



УДК 543.544

Оптические свойства и радиационная стабильность экстрактов морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin

Ревина А.А.¹, Геворгиз Р.Г.², Лозинина С.С.¹, Железнова С.Н.²,
Тхан Тайк¹, Павлов Ю.С.¹, Нехорошев М.В.², Рябушко В.И.²

¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

²Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь

Поступила в редакцию 14.12.2015 г.

Для широкого внедрения морепродуктов и получения препаратов с определенным содержанием биологически активных соединений нужны технологические методы их извлечения, стабилизации и определения функциональной активности. Настоящая работа посвящена изучению оптических свойств и радиационной стабильности спиртовых, ацетоновых экстрактов и выделенных биологически активных соединений из диатомовых микроводорослей *Cylindrotheca closterium* (г. Севастополь). Важными соединениями из бурых морских водорослей *Cystoseira* являются каротиноид фукоксантин и хлорофилл, которые по мнению наших и зарубежных ученых обладают высокой антиоксидантной и антиканцерогенной активностью. Концентрация фукоксантина (Фк) в клетках диатомовых культивируемых водорослей *Cylindrotheca closterium* составляет 78%. В работе мы исследовали содержание биологически активных соединений, на примере каротиноидной и хлорофилловой фракций в экстрактах *Cylindrotheca closterium*. Для расширения применения препаратов из бурых водорослей необходимо знать, как влияет природа водорослей, способ их культивирования и природа растворителей на выделение ценных биологически-активных соединений. Особое внимание было уделено определению радиационно-химической стабильности, поскольку в медицине часто используется радиационная стерилизация и исходного сырья, и полученных из него медицинских препаратов.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, *Cylindrotheca closterium*, экстракты, спектрофотометрия, ионизирующее γ - излучение, радиационная стабильность.

Optical properties and radiation stability of extracts of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin

Revina A. A.¹, Gevorgiz R. G.², Lozinina S. S.¹, Zheleznova S. N.²,
Than Htaik¹, Pavlov Yu. S.¹, Nekhoroshev M. V.², Ryabushko V. I.²

¹Russian chemical-technological University. D. I. Mendeleev, Moscow

²Institute of marine biological studies named after A. O. Kovalevsky Russian Academy of Sciences, Sevastopol

For wider implementation of the seafood and obtaining drugs with a definite content of biologically active compounds necessary technological methods of their extraction, stabilization and detection of functional activity. This work is devoted to study of optical properties and radiation stability of alcohol extracts, acetone extracts and selected bioactive compounds from microalgae diatom *Cylindrotheca closterium* (Sevastopol). Important compounds from brown seaweed *Cystoseira* are the carotenoid fucoxanthin and chlorophyll, which according to studies of our and foreign scientists have high antioxidant

and anticarcinogenic activity. Fucoxanthin concentration (FC) in cells cultured algae diatom *Cylindrotheca closterium* is 78%. In the work we investigated the content of biologically active compounds, for example, carotenoid and chlorophyll fractions in the extracts of *Cylindrotheca closterium*. To expand the use of preparations from brown algae it is necessary to know the effect of the nature of algae, methods of cultivation and the nature of solvents on the allocation of valuable biologically-active compounds. Special attention was paid to radiation-chemical stability, as in medicine, is often used for radiation sterilization of feedstock, and obtained from his medical drugs.

Keywords: diatoms, *Cylindrotheca closterium*, extracts, spectrophotometry, ionizing γ - radiation, radiation stability.

Введение

Диатомовые водоросли являются перспективным источником получения биологически активных веществ, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, полисахариды, витамины, каротиноиды и др. [1]. Многие продукты метаболизма диатомей широко применяются в медицине для лечения заболеваний кожи, желудка и т.д. [2]. Из всех метаболитов особый интерес представляют фотосинтетические каротиноиды, поскольку экспериментально доказано, что каротиноиды в организме человека способны нейтрализовать негативные последствия стресса, снижения иммунитета и т.п., а также последствия ионизирующего излучения [4]. Кроме того, концентрация некоторых фотосинтетических каротиноидов может достигать 1-2% от сухой массы водорослей [3]. В последнее время в лучевой терапии активно применяют экстракты из диатомовых и бурых водорослей в виде «чая» с высоким содержанием каротиноидных фракций и, в частности, фукоксантина, в результате чего экстракты внутри живых организмов подвергаются действию ионизирующего излучения [5]. Для получения таких экстрактов наиболее перспективным объектом является морская диатомея *Cylindrotheca closterium*, поскольку по нашим данным в плотной культуре в течение 5-6 дней способна накапливать до 2% от сухой массы фукоксантина.

В отечественной и зарубежной литературе данные по оптическим свойствам и радиационной стабильности экстрактов диатомей с высоким содержанием фукоксантина практически отсутствуют. Также нет сведений о радиационной стабильности препаратов на основе фукоксантина, оценки его деструкции при использовании радиационной стерилизации. Поэтому основная цель настоящей работы – выделение экстрактов из природного сырья – морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* – и изучение радиационно-химических превращений под действием γ -Co-60.

Эксперимент

В работе использовали высушенные образцы диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН (Севастополь).

Культуру *C. closterium* выращивали на разработанной нами питательной среде (RS) для интенсивного культивирования *C. closterium* (см. табл. 1) при постоянной температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объёмом 2 дм^3 , слоем 5 см, при круглосуточном освещении лампами ЛБ-40 (средняя освещённость рабочей поверхности – 13.25 клк). В процессе выращивания культуру барботировали

воздухом посредством компрессорной установки. Эксперименты проводили при pH=8-9.

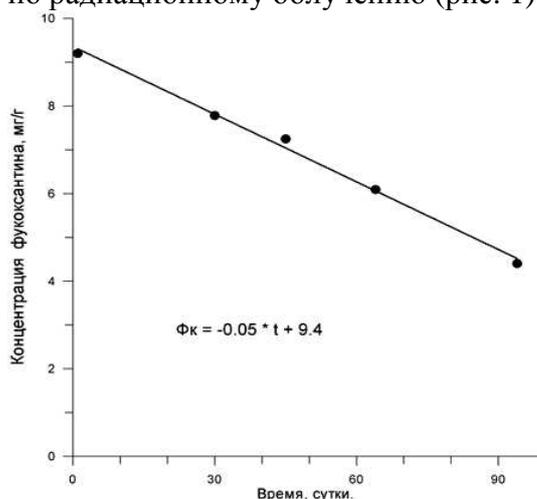
Таблица 1. Состав питательной среды для интенсивного культивирования *C. closterium*.

Компонент	Навеска, г/дм ³
1. NaNO ₃	0.776
2. NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	0.041
3. Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O	0.386
4. Na ₂ EDTA	0.0872
5. FeSO ₄ × 7H ₂ O	0.05
6. CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0.0002
7. ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0.00044
8. CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0.0002
9. MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0.00036
10. Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0.00012

Для получения воздушно-сухой биомассы сырую массу *C. closterium* высушивали при температуре 35°C. Высушенные образцы хранили в темноте при комнатной температуре. Для получения экстрактов 10 г сухой массы водорослей заливали 100 см³ этанола или ацетона и хранили в темноте при 22-25°C в течение 8-10 дней. После экстракции пробы фильтровали и измеряли спектры поглощения в видимом диапазоне, используя спектрофотометр СФ-2000 (кювета 1 см). Облучение образцов проводили при использовании установки γ-⁶⁰Co (РХМ-γ-Со-20), мощность дозы, определенная методом ферросульфатной дозиметрии, была равна 0.08 Гр/с, доза облучения варьировалась от 0.28 кГр до 1.1 кГр.

Обсуждение результатов

Известно, что фукоксантин разрушается в сухой биомассе микроводорослей под действием кислорода, так как он служит сильным окислителем. Поэтому нужно учитывать время хранения сухой биомассы от момента высушивания до экспериментальных работ по радиационному облучению (рис. 1).



Фк – фукоксантин; t – время, сутки.

Рис. 1. Динамика разрушения фукоксантина в воздушно-сухой биомассе *C. closterium* при хранении в темноте при температуре 20-23°C.

Скорость разрушения 0.05 мг/сут.

На рис. 1 представлена динамика разрушения фукоксантина в течение трех месяцев при комнатной температуре в темноте. Биомасса *C. closterium* хранилась в течение трех месяцев при температуре 20-23°C в темноте, при этом скорость разрушения фукоксантина была постоянной (0.05 мг/сут). Из рисунка видно, что функция разрушения фукоксантина была линейной, при этом угол наклона составил - 0.05. Таким образом, в течение всего времени скорость разрушения фукоксантина составила 1.5 мг/(г·мес.) (что соответствует 0.05 мг/г сухой биомассы в сутки). Следовательно, при хранении сухой биомассы в темноте при комнатной температуре за три месяца потеря фукоксантина составляла 50%.

UV-VIS спектрофотометрия экстрактов водорослей. Спектры оптического поглощения водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов при разбавлении (1:3, 1:6) представлены на рис. 2.

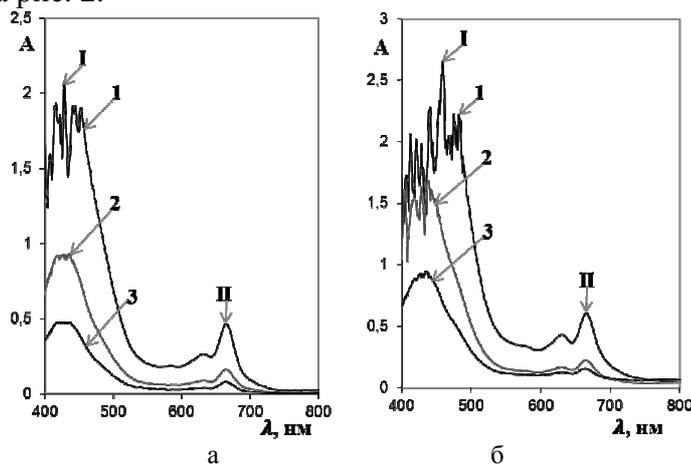


Рис. 2. Спектры оптического поглощения спиртовых (а) и ацетоновых (б) экстрактов *Cylandrotheca closterium*: 1 - исходный образец, 2 - при разбавлении 1:3, 3 - при разбавлении 1:6.

Изменения спектров оптического поглощения водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей (в присутствии кислорода воздуха) в результате воздействия гамма-облучения представлены на рис. 3 а и б. Спектральные характеристики (I-II) относятся к полосам поглощения компонентов экстрактов, включая каротиноидную фракцию с $\lambda \sim 400-550$ нм и хлорофилловую с $\lambda \sim 640-670$ нм.

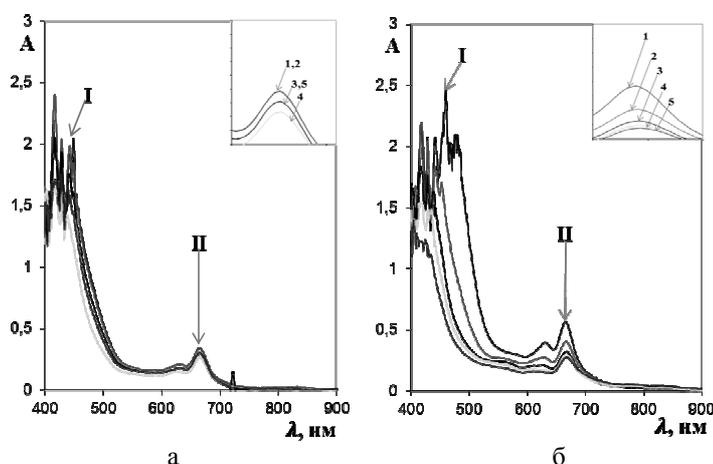


Рис. 3. Спектры оптического поглощения спиртовых (а) и ацетоновых (б) экстрактов *Cylandrotheca closterium*: 1 - исходного образца, 2 - 5 - после облучения при дозе (D), кГр: 2 - 0.28, 3- 0.56, 4 - 0.84, 5 - 1.1 кГр.

Из рис. 3 а и б видно, что происходит исчезновение фукоксантина ($\lambda=460$ нм) и образуются новые продукты, имеющие полосы поглощения со смещением максимального значения волны поглощения (λ_{\max}) в ультрафиолетовую область. Спектральные характеристики каротиноидных и хлорофилловых фракций экстрактов водорослей, зарегистрированных через (1-4) часа после облучения представлены в таблице 2.

Таблица 2. Спектральные характеристики оптического поглощения экстрактов водорослей *Cylindrotheca closterium* при разных дозах облучения

$\lambda, \text{нм}/\text{ОП}$	I	II	$\lambda, \text{нм}/\text{ОП}$	I	II
Исходный водно-спиртовой экстракт	440 / 2.3	630 / 0.2	Исходный водно-ацетоновый экстракт	440/ 2.4	665 / 0.6
0.28 кГр	440/ 2.4	630/ 0.2	0.28 кГр	440/ 1.3	667/ 0.4
0.56 кГр	440/ 2.1	630/ 0.2	0.56 кГр	440/ 0.8	665/ 0.3
0.84 кГр	440/ 1.6	628/ 0.2	0.84 кГр	440/ 0.6	666/ 0.3
1.1 кГр	440/ 1.7	630/ 0.2	1.1 кГр	440/ 0.5	667/ 0.3

*ОП - оптическая плотность

Анализ изменений оптической плотности облученных растворов в зависимости от дозы облучения показал, что радиационная стабильность спиртовых экстрактов выше ацетоновых. Можно оценить относительные изменения интенсивности поглощения каротиноидной фракции оптическая плотность (ОП) ~ 440 (по формуле 1):

$$\Delta A \approx 440 = \frac{A_0 - A_{(1.1 \text{ кГр})}}{A_0}, \quad (1)$$

где $\Delta A=0.26$ (спиртовой экстракт) и $\Delta A =0.8$ (ацетоновый экстракт); для хлорофилловых фракций оптическая плотность (ОП) ~ 645 (по формуле 2):

$$\Delta A \approx 645 = \frac{A_0 - A_{(1.1 \text{ кГр})}}{A_0}, \quad (2)$$

где $\Delta A =0.0$ (спиртовой экстракт) и $\Delta A =0.5$ (ацетоновый экстракт).

На рис. 4-а и 4-б представлены изменения спектров оптического поглощения облученных экстрактов и через 5 дней хранения, пострадиационный эффект (ПРЭ).

При изучении изменений спиртовых экстрактов при хранении облученных образцов при $T_{\text{комн.}}$ было зарегистрировано разрушение пигментов и в пострадиационный период. В ацетоновых экстрактах изменения в пострадиационный период носят более сложный характер при меньшей дозе.

Для того чтобы изменить условия окислительно-восстановительных реакций при радиоллизе в экстрактах, проводили насыщение растворов аргоном для удаления кислорода и подавления окислительных процессов.

Изменения спектральных характеристик оптического поглощения экстрактов микроводорослей при насыщении Ar , после гамма-облучения представлены на рис. 5 и в таблице 3.

На основании представленных данных можно сделать вывод о том, что в спиртовых деаэрированных экстрактах (насыщенных Ar) при большей дозе наблюдается почти полное разрушение пигментов. В ацетоновых экстрактах

происходят сложные процессы образования новых продуктов радиолитического распада с соответствующим изменением спектра оптического поглощения. При дозе 1.1 кГр обнаружено увеличение оптической плотности (возможно за счет более высокого коэффициента экстинкции образующихся продуктов радиационного восстановления, что требует дальнейших исследований).

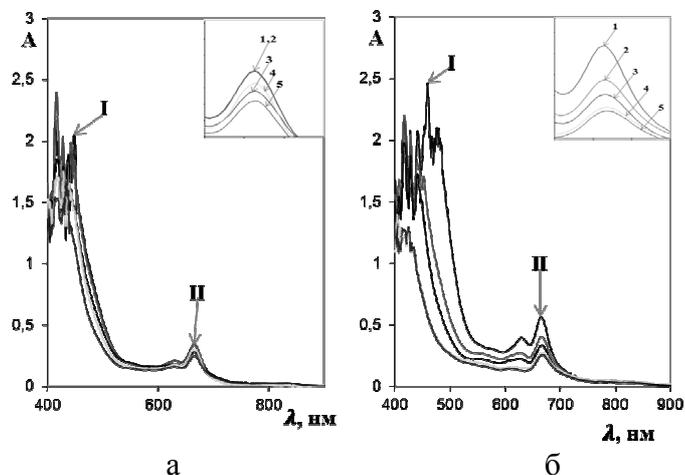


Рис. 4. Спектры оптического поглощения спиртовых (а) и ацетоновых (б) экстрактов *Cylandrotheca closterium* (ПРЭ 5 дней): 1 - исходного образца, 2 - после облучения D= 0.28 кГр, 3- ПРЭ, 4 - после облучения D =1.1 кГр, 5- ПРЭ.

Таблица 3. Спектральные характеристики оптического поглощения экстрактов *Cylandrotheca closterium* (насыщение Ar) при разных дозах

$\lambda_{\text{нм/ОП}}$	I	II	$\lambda_{\text{нм/ОП}}$	I	II
Исходный водно-спиртовой экстракт	440/ 1.8	665/ 0.4	Исходный водно-ацетоновый экстракт	440/ 2.4	660/ 0.6
0.28 кГр	440/ 1.3	665/ 0.3	0.28 кГр	440/ 1.8	665/ 0.5
0.56 кГр	440/ 0.8	665/ 0.3	0.56 кГр	440/ 1.3	667/ 0.4
1.1 кГр	440/ 0.2	663/ 0.05	1.1 кГр	440/ 1.8	668/ 0.6

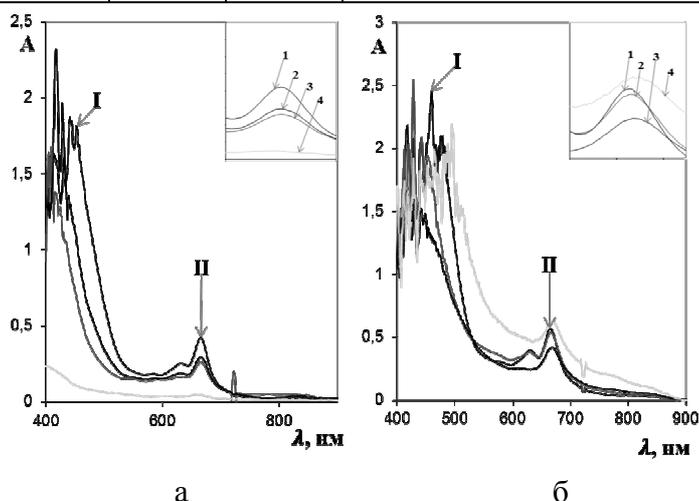


Рис. 5. Спектры оптического поглощения спиртовых (а) и ацетоновых (б) экстрактов *Cylandrotheca closterium* (насыщение Ar): 1 - исходного образца, 2 - 4 - после облучения D, кГр: 2 - 0.28, 3- 0.56, 4 - 1.1 кГр.

В радиационной химии часто используют реакцию между e_{aq}^- (восстановитель) и N_2O , реакцию, приводящую к образованию радикала OH^\cdot и созданию окислительных условий при радиолизе. С целью изменения условий облучения, увеличения концентрации окислительных частиц радиолиза, в основном радикалов OH^\cdot , растворы экстрактов перед облучением насыщали N_2O в течение 40 мин.

Спектральные характеристики оптического поглощения экстрактов микроводорослей, насыщенных N_2O , исходных концентратов и после гамма-облучения представлены на рис. 6 и в таблице 4.

Таблица 4. Спектральные характеристики оптического поглощения экстрактов *Cylindrotheca closterium* (насыщение N_2O) при разных дозах.

λ , нм/ОП	I	II	λ , нм/ОП	I	II
Исходный водно-спиртовой экстракт	440/ 2.1	665/ 0.3	Исходный водно-ацетоновый экстракт	440/ 2.4	663/ 0.6
0.28 кГр	440/ 1.6	666/ 0.2	0.28 кГр	440/ 1.6	665/ 0.4
0.56 кГр	440/ 0.7	665/ 0.3	0.56 кГр	440/ 1.5	668/ 0.7
1.1 кГр	440/ 0.2	658/ 0.03	1.1 кГр	440/ 0.5	665/ 0.2

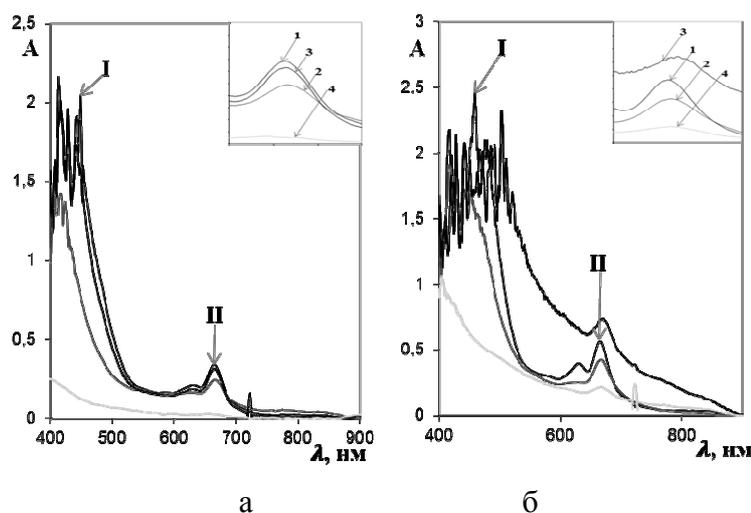


Рис. 6. Спектры оптического поглощения спиртовых (а) и ацетоновых (б) экстрактов *Cylindrotheca closterium* (насыщение N_2O): 1 - исходного образца, 2 - 4 - после облучения D, кГр: 2 - 0.28, 3 - 0.56, 4 - 1.1 кГр.

При анализе спектров видно, что в спиртовых экстрактах, в присутствии N_2O наблюдается полное разрушение хлорофиллов, а в ацетоновых экстрактах при малой дозе облучения регистрируется увеличение оптической плотности при длине волны $\lambda=663$ нм, а потом наблюдается полная деструкция.

Спектральные характеристики оптического поглощения облученных экстрактов микроводорослей, насыщенных N_2O , через 5 дней хранения, пострadiационный эффект (ПРЭ) представлены на рис. 7.

При измерении спектров ОП в присутствии воздуха возможно протекание реакций, приводящих к регенерации исходных молекул. В спиртовых экстрактах микроводорослей наблюдается регенерация фукоксантина после облучения при дозе

1.1 кГр. А при меньших дозах облучения происходило только его разрушение. В ацетоновых экстрактах – в пострadiационный период происходят более сложные превращения продуктов радиолита.

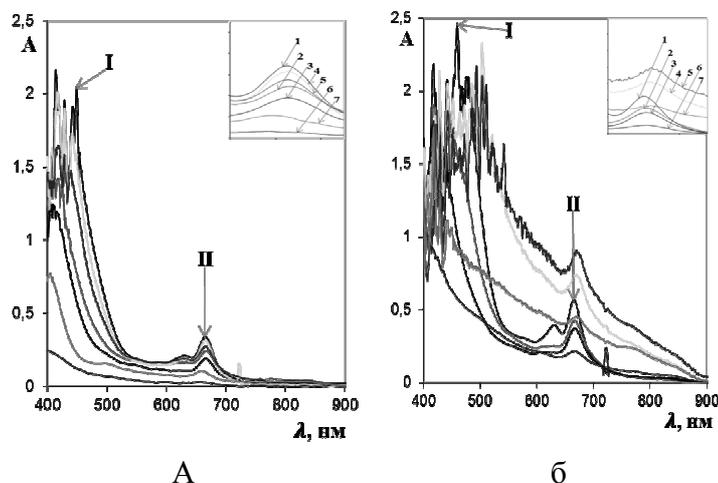


Рис. 7. Спектры оптического поглощения спиртовых (а) и ацетоновых (б) экстрактов *Cylandrotheca closterium* (насыщение N₂O, ПРЭ 5 дней): 1 - исходного образца, 2 - после облучения D=0.28 кГр, 3- ПРЭ, 4 - после облучения D=0.56 кГр, 5 - ПРЭ, 6- после облучения D =1.1 кГр, 7 - ПРЭ.

Спектры оптического поглощения водно-спиртовых растворов (50% фукоксантина) и разбавленных (1:3 и 1:6) представлены на рис. 8; спектры соответствующих растворов после облучения при дозах 0.28 кГр и 0.56 кГр (облучение в присутствии кислорода воздуха) на рис. 9.

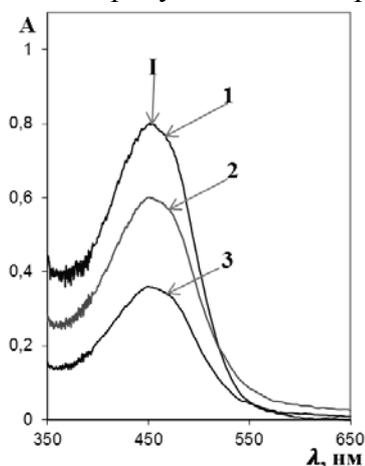


Рис. 8. Спектры оптического поглощения спиртового экстракта Фк-50%: 1 - исходный образец, 2 - при разбавлении 1:3, 3 - при разбавлении 1:6.

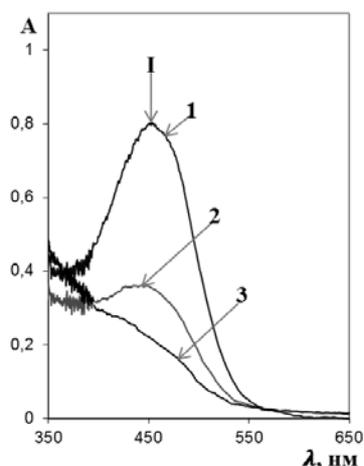


Рис. 9. Спектры оптического поглощения спиртового экстракта Фк-50%: 1 - исходный образец, 2 - после облучения D=0.28 кГр, 3 - после облучения D=0.56 кГр

Влияние насыщения водно-спиртовых экстрактов Ag или N₂O на радиационно-химические превращения фукоксантина представлены на рис. 10 и 11. Насыщение растворов газами проводилось в течение ~ 40 минут при комнатной температуре.

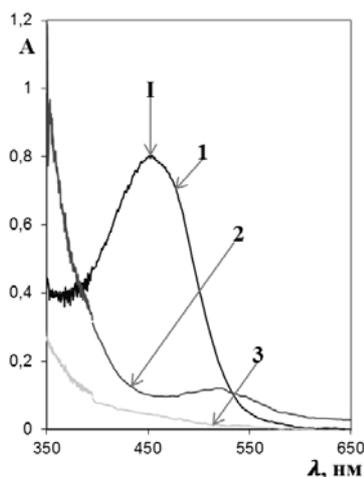


Рис. 10. Спектры оптического поглощения спиртового экстракта Фк-50% (насыщение Ar): 1 - исходный образец, 2 - после облучения $D=0.28$ кГр, 3 - после облучения $D=1.1$ кГр

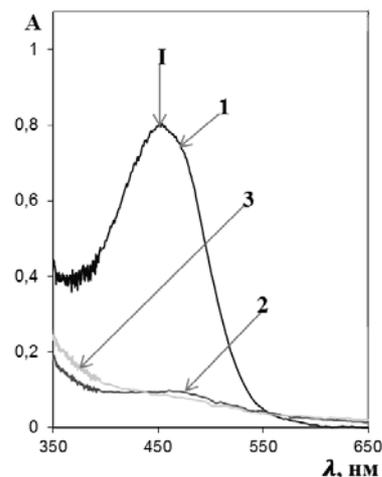


Рис. 11. Спектры оптического поглощения спиртового экстракта Фк-50% (насыщение N_2O): 1-исходный образец, 2 - после облучения $D=0.28$ кГр, 3 - после облучения $D=1.1$ кГр

Заключение

Зависимость радиационной стабильности водно-спиртовых растворов фукоксантина (*Cylindrotheca closterium*) от дозы облучения имеет сложный характер, особенно при малых дозах радиации.

Радиационная стабильность фукоксантина (*Cylindrotheca closterium* в водно-спиртовых растворах) в *аэробных условиях выше, чем анаэробных* за счет регенерации пигмента в пострadiационный период. Этот же эффект ранее наблюдался для макрофита цистазеры [4,5]

Полученные результаты подтверждают перспективность использования биологически активных и светочувствительных компонентов из микроводорослей *Cylindrotheca closterium* для создания нетоксичных терапевтических и диагностических препаратов.

Список литературы

1. Takaichi S. // *Mar. Drugs*. 2011. No 9, pp. 1101-1108.
2. Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H. et al. // *J. Nutr.* 2001. No 131. pp. 3303-3306.
3. Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H. // *Mar. Drugs*. 2011. No 9. pp. 1806-1828.
4. Парамонова Л.И., Лизунков А.Ф., Милованов В.К. // *Доклады ВАСХНИЛ*. 1989. Т. 11. С. 30
5. Прохорова Л.И., Ревина А.А. // *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2000. Т. 40. № 2. С. 156.

References

1. Takaichi S., *Mar. Drugs*, 2011, No 9, pp. 1101-1108.
2. Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H. et al., *J. Nutr.*, 2001, No 131, pp. 3303-3306.
3. Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H., *Mar. Drugs*, 2011, No 9, pp. 1806-1828.

4. Paramonova L.I., Lizunkov A.F., Milovanov V.K., *Doklady VASHNIL*, 1989, Vol. 11, pp. 30.

Ревина Александра Анатольевна – профессор, д.х.н., в.н.с. института физической химии и электрохимии РАН, Москва

Геворгиз Руслан Георгиевич – к.б.н., с.н.с. кафедры аквакультуры и морской фармакологии, Севастополь

Лозинина Светлана Сергеевна – студентка РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва

Железнова Светлана Николаевна – аспирантка кафедры аквакультуры и морской фармакологии, Севастополь

Тхан Тайк – аспирант РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва

Павлов Юрий Сергеевич – д.т.н., заведующий лаборатории радиационных исследований, Москва

Нехорошев Михаил Валентинович – к.х.н., с.н.с. кафедры аквакультуры и морской фармакологии, Севастополь

Рябушко Виталий Иванович – д.б.н., заведующий кафедры аквакультуры и морской фармакологии, Севастополь

5. Prohorova L.I., Revina A.A., *Radiacionnaja biologija. Radiojekonomika*, 2000, Vol. 40, No 2, pp. 156.

Revina Alexander A. – prof., D. Sc., leading researcher Institute of physical chemistry and electrochemistry RAS, Moscow. E-mail: alex_revina@mail.ru

Gevorgiz Ruslan G. – candidate of biological sciences, researcher at the Department of aquaculture and marine pharmacology, Sevastopol

Lozinina Svetlana S. – the student, D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow. E-mail: Lozinina-Svetlanka@yandex.ru

Zheleznova Svetlana. N. – the postgraduate student of the Department of aquaculture and marine pharmacology, Sevastopol. E-mail: zheleznovasveta@yandex.ru

Than Htaik – the postgraduate student, D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow. E-mail: thanhtaik.iron@gmail.com

Pavlov Yury S. – doctor of technical sciences, head of the laboratory of radiation research, Moscow.

Nekhoroshev Mikhail V. – Ph. D., researcher at the Department of aquaculture and marine pharmacology, Sevastopol

Ryabushko Vitaly I. – D. Sc., head of the Department of aquaculture and marine pharmacology, Sevastopol