
THE RED ALGAE *AHNFELTIOPSIS FLABELLIFORMIS* AND *MASTOCARPUS PACIFICUS*
(PHYLLOPHORACEAE)

Kravchenko A.O., Glazunov V.P., Volod'ko A.V., Yermak I.M.
G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry
100 Let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russian Federation
e-mail: kravchenko_25.89@mail.ru

Abstract. The comparative analysis of phycobiliproteins and sulfated polysaccharides isolated by successive extraction by some various methods from red algae *Ahnfeltiopsis flabelliformis* and *Mastocarpus pacificus* (Phyllophoraceae) Sea of Japan was performed. It was found that efficient extraction of phycobiliproteins was by means of 1.5 % sodium nitrate solution. The method of spectral analysis revealed that the major pigment in both algae was phycoerythrin with its content being 3-folds higher in *A. flabelliformis* than in *M. pacificus*. It was shown that *A. flabelliformis* produced greater amount of polysaccharides by comparison to *M. pacificus*. According to IR spectroscopy, polysaccharides from *A. flabelliformis* and *M. pacificus* had a hybrid structure and represented kappa/iota-carrageenans. It was shown by dynamic light scattering (DLS) and electrokinetic measurements that the isolated polysaccharides were characterized by a large polydispersity and a high value of negative surface charge.

Key words: phycobiliproteins, sulfated polysaccharides, IR-spectroscopy, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, *Mastocarpus pacificus*.

Красные водоросли являются источником уникальных по структуре и физико-химическим свойствам биологически активных веществ. Основными структурными компонентами клеточной стенки красных водорослей являются сульфатированные полисахариды – агар и каррагинан, которые благодаря физико-химическим свойствам и разнообразной физиологической активности находят широкое применение в биотехнологии, медицинской и фармацевтической промышленности. В основе структуры этих полисахаридов лежит повторяющееся дисахаридное звено, состоящее из остатков D-галактозы и ее производных, соединенных регулярно чередующимися β -(1 \rightarrow 4) и α -(1 \rightarrow 3) гликозидными связями. Структурное разнообразие этих полисахаридов обусловлено тем, что 4-О-замещенный моносахаридный остаток может быть представлен как галактозой, так и ее 3,6-ангидропроизводным, находящимся в L-форме в случае агара и в D-форме в случае каррагинана. Три широко используемых типа каррагинана, обозначенные как каппа- (κ), йота- (ι), так называемые желеобразующие типы, и лямбда- (λ , нежелеобразующий тип) каррагинаны содержат, соответственно, одну, две или три сульфатные группы на одно повторяющееся дисахаридное звено [1].

Наряду с полисахаридами, красные водоросли содержат пигменты светособирающего комплекса – фикобилипротеины (ФБП) (фикоэритрин, фикоцианин и аллофикоцианин), представляющие собой высокомолекулярные комплексные соединения, в которых хромофорная группа пигмента ковалентно связана с остатком цистеина водорастворимого белка. ФБП обладают яркой окраской и интенсивной флуоресценцией, что определяет их использование в иммунофлуоресцентной диагностике, пищевой и косметической промышленности [2].

Качественный и количественный состав полисахаридов и пигментов красных водорослей зависит от множества факторов, связанных как условиями произрастания водоросли, так и с физиологией макрофита, в частности его видовой принадлежностью и стадией развития [3].

Перспективы широкого использования компонентов красных водорослей – ФБП и полисахаридов в различных областях промышленности и медицины обуславливают необходимость разработки методов их комплексного извлечения с максимальным выходом. Кроме того, получение этих соединений в едином технологическом цикле является основой рационального использования природных ресурсов и позволяет сократить количество отходов производства.

Цель данной работы заключается в сравнительной характеристике пигментов и полисахаридов, выделенных последовательной экстракцией из красных водорослей *Ahnfeltiopsis flabelliformis* и *Mastocarpus pacificus*, являющихся представителями семейства Phyllophoraceae.

Водоросли *A. flabelliformis* и *M. pacificus* были собраны в заливе Петра Великого Японского моря в июле 2012 г. и в июле 2015 г., соответственно, на глубине 0.5 м и идентифицированы с помощью электронного микроскопа. Для выделения из водорослей ФБП использовали два способа: экстракцию 0.1 М фосфатным буфером (рН 6.8) (метод 1) и 1.5 % водным раствором нитрата натрия (рН 6.5) (метод 2), как описано в работе Кравченко с соавторами [4]. Идентификацию пигментов проводили спектральным методом по максимумам поглощения, характерным для фикоэритрина (ФЭ) в области 565 нм, фикоцианина (ФЦ) – 615 нм и аллофикоцианина (АФЦ) – 650 нм. Спектры поглощения пигментов представлены на рисунке 1. Содержание фикобилинов, рассчитанное по формулам Розенберга [5], приведено в таблице 1. Как показали результаты (см. табл. 1), 1.5 % раствор нитрата натрия является более эффективным реагентом для выделения пигментов из обеих водорослей. Количество ФБП, экстрагируемых из *A. flabelliformis*, почти в 3 раза больше, чем из *M. pacificus*, что может быть связано с большей жесткостью клеточной стенки *M. pacificus*. Согласно спектральным данным ФЭ является основным фикобилипротеином и по содержанию превосходит количество ФЦ и АФЦ более чем в 5 раз.

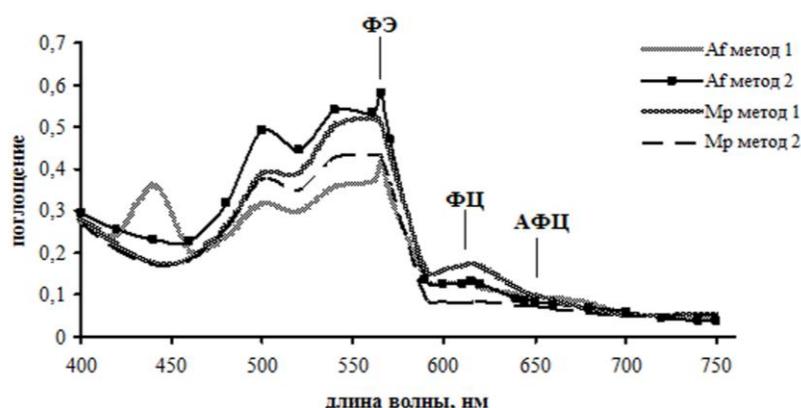


Рисунок 1 – Спектры поглощения фикобилипротеинов, выделенных двумя способами из *A. flabelliformis* (Af) и *M. pacificus* (Mp)

Таблица 1 – Содержание ФБП, выделенных из *A. flabelliformis* и *M. pacificus*, собранных в заливе Петра Великого в июле 2012 г. и июле 2015 г., соответственно

Пигмент	Содержание пигментов, мг/г сухой массы водоросли			
	<i>A. flabelliformis</i>		<i>M. pacificus</i>	
	Метод 1	Метод 2	Метод 1	Метод 2
ФЭ	0.78±0.080	1.440±0.050	0.220±0.010	0.440±0.050
ФЦ	0.170±0.010	0.270±0.020	0.060±0.001	0.030±0.001
АФЦ	0.170±0.040	0.210±0.020	0.030±0.001	0.030±0.001

Примечание: метод 1 – 0.1 М фосфатный буфер, метод 2 – 1.5 % раствор нитрата натрия

После извлечения пигментов из водоросли выделяли полисахариды, проводя их последовательную экстракцию водой при 80°C трижды. Полученные экстракты объединяли и центрифугировали при 4000 об/мин 4 °C в течение 30 мин для удаления остатков клеточной стенки, очищали от низкомолекулярных примесей и концентрировали на фильтрационной колонке VivaFlow 200 (Германия) с размером мембраны 100 кДа. Полисахариды осаждали тройным объемом 96 % этанола. Выходы полисахаридов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Выходы и химический состав полисахаридов (ПС), выделенных из *A. flabelliformis* и *M. pacificus* при 80 °С

Образец водоросли	Метод выделения ФБП	Выход ПС, % от сухой массы водоросли	Содержание, % от навески ПС					Молярное соотношение AnGal:Gal:SO ₃ Na
			Gal	AnGal	Glc	Xyl	SO ₃ Na	
Af	метод 1	51.3±4.3	32.8	12.6	2.9	0.9	21.4	1.0:2.3:2.4
	метод 2	49.3±1.2	35.8	13.3	2.7	1.4	24.1	1.0:2.4:2.5
Mp	метод 1	31.0±2.5	42.0	29.9	н/о	0.7	31.2	1.0:1.2:1.5
	метод 2	38.5±3.3	43.8	26.5	1.0	0.7	28.5	1.0:1.5:1.5

Примечание: Af – *Ahnfeltiopsis flabelliformis*, Mp – *Mastocarpus pacificus*, Gal – галактоза, AnGal – 3,6-ангидрогалактоза, Glc – глюкоза, Xyl – ксилоза

Согласно результатам анализа, выход полисахаридов из *A. flabelliformis* выше, чем из *M. pacificus* на 10-20 % (см. табл. 2) и незначительно зависит от типа реагента, используемого для выделения пигментов. По данным химического анализа продуктов восстановительного гидролиза полисахаридов в виде ацетатов полиолов [6] и альдононитрилов [7], проведенного методом ГЖХ (хроматограф 6850, «Agilent», Германия), основными моносахаридами выделенных полисахаридов являются галактоза и 3,6-ангидрогалактоза – главные структурные компоненты каррагинана и агара (см. табл. 2). Как видно из таблицы 2, содержание галактозы во всех исследуемых образцах полисахаридов было достаточно высоким (33-44%) независимо от рода водоросли и способа выделения пигментов. В то же время количество 3,6-ангидрогалактозы в полисахариде из *M. pacificus* в 2-2.5 раза, а сульфатных групп – на 4-10 % выше, чем у *A. flabelliformis*. Помимо основных моносахаридов, в полисахаридах обеих водорослей также присутствовали в незначительных количествах глюкоза и ксилоза (Табл. 2), которые могут быть структурными единицами флоридного крахмала и ксилана, соответственно [1]. Кроме того, ксилоза может присутствовать в полисахариде в качестве единичных терминальных остатков, замещающих одну из гидроксильных групп галактана, что было показано нами ранее [8]. Молярное соотношение 3,6-ангидрогалактозы, галактозы и сульфатных групп позволяет сделать предположение о структурных особенностях синтезируемых водорослями полисахаридов. Полисахариду из *M. pacificus* соответствует более регулярная структура, характеризующаяся молярным соотношением основных моносахаридных остатков около 1, тогда как этот показатель в случае полисахарида из *A. flabelliformis* указывает на значительную нерегулярность построения полимерной цепи (см. табл. 2).

Метод ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием (Vector 22 («Bruker», Германия)) позволил провести сравнительный структурный анализ выделенных полисахаридов. Полученные спектры полисахаридов были сопоставлены со спектрами каррагинанов с известными предельными структурами. В ИК-спектрах исследуемых полисахаридов наблюдаемая интенсивная полоса поглощения в области 1240-1250 см⁻¹ (см. рис. 2) указывает на присутствие значительного количества сульфатных групп [9]. В обоих спектрах наблюдается полоса поглощения при 932 см⁻¹, характерная для 1,4-связанной 3,6-ангидрогалактозы, и полоса поглощения при 848 см⁻¹, относящаяся к вторичной аксиальной сульфатной группе при C-4 1,3-связанного остатка β-D-галактозы, что позволяет предположить, что в структурах обоих полисахаридов присутствуют дисахаридные звенья каппа-типа [10]. Кроме того, в спектрах полисахаридов из обеих водорослей присутствует полоса поглощения при 805 см⁻¹ (см. рис. 2), которая характерна для вторичной аксиальной сульфатной группы при C-2 1,4-связанного остатка 3,6-ангидро-D-галактозы, что может указывать на присутствие в структуре полисахарида дисахаридных звеньев йота-типа [11]. Следует отметить, что в ИК-спектрах полисахаридов в области 890 см⁻¹ наблюдается небольшое плечо (см. рис. 2), указывающее на наличие нессульфатированного остатка галактозы, что характерно как для бета-, так и для альфа-типов каррагинанов [9]. Данные ИК-спектроскопии свидетельствуют о том, что полисахариды из водорослей *A. flabelliformis* и *M. pacificus* представляют собой в основном каппа/йота-каррагинаны и содержат остатки нессульфатированной галактозы, для отнесения которой к тому или иному типу полисахарида требуются дальнейшие исследования.

Для физико-химической характеристики полисахаридов были использованы методы динамического рассеяния света (ДРС) и электрокинетических измерений (Zetasizer Nano –Malven, Великобритания). Данные, полученные ДРС, показали, что исследуемые полисахариды в 0.15 М растворе NaCl проявляют высокую степень полидисперсности, образуя крупные отрицательно заряженные частицы. Значения зета-потенциала полисахаридов из *A. flabelliformis* и *M. pacificus* незначительно отличаются и составляют – 33.3±2.7 мВ и – 39±0.5 мВ, соответственно.

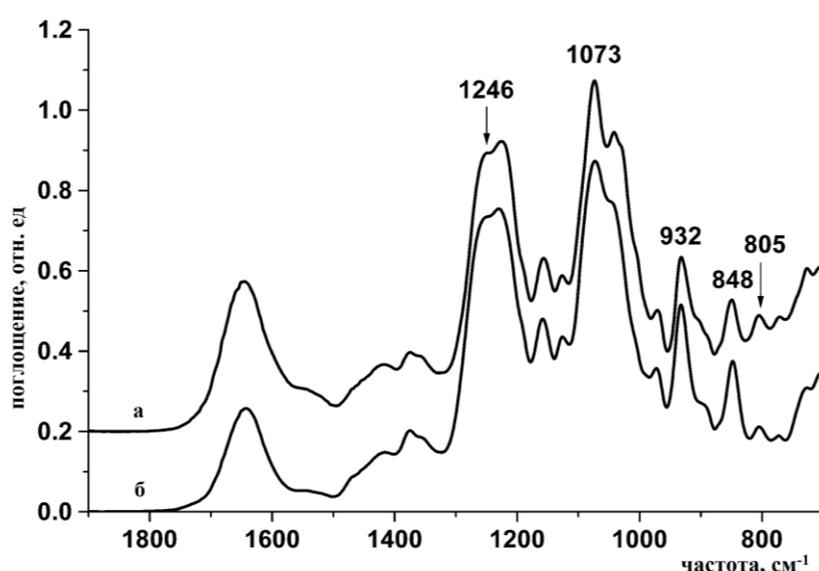


Рисунок 2 – ИК-спектры полисахаридов, выделенных из водорослей *A. flabelliformis* (а) и *M. pacificus* (б)

Таким образом, экстракция ФБП 1.5% раствором NaNO_3 позволяет увеличить выход ФЭ из водорослей *A. flabelliformis* и *M. pacificus* в 2 раза. Независимо от метода выделения пигментов, количество извлекаемых из *A. flabelliformis* ФБП и полисахаридов выше, чем из *M. pacificus*. Согласно данным химического анализа и ИК-спектроскопии, полисахариды из обеих водорослей представляют собой каппа/йота-каррагинаны и содержат остатки несультатированной галактозы, при этом полисахарид из *M. pacificus* характеризуется большей регулярностью.

Работа поддержана грантом ДВО РАН (№ 15-1-5-003).

Список литературы / References:

1. Craigie J.S. *Cell wall. Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, pp. 221-257.
2. Sekar S., Chandramohan M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *J. Appl. Phycol.*, 2008, vol. 20, pp. 113-136.
3. Hung D., Hori K., Nang H.Q., Kha T., Hoa L.T. Seasonal changes in growth rate, carrageenan yield and lectin content in the red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in Camranh Bay, Vietnam. *J. Appl. Phycol.*, 2009, vol. 21, pp. 265-272.
4. Kravchenko A.O., Belous O.S., Glazunov V.P., Ermak I.M. Comprehensive study of phycobiliproteins and sulfated polysaccharides from the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Chem. Nat. Compd.*, 2013, vol. 49, no. 2, pp. 201-205.
5. Rosenberg G. *Ecological growth strategies in the seaweeds Gracilaria foliifera (Rhodophyceae) and Ulva sp. (Chlorophyceae)*. PhD Thesis, New Haven, Connecticut, 1981, 151 p.
6. Englist H.N., Cummings J.H. Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by liquid chromatograph of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst.*, 1984, vol. 109, no. 6, pp. 937-942.
7. Усов А.И., Элашвили М.Я. Количественное определение производных 3,6-ангидрогалактозы и специфическое расщепление галактанов красных водорослей в условиях восстановительного гидролиза. *Биорг. Химия*, 1991, т. 17, № 6, с. 839-848. [Usov A.I., Elashvili M.Y. Quantitative-Determination of 3,6-Anhydrogalactose Derivatives and Specific Fragmentation of the Red Algal Galactans under Reductive Hydrolysis Conditions. *Bioorganic. Khim.*, 1991, vol. 17, no. 6, pp. 839-848. (In Russ.)]
8. Kravchenko A.O., Anastyuk S.D., Isakov V.V., Sokolova E.V., Glazunov V.P., Yermak I.M. Structural peculiarities of polysaccharide from sterile form of Far Eastern red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Carbohydr. Polym.*, 2014, vol. 111, pp. 1-9.
9. Pereira L., Amado A.M., Critchley A.T., Velde F.V., Ribeiro-Claro P.J.A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and RT-Raman). *Food Hydrocoll.*, 2009, vol. 30, pp. 1-7.
10. Rees D.W., Santos G.A., Dumont L.E., Parent C.A., Stanley N.F., Stancioff D.J., Guiseley K.B. β -Carrageenan: Isolation and characterization. *Carbohydr. Polym.*, 1993, vol. 22, pp. 247-252.
11. Prado-Fernandez J., Rodriguez-Vazquez J.A., Tojo E., Andrade J.M. Quantitation of κ -, ι - and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. *Anal. Chim. Acta*, 2003, vol. 480, pp. 23-37.