

ПОЛИСАХАРИДЫ И СТЕРИНЫ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *CAULERPA LENTILLIFERA* И *C. SERTULARIOIDES*

Н. М. Шевченко^а, Ю. В. Бурцева^а, Т. Н. Звягинцева^{а*}, Т. Н. Макарьева^а, О. С. Сергеева^а, А. М. Захаренко^а,
В. В. Исаков^а, Nguyen Thi Linh^б, Nguyen Xuan Hoa^б, Bui Minh Ly^в, Pham Van Huynh^в

а) Тихоокеанский институт биоорганической химии, ДВО РАН, Россия, 690022, Владивосток,
прос. 100-летия Владивостока, 159, факс: +7(4232) 31 40 50, e-mail: zvyag@piboc.dvo.ru

б) Institute of Oceanography, Vietnamese Academy of Science and Technology, Vietnam,
Fax: +84 (58) 59 00 34, e-mail: haiduong@dng.vnn.vn

в) Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnamese Academy of Science and Technology,
Vietnam, Fax: +84 (58) 52 18 47, e-mail: bminhly@dng.vnn.vn

Изучены стеринны и полисахариды зеленой водоросли *Caulerpa lentillifera*, выращенной в лабораторных условиях и в условиях марикультуры, и полисахариды зеленой водоросли *C. sertularioides*, выращенной в естественных условиях. Фракция стеринов независимо от условий выращивания водоросли состояла из C₂₇-C₂₉ стероидных спиртов, имевших Δ⁵-ненасыщенность в стероидном ядре. Преобладающим (79.9%) стеринным компонентом фракции стеринов является клинастерин. Водорастворимая фракция водоросли *C. lentillifera*, выращенной в лабораторных условиях, представляла собой смесь 1,4-α- и 1,3-β-D-глюкоанов и белка. Такая же фракция, выделенная из водоросли *C. lentillifera*, выращенной в условиях марикультуры, содержала только белок. В составе водорастворимой фракции водоросли *C. sertularioides*, выращенной в естественных условиях, был обнаружен сульфатированный по C2 1,3;1,6-β-D-галактан. Основными компонентами щелочерастворимых фракций полисахаридов из всех образцов водорослей были 1,4-α-D-глюканы.

Ключевые слова: зеленые водоросли, *Caulerpa lentillifera*, *C. sertularioides*, полисахариды, стеринны, клинастерин.

Морские водоросли, в том числе представители отдела зеленых водорослей (*Chlorophyta*), к которому относится род *Caulerpa*, – богатый источник стеринов, отличающихся по химической структуре от холестерина – основного стерина высших животных. Стероиды имеют важное биологическое значение, являясь гормонами, витаминами и структурными компонентами биомембран.

Важным компонентом водорослей являются полисахариды, повышенный интерес к которым связан с широким спектром их биологического действия. Так, например, из зеленых водорослей *Caulerpa racemosa*, *C. brachypus*, *C. okamurai*, *C. scapelliformis*, *Chaetomorpha crassa*, *C. spiralis*, *Codium adhaerens*, *C. fragile*, *C. latum*, *Enteromorpha compressa*, *Monostroma nitidum*, *Ulva* spp. выделены полисахариды, проявляющие антикоагулянтное, антиопухоловое действие и др. [1–4].

Цель работы – изучение полисахаридов и стеринов

зеленых водорослей *C. lentillifera* и *C. sertularioides*, состав и структура которых ранее не исследовались.

В работе использовали образцы зеленой водоросли *Caulerpa lentillifera*, выращенной в лабораторных условиях при температуре 25–30°C (естественное освещение; собрана 20 января 2005 г., образец 1) и в искусственных водоемах в затенении (собрана 15 апреля 2007 г., в провинции Хань Хоа, деревне Нинь Хоа, Вьетнам; образец 2), а также образцы *C. sertularioides*, собранной в естественных условиях в мае 2007 г. (образец 3).

Стероидные компоненты водоросли *C. lentillifera*, выделенные из образцов 1 и 2 (см. экспериментальную часть), идентифицировали по масс-спектрам их ацетатов с учетом хроматографического поведения методами газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на капиллярной колонке. Состав стеринной фракции образца 1 представлен в табл. 1. Состав и количество стеринов, выделенных из разных образцов, были аналогичны.

ТАБЛИЦА 1. Состав стеринной фракции St водоросли *Caulerpa lentillifera*

Стерин (ацетаты)	M ⁺ (ацетатов)	ОБУ (относительно ацетата холестерина)	Содержание, %
Холеста-5,22E-диен-3β-ол	426	0.695	1.4
Холест-5-ен-3β-ол	428	1.000	11.0
24-Метилхолеста-5,22E-диен-3β-ол	440	1.098	1.6
24-Метилхолеста-5,24(28)-диен-3β-ол	440	1.240	1.5
24-Метилхолест-5-ен-3β-ол	442	1.242	0.6
24-Этилхолеста-5,22E-диен-3β-ол	454	1.333	4.0
24S-Этилхолест-5-ен-3β-ол (клинастерин)	456	1.510	79.9

ТАБЛИЦА 2. Характеристика полисахаридных фракций P1, P2, P3 из зеленой водоросли *Caulerpa lentillifera* и *Caulerpa sertularioides*

Фракция	Выход, %*	Мм, кДа	Моносахаридный состав, мольные доли			
			Glc	Gal	Man	Xyl
P1-1	2.7	20-60	1	0.2	0.2	0.1
P2-1	4.1	20-40	1	0.1	0.07	0
P3-1	3.5	70	1	0.3	0.2	0.2
P1-3	1.0	—	0.3	1	0.4	0.2
P2-3	0.8	—	1	0.5	0.2	0.3
P3-3	2.3	—	1	0.2	0	0

*Выход определен как процент от веса сухой обезжиренной водоросли.

Как видно из данных табл. 1, стеривая фракция состоит из C₂₇–C₂₉ стероидных спиртов с Δ⁵-ненасыщенностью в стероидном ядре. Преобладающим (79.9%) стеривым компонентом фракции является клионастерин, для которого определена абсолютная конфигурация при C-24 сравнением ЯМР ¹H-спектров с модельными 24S и 24R C₂₉ стеривами [5, 6]. В ЯМР ¹H-спектре присутствовали сигналы, характерные для 24S конфигурации: 0.68 (с, 3H, CH₃-18); 1.01 (с, 3H, CH₃-19); 0.93 (д, J = 6.8, 3H, CH₃-21); 0.83 (д, J = 6.8, 3H, CH₃-26); 0.81 (д, J = 6.8, 3H, CH₃-27); 0.86 (т, J = 7.0, 3H, CH₃-29); 3.5 (м, 1H, 3-H); 5.6 (м, 1H, 6-H).

Состав стеривой фракции подобен стеривам других водорослей рода *Caulerpa*, изученных ранее. Основным стеривом этого рода практически всегда являлся клионастерин [7].

Из 3 образцов исследуемых водорослей выделили и охарактеризовали по три фракции полисахаридов: водорастворимая – P1 и щелочерастворимые – P2, P3.

Ниже приведены результаты исследований веществ водо- (P1-1) и щелочерастворимых (P2-1, P3-1) фракций, полученных из образца 1. Содержание белка во фракции P1-1 оказалось достаточно высоким – около 20%. Аминокислотный состав белковой компоненты фракции P1-1 (содержание аминокислот выражено в мольных процентах) выглядел следующим образом: Asp (13.3); Thr (6.7); Ser (7.2); Glu (18.2); Gly (16.0); Ala (9.1); глюкозамин (1.2); Val (5.2); Ile (3.2); Leu (4.3); Tyr (0.9); Phe (1.5); His (0.5); Lys (3.7); Arg (1.6); цитрулин (3.5); Pro (3.9). В аминокислотном составе белковой компоненты преобладали Glu, Asp, Gly и Ala. Пролин (3.9) и его предшественник цитрулин (3.5) – постоянные компоненты клеток растений [8] – также присутствовали в заметных количествах.

Для дальнейшего исследования фракции освободили от белка методом Севага. Интервалы молекулярных масс полисахаридов фракций P1-1 и P2-1, определенные гелехроматографией, составили 20–60 и 20–40 кДа соответственно. Фракция P3-1 состояла из более высокомолекулярных полисахаридов Мм > 70 кДа. Исследование моносахаридного состава показало, что все фракции образца 1 состояли из Glc, Gal, Man и Xyl в разных соотношениях (табл. 2). Глюкоза преобладала в моносахаридном составе всех указанных фракций.

В спектре ЯМР ¹³C фракции P1-1 имелись сигналы, характерные для 1,4-α-D-глюкана (амилозы): C1 (101.21 м.д.); C2 (72.96 м.д.); C3 (74.91 м.д.); C4 (78.99 м.д.); C5 (72.96 м.д.); C6 (62.29 м.д.) и 1,3-β-D-глюкана (ламинарана) 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.); C6 (62.47 м.д.) [9]. Ранее 1,3-β-D-глюкан был обнаружен только в зеленой водоросли *Caulerpa simpliciuscula* [10]. В спектрах ЯМР ¹³C других фракций P2-1 и P3-1 преобладали сигналы, характерные для 1,4-α-D-глюкана.

В ИК-спектрах водо- и щелочерастворимых фракций полисахаридов, выделенных из *C. lentillifera* (образец 1) отсутствовали сигналы при 1230–1255 см⁻¹ и 815–850 см⁻¹ характерные для сульфатных групп (спектры 1 приведены). Например, из *Ulva rigida*, *Spongomorpha indica*, *C. racemosa*, *C. dwarfense* выделены полисахариды, содержащие сульфатные группы [1, 11, 12].

Водорастворимая фракция P1-2, выделенная из *C. lentillifera*, выращенной в условиях марикультуры (образец 2; выход фракции составил около 2% от веса обезжиренной водоросли), состояла практически только из белка. По данным фенол-сернокислотного метода содержание сахаров не превышало 0.1% от веса фракции. Моносахариды также не обнаружены в этой фракции после ее гидролиза. Щелочерастворимые фракции P2-2, P3-2, как и в случае образца 1, по результатам ЯМР ¹³C спектроскопии содержали амилозу.

Из дикорастущей зеленой водоросли *C. sertularioides* (образец 3) также выделили и охарактеризовали три фракции: P1-3, P2-3, P3-3. Анализ моносахаридного состава фракции P1-3 показал преимущественное содержание ней галактозы и в меньшей степени глюкозы (табл. 2). В спектре ЯМР ¹³C водорастворимой фракции P1-3 имелись интенсивные сигналы с химическими сдвигами 102.6, 79.3, 77.1, 74.6, 70.4, 68.7 м.д. Кроме того, в спектре ЯМР ¹³C фракции P1-3 были также менее интенсивные сигналы, соответствующие 1,4-α-D-глюкану. Из спектра ЯМР ¹³C также следовало, что фракция P1-3 содержала ацетильные группы (21.71 м.д. CH₃; 175.92 м.д. C=O).

Процедуру дезацетилирования, несмотря на потерю информации о положении ацетильных групп, часто применяют, чтобы сделать спектры ЯМР полисахаридов более простыми и интерпретируемыми [13]. После дезацетилирования фракции P1-3 с последующим диализом на центрифужной мембране отделили низкомолекулярный 1,4-α-D-глюкан и получили фракцию P1(1)-3 с выходом 44%, содержащую полисахарид, состоящий в основном из галактозы. В ИК-спектре фракции P1(1)-3 наблюдалась полоса поглощения при 1252 см⁻¹ (S=O валентные колебания) и полоса при 818 см⁻¹ (C-O-S деформационные колебания), характерная для сульфатных групп, которые могут быть локализованы либо

при C2, либо при C6 остатка галактозы (спектры не приведены) [14]. Данные 2D корреляционных спектров COSY и HSQC для этого полисахарида позволяют отнести сигналы в спектре ^{13}C следующим образом: сигнал 102.6 (C1), 79.3 (C2), 77.1 (C3), 68.7 (C4), 74.6 (C5), 70.4 м.д. (C6) [9]. Сигнал аномерного протона H_1 , связанного с C1 атомом, резонирует при 4.63 м.д с КССВ $\tau = 7.3$ Гц, а сигнал H_2 резонирует при δ 4.38 м.д, что указывает на β -конфигурацию гликозидной связи и замещение C2 атома SO_3 -группой. Величина химического сдвига C6 атома 70.6 м.д. указывает на гликозилирование CH_2OH -группы β -гликозидной связью, что подтверждают и данные известных из литературы спектров ЯМР ^{13}C сульфатированных 1,3;1,6- β -D-галактанов [15]. Таким образом, исследуемый полисахарид является 1,3;1,6- β -D-галактаном, сульфатированным по C2-атому остатка галактозы.

В спектрах ЯМР ^{13}C фракций P2-3 и P3-3 преобладали сигналы, характерные для 1,4- α -D-глюкана. Фракция P2-3 содержала небольшую примесь сульфатированного по C2 1,3;1,6- β -D-галактана, составляющего основу фракции P1-3.

Таким образом, стеринный состав зеленой водоросли *C. lentillifera* независимо от условий культивирования водоросли представлен в основном клионастерином, что, согласно литературным данным, характерно для водорослей рода *Caulerpa*. Особенностью полисахаридного состава исследованных видов является отсутствие сульфатированных полисахаридов в водорослях, выращенных в условиях марикультуры. Сульфатированный 1,3;1,6- β -D-галактан обнаружен только в дикорастущей водоросли *C. sertularioides*. В *C. lentillifera*, выращенной в лабораторных условиях, обнаружено небольшое количество 1,3- β -D-глюкана – основного резервного полисахарида бурых и диатомовых водорослей [16]. *C. lentillifera* богата водорастворимыми белками, аминокислотный состав которых достаточно разнообразен.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение стеринной фракции. Влажную водоросль (вес высушенной водоросли 3.0 г) экстрагировали этанолом при комнатной температуре (3×200 мл). Этанольный экстракт упаривали в вакууме досуха (500 мг), растворяли в воде и экстрагировали бутанолом (3×50 мл). Бутанольные экстракты объединяли, упаривали досуха (100 мг) и дважды хроматографировали на колонке с силикагелем в CHCl_3 . Получили стеринную фракцию (9 мг, 0.3% на сухой вес водоросли), индивидуальную при ТСХ.

Экстракция полисахаридов [14]. Обезжиренные этанолом измельченные зеленые водоросли *C. lentillifera* (образцы 1 и 2 : 3.2 г и 12.8 г соответственно) и *C. sertularioides* (образец 3; 12.0 г) экстрагировали водой (200, 900 и 800 мл соответственно) при 80°C в течение 30 мин. Процедуру повторили трижды. Суммарный экстракт лиофильно высушивали после упаривания, диализа и осаждения этанолом (1:4). Получили водорастворимые фракции (P1) из трех образцов

водоросли – соответственно P1-1 (87 мг), P1-2 (38 мг), P1-3 (120 мг).

Остаток водоросли экстрагировали раствором 1 М KOH, содержащим 20 mM NaBH_4 , при 37°C (4 ч), затем при 4°C в течение 17 ч. Полученный экстракт нейтрализовали AcOH (до pH 6.0), диализовали ультрафильтрацией с использованием мембраны Millipore-1 кДа (Millipore, США). Щелочерастворимые фракции (P2) из трех образцов водоросли – P2-1 (130 мг), P2-2 (78 мг), P2-3 (99 мг) – лиофильно высушивали.

К остатку водоросли приливали 4 М раствор KOH, содержащий 20 mM NaBH_4 , экстрагировали аналогичным образом. Выход щелочерастворимых фракций (P3) из трех образцов водоросли P3-1 (113 мг), P3-2 (315 мг), P3-3 (272 мг) соответственно.

Освобождение от белка водного раствора фракции P1-1 (87 мг в 2 мл) проводили по методу Севага [17].

Деацетилирование полисахаридов фракции P1-3 (100 мг) проводили обработкой 12% водным раствором аммиака в течение 14 ч при 37°C . Выпавший осадок удаляли центрифугированием, супернатант диализовали ультрафильтрацией с использованием центрифужных мембран Millipore-10 кДа (Millipore, США). Получили две фракции – P1(1)-3-фракция над мембраной (44 мг) и P1(2)-3-фракция под мембраной (21 мг).

Молекулярную массу полисахаридов оценивали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75-HR 10/30 (1.0 см \times 30 см) (Amersham Pharmacia Biotech AB, США), уравновешенной фосфатным буфером, pH 7.2, содержащим 0.15 М NaCl. Элюцию проводили этим же буфером со скоростью 0.4 мл/мин. В качестве стандартов использовали декстраны с молекулярной массой 10, 20, 40, 80 кДа.

Нейтральные сахара определяли фенол-сернокислотным методом [18].

Содержание белка определяли методом Бредфорда [19].

Аминокислотный состав белков, содержащихся в водорастворимой фракции P1-1, определяли после гидролиза фракции 6 М HCl при 100°C (24 ч) на автоматическом анализаторе Biochrom-30 (200 \times 4.6, смола Ultrasac-8 мкм [Li^+]), соотношение аминокислот – путем сравнения площадей пиков исследуемых образцов с площадями пиков стандартной смеси аминокислот (Sigma, США).

Моносахаридный состав полисахаридов. Фракции полисахаридов (по 5 мг) подвергали гидролизу 2 М TFA при 100° (4 ч). Моносахаридный состав фракций определяли на углеводном анализаторе IC-5000 Biotronik (Германия; колонка Shim-pack ISA-07/S2504 (0.4 \times 25 см), калий-боратный буфер, скорость элюции 0.6 мл/мин. Обнаружение сахаров проводили бинциннинатным методом; интегрирующая система Shimadzu C-R2 AX. Моносахариды (Rha, Rib, Man, Fuc, Gal, Xyl, Glc) использовали в качестве стандартов.

ИК-спектры полисахаридов регистрировали на спектрофотометре с Фурье преобразованием FTIR Vector 22 (Bruker, Германия) в пленке с разрешением 4 см^{-1} .

ГЖХ стеринной фракции проводили на хроматографе Agilent 6850, капиллярная колонка HP-5MS (30 м \times 0.25 мм, Agilent, США) при 290°C .

ГЖХ-масс-спектрометрический анализ. Фракцию стеринов ацетилировали смесью As_2O_3 – Pu (1:1) в течение 16 ч при комнатной температуре и анализировали на масс-спектрометре Hewlett-Packard HP 6890 (энергия ионизации 70 эВ, газ-носитель – гелий), капиллярная колонка HP-5MS (30 м × 0.25 мм, Agilent, США) при 270°C.

Колоночную препаративную хроматографию фракции стеринов проводили на силикагеле КСК (50–160 мкм, Сорбполимер, Россия).

ТСХ фракции стеринов выполняли на пластинках Sorbfil с закрепленным на фольге слоем силикагеля СТХ-1А (5–17 мкм, Сорбполимер).

Спектры ЯМР ^{13}C полисахаридов регистрировали на спектрометре Bruker Avance DPX-300 (D_2O ; рабочая частота 75.5 МГц, внутренний стандарт метанол, δ_C 50.15 м.д. при 60°C).

Спектры ЯМР 1H стеринов регистрировали на спектрометре Bruker DRX 500 ($CDCl_3$, рабочая частота 123.8 МГц, внутренний стандарт Me_4Si).

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 07-04-90010-в-ет-а, ДВО РАН и программы Президиума РАН «Клеточная и молекулярная биология».

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Ghosh, U. Adhikari, P. Ghosal, C. Pujol, M. Carlucci, E. Damonte, B. Ray, *Phytochemistry*, **65**, 3151 (2004)
2. J.-B. Lee, K. Hayashi, M. Maeda, T. Hayashi, *Planta Med.*, **70**, 813 (2004)
3. M. Maeda, T. Uehara, N. Harada, M. Sekiguchi, A. Hiraoka, *Phytochemistry*, **30**, 3611 (1991)
4. N. Noda, H. Amano, K. Arashime, K. Nisizawa, *Hydrobiologia*, **204/205**, 577 (1990)
5. I. Rubinstein, L. J. Goad, A. D. H. Clag L. J. Mulheirn, *Phytochemistry*, **15**, 195 (1976)
6. T. N. Makarieva, I. A. Bondarenko, A. S. Dmitren V. M. Boguslavsky, V. A. Stonik, V. I. Chern S. M. Efremova, *J. Nat. Prod.*, **54**, 953 (1991)
7. L. DeNapoli, S. Magno, L. Mayol, E. Novelli *Phytochemistry*, **21**, 1993 (1982)
8. Н. И. Шевякова, *Физиол. растений*, **3**, 768 (1983)
9. Т. Н. Звягинцева, Н. И. Широкова, Л. А. Еляко *Биоорган. химия*, **20**, 1349 (1994)
10. R. J. Howard, S. W. Wright, B. R. Grant, *Plant Physiol* **58**, 459 (1976)
11. A. K. Siddhanta, M. Shanmugam, K. H. Mo A. M. Goswami, B. K. Ramavat, *Int. J. Biol. Macromol* **26**, 151 (1999)
12. E. V. Rao, N. V. Rao, K. S. Ramana, *Phytochemistry*, **1183** (1991)
13. M. I. Bilan, A. A. Grachev, N. E. Ustuzhanir A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev, A. I. Usov *Carbohydr. Res.*, **337**, 719 (2002)
14. K. Chattopadhyay, U. Adhikari, P. Lerouge, B. R. *Carbohydr. Polymers*, **68**, 407 (2007)
15. M. I. Bilan, E. V. Vinogradova, A. S. Shashkov A. I. Usov, *Carbohydr. Res.*, **342**, 586 (2007)
16. T. J. Painter, *Pure Appl. Chem.*, **55**, 677 (1983)
17. А. М. Штауб, *Методы химии углеводов*, под ред Н. К. Кочеткова, Мир, Москва, 1967, 261
18. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton P. A. Robers, F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
19. M. Bradford, *Analyt. Biochem.*, **72**, 248 (1976)

Поступило в редакцию 17.07.1