

УДК 557,1; 581,19; 582,26

Е.Г.СУДЬИНА¹, А.А.КАЛУГИНА-ГУТНИК², Е.И.ШНЮКОВА¹,
Г.И.ЛОЗОВАЯ¹, П.А.МУШАК¹, С.И.ЛОСЬ¹, Н.Д.ТУПИК¹,
Р.Н.ФОМИШИНА¹, Н.В.МИРОНОВА²

¹Ин-т ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины,
252004 Киев 4, Терещенковская, 2, Украина

²Ин-т биологии южных морей им. А.О.Ковалевского НАН Украины,
335000 Севастополь, просп. Нахимова, 2, Украина

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАРИКУЛЬТУРЫ *GRACILARIA VERRUCOSA* (HUDS.) PAPENF. И ПЕРСПЕКТИ- ВЫ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Дана общая характеристика литературных данных о биохимическом составе, его значении при использовании в народном хозяйстве различных видов красных водорослей, преимущественно рода *Gracilaria*. Представлены результаты исследований Черноморской марикультуры двух форм *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. Изучена динамика прироста биомассы, динамика содержания моно- и дисахаридов, коллоидальных низкомолекулярных полисахаридов, запасных полиглюканов, структурных легко гидролизующихся полисахаридов и целлюлозы. Показано содержание и аминокислотный состав белка. Описана динамика содержания суммы липидов, галактозилдиацилглицеридов, моногалактозилдиглицеридов и дигалактозилдиглицеридов, фосфолипидов и жирнокислотного состава липидов, а также динамика содержания хлорофилла, фикобилипротеинов, активности хлорофиллазы и ряда водорастворимых витаминов группы В и аскорбиновой кислоты. Разработана схема последовательной безотходной переработки двух форм *G. verrucosa* и указаны сроки их сбора.

Ключевые слова: марикультура, красные водоросли, грацилария, биохимия, белки, углеводы, липиды, пигменты, витамины, технология.

Введение

В последнее время возрос интерес к нетрадиционным источникам веществ, ценных для народного хозяйства. Среди фотосинтезирующих организмов, которые могут с успехом служить продуцентами таких веществ, как белки, жиры, углеводы, пигменты, витамины и др., особое место занимают водоросли. Большое число видов и очень своеобразный биохимический состав свойственен красным водорослям, среди которых насчитывается более чем 600 родов и 4000 видов (Федоров и др., 1977). Специфика их состоит в уникальном наборе пигментов, в способности синтезировать желеобразующие полисахариды, специфичные резервные полиглюканы, в своеобразном богатом наборе жирных кислот, аминокислот, витаминов. Они содержат красный пигмент - фикоэритрин R-типа, синий пигмент - фикоцианин, голубой - аллофикоцианин, зеленый - хлорофилл и желтые пигменты - каротиноиды. Соотношение между ними и наличие каждого из них определяют окраску таллома (Goodwin, 1974; Rüdiger, 1975).

Красные водоросли широко используются в народном хозяйстве и в быту. Многие из них съедобны (Hashimoto, Murakami, 1975). Водорослевая мука, например, используется на корм скоту и как удобрение (Барашков, 1963). Из них получают специфические вещества высокой ценности. В последнее время эти организмы интересуют исследователей как продуценты липидных веществ, составляющие которых являются предшественниками простагландинов (Ahern et al., 1983), терапевтический потенциал их интенсивно изучается (Jorgensen, Dyerberg, 1983). Красные водоросли синтезируют уникальные сульфатированные галактаны (агар и агароиды), свойственные только этой группе водорослей. Агар широко используется в пищевой промышленности, медицине, микробиологии. Из него получают носители для гелевой и ионообменной хроматографии, а также высокосульфатированный полисахарид, обладающий антиопухолевой активностью (Fernandez et al., 1989).

В качестве источников агара используется около 30 видов красных водорослей, среди них представители рода *Gracilaria* Grévy., которые в мировом

производстве агара занимают второе место (Lewis, 1974). Однако природных запасов этих водорослей в Черном море мало, в связи с чем возникает вопрос о развитии марикультуры *Gracilaria*. Известно, что *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. имеет ряд положительных свойств, очень важных для культивирования в условиях Черного моря: может расти вдоль всего побережья, имеет короткий цикл развития (2,5-3 мес.), способна к вегетативному размножению и быстрой регенерации побегов, имеет высокий продукционный потенциал, легко адаптируется к условиям выращивания, дает довольно высокий выход агара (Калугина-Гутник, 1988). Эти свойства характерны и для некоторых других видов этого рода. В США в основном выращивают *Gracilaria tikvahiae* и *Gracilaria sjostedtii* (Hansen, 1984), на островах южной части Атлантического океана — *Gracilaria domigensis* и в меньших количествах — *Gracilaria debilis*. Для культивирования этих водорослей разрабатываются специальные способы. В России в Тихоокеанском Институте рыбного хозяйства и океанографии (Владивосток) используют специальные бассейны для культивирования *Gracilaria verrucosa*.

В Украине вопросами марикультуры *G. verrucosa* занимаются в Институте биологии южных морей им. А.А.Ковалевского АН Украины (Севастополь). Учеными Института показана возможность культивирования в Черном море двух форм *Gracilaria verrucosa* — *f. dura* (Ag.) Kalug. et Miron и *f. procerima* (Esk.) Ag. с целью получения агара.

Для создания безотходных технологий переработки биомассы водорослей необходимы сведения о составе (кроме агара) остальных биохимических компонентов двух форм *Gracilaria*. Поэтому нами была исследована динамика содержания белков, углеводов, липидов, пигментов и витаминов.

Водоросли выращивали в Черном море в сетке на глубине 4 м с сентября по декабрь и брали для анализов через 15, 44, 79 и 93 сут.

Биомасса. Проведенные исследования показали, что обе формы *G. verrucosa* значительно отличаются по приросту биомассы, рассчитанной по формуле

$$P = \frac{W_t - W_0}{W_0 \cdot t} \cdot 100,$$

где P — прирост биомассы, %; W_0 — биомасса исходная; W_t — биомасса через t суток. У *G. verrucosa f. dura* суточный прирост был значительно ниже, чем у *G. verrucosa f. procerima* и колебался между 0,15 и 0,40 % без выраженного максимума. У *f. procerima* он резко возрастал в период первых 15 сут до 1,75 %, затем постепенно снижался к 45 сут до 0,70 %, после чего оставался примерно на одном уровне (рис. 1).

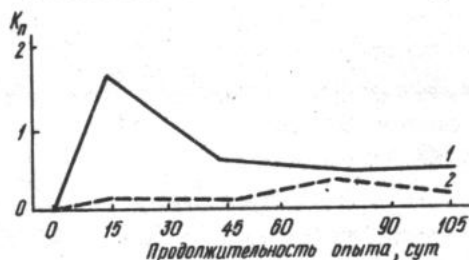


Рис. 1. Динамика коэффициента прироста биомассы (K_n) *Gracilaria verrucosa f. procerima* (Esk.) Ag. (1) и *f. dura* (Ag.) Kalug. et Minor. (2).

Fig. 1. Dynamics of biomass increasing coefficient (K_n) of *Gracilaria verrucosa f. procerima* (Esk.) Ag. (1) and *f. dura* (Ag.) Kalug. et Minor. (2).

Углеводы. Установлено, что обе формы *G. verrucosa*, которые выращивались в Институте биологии южных морей АН Украины, являются источником качественного агара, выход которого после предварительной щелочной обработки достигает 40 % обезжиренной биомассы. С химической точки зрения полисахариды обеих форм *G. verrucosa* подобны, однако агар *f. dura* отличается повышенным содержанием остатков 6-О-метил-D-галактозы и дает более крепкий гель. Его способность к образованию гелей очень высока (Усов, Иванова, 1990). Для поисков путей безотходного производства различных компонентов, в

том числе углеводной природы, кроме агара мы исследовали фракционный состав углеводов двух форм *G. verrucosa* в процессе роста марикультуры. Общее количество углеводов у *G. verrucosa* f. *dura* в течение трех месяцев культивирования составляло 13,7 – 19,6 % и 16,6 – 26,9 % у f. *procerima*, что соответствует нашим данным относительно уровня накопления углеводных компонентов в естественных популяциях этого вида, особенно у f. *dura*. У обеих форм в процессе культивирования водорослей относительное содержание углеводов постепенно возрастало (табл. 1).

Таблица 1. Содержание углеводных компонентов у двух форм *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. в процессе роста в условиях марикультуры (% сухой массы)

Углеводы	Возраст марикультуры, сут							
	15	44	79	93	15	44	79	93
	<i>G. verrucosa</i> f. <i>dura</i>				<i>G. verrucosa</i> f. <i>procerima</i>			
Моно-, дисахариды	0,76	1,72	2,34	3,71	1,13	3,40	2,18	4,14
Коллоидальные низкомолекулярные полисахариды	0,79	1,46	4,74	4,63	0,98	1,33	1,76	4,52
Запасные полисахариды	1,97	2,50	3,70	2,87	2,82	3,55	4,47	6,60
Структурные легко гидролизующие полисахариды	6,50	5,16	1,28	3,44	8,37	6,76	5,33	4,85
Целлюлоза	3,72	4,61	7,51	4,51	3,28	3,77	3,79	6,76
Сумма углеводов	13,74	15,45	19,57	19,16	16,58	18,81	17,53	26,87

Но поскольку в течение первых этапов выращивания у *G. verrucosa* f. *procerima* наблюдался высокий прирост биомассы (рис. 2), то можно считать, что в течение первых полутора месяцев роста марикультуры у водорослей накапливается значительное абсолютное содержание углеводов. Это соответствует характеристике f. *procerima*, как более легко приспосабливаемой к условиям произрастания. В первые полтора месяца выращивания у водорослей среди углеводов преобладали структурные легко гидролизующие полисахариды, содержание которых затем постепенно уменьшалось, а у f. *dura* в конце опыта несколько возрастало (см. рис. 2).

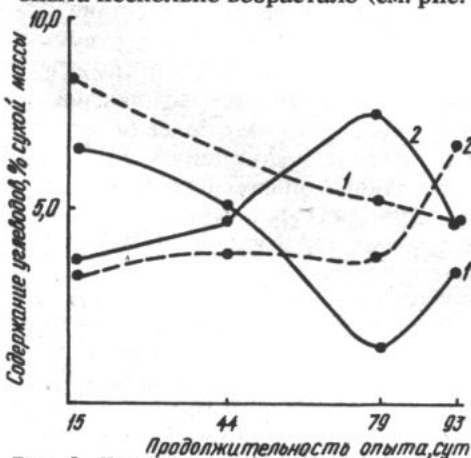


Рис. 2. Динамика накопления структурных легко гидролизующих полисахаридов (1) и целлюлозы (2) у *Gracilaria verrucosa* f. *dura* (Ag.) Kalug. et Minor. (—) и f. *procerima* (Esk.) Ag. (---) в условиях марикультуры.

Fig. 2. Dynamics of accumulation of structural easily hydrolyzing polysaccharides (1) and cellulose (2) by *Gracilaria verrucosa* f. *dura* (Ag.) Kalug. et Miron. (—) and f. *procerima* (Esk.) Ag. (---) in conditions of mariculture.

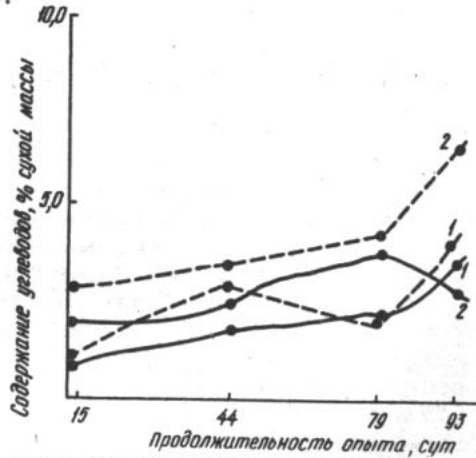


Рис. 3. Динамика накопления моносахаридов (1), запасных полигликанов (2) у *Gracilaria verrucosa* f. *dura* (Ag.) Kalug. et Minor. (—) и f. *procerima* (Esk.) Ag. (---) в условиях марикультуры.

Fig. 3. Dynamics of accumulation of polysaccharides (1), reserve polyglucans (2) by *Gracilaria verrucosa* f. *dura* (Ag.) Kalug. et Miron. (—) and f. *procerima* (Esk.) Ag. (---) in conditions of mariculture.

Динамика накопления целлюлозы при графическом выражении имеет противоположную направленность. Особенно четко это прослеживается у *G. verrucosa* f. *dura*.

Несвязанные в полисахаридах моно- и дисахариды, как правило, в большей мере накапливались у водорослей в поздние сроки выращивания (рис. 3). При этом у *G. verrucosa* f. *procerima* пул этих компонентов, служащих субстратом ряда биохимических реакций, несколько превышал аналогичные характеристики f. *dura*. Накопление запасных полисахаридов более интенсивным было также у f. *procerima*. Сначала их количество у обеих форм было невысоким (до 30 % сухой массы) и постепенно возрастало у f. *dura* до 3,7 % (79 сут), а у f. *procerima* до 6,6 % (93 сут).

Химическая природа запасных полисахаридов красных водорослей своеобразна и изучалась на примере отдельных видов. Это α -глюканы, степень ветвления которых исследована недостаточно, и поэтому нерешенными остаются вопросы их структурной организации. Предпринимались попытки выделения этих полисахаридов для химического анализа. Было выдвинуто предположение, что запасные полисахариды красных водорослей близки к амилопектину высших растений (Graigie, 1974). С другой стороны, данные относительно степени гидролиза резервных полиглюканов красных водорослей β -амилазой, максимумов поглощения их иодных комплексов не позволяют отнести эти полимеры к амилопектину, а приближают их к более разветвленным биополимерам типа гликогена. По мнению большинства исследователей, запасные полиглюканы красных водорослей не имеют амилозы (Percival, 1979). Однако у некоторых представителей порядка *Porphyridiales* (Kylik) и *Bangiales* (Schmitz) она была выявлена. Будучи выделенной, амилоза окрашивалась иодом в синий цвет с максимумом в области 610 нм и полностью гидролизовалась β -амилазой.

Полученные нами абсорбционные спектры и спектры кругового дихроизма иод-полисахаридных комплексов *G. verrucosa*, выращенной в условиях ма-рикультуры в течение 93 дней, свидетельствуют о том, что максимум их поглощения находится в области 550 нм, т.е. степень разветвления данных глюканов ниже, чем у гликогена и более сходна с амилопектином. Амилоза у этих водорослей не была выявлена.

Наши данные относительно амилолизного предела, т.е. процента превращения запасных α -глюканов *G. verrucosa* в мальтозу вследствие действия β -амилазы (21,4 % у f. *dura* и 28,0 % у f. *procerima*), также свидетельствуют о высокоразветвленных резервных полисахаридах *G. verrucosa*, у которых α -1,6-связи встречаются чаще, чем в α -глюканах зеленых микроводорослей.

Следует отметить, что биомасса *G. verrucosa* f. *procerima* более богата углеводными компонентами, нежели биомасса f. *dura*. Если принять во внимание, что у f. *procerima* суточный ее прирост в данных опытах (особенно на начальных этапах культивирования) был существенно выше, чем у *G. verrucosa* f. *dura*, то становится очевидным, что абсолютное содержание углеводов у f. *procerima* намного превышает этот показатель у f. *dura*.

Гидролизат полисахаридов более продуктивной f. *procerima* содержит большее количество миносахаридов, которые могут служить предметом биотехнологических исследований. Однако гель у f. *dura* характеризуется большей прочностью (Усов, Иванова, 1990). Поэтому эти и полученные нами данные можно использовать при создании наиболее рациональных технологий применения обеих форм *Gracilaria* для получения тех или иных углеводных соединений.

Белки. Наибольшее значение с точки зрения содержания белковых веществ имеют зеленые и красные водоросли. При определении качества белковых веществ существенную роль играет не только уровень их накопления, но и фракционный состав (по растворимости). У красных водорослей *Phyllophora nervosa* (DC.), *Ph. brodiaei* (Turn.) J. Ag. и *Furcellaria fastigiata* (Huds.) Lamour наибольшую часть составляют щелочерастворимые белковые вещества (Медведева и др., 1975; Каганович, Каминер, 1978). Так, у *Ph. nervosa* они составляют 42 % общего количества растворимых белков, в то время как альбуми-

ны – 34 %, глобулины – 24 % (Медведева, Семич, 1968); у *F.fastigiata* они составляют 54,8; 20,5 и 20,5 % соответственно (Красильникова, Медведева, 1975). Согласно нашим данным, у *Gracilaria verrucosa* щелочерастворимые белки составляют около 35 % общего содержания белка. Эти данные свидетельствуют о том, что фракционный состав белков колеблется в зависимости от видовой принадлежности водорослей. Общее количество белка зависит также от сезона и места произрастания водорослей (Lewis, 1974). Достаточно высокое содержание белковых веществ и их полноценный аминокислотный состав у красных водорослей позволяют использовать их в качестве дополнительного источника пищевого и кормового белка, что требует определения коэффициента усвоения белков. При 24-часовой инкубации перевариваемость щелочерастворимых белков составляла 42,4–90,9 % с пепсином, 60,2–100 % с панкреатином и 81,0–100 % с проназой. Перевариваемость щелочерастворимых белков была лучшей, чем высушенных измельченных водорослей (Fujiwara-Arasari Tegusa, 1984). В результате определения потенциальной и фактической ценности белковых веществ *F.fastigiata* и *Ph.nervosa* установлено, что технологическая обработка отходов, лишенных агара, с получением аминокислотных препаратов позволяет увеличить усвояемость белков красных водорослей и довести замену казеина белком исследуемых объектов до 20–30 % (Бойко О.В., Кремер Ю.Н., 1979).

Изучение динамики общего содержания белка в процессе роста марикультуры *Gracilaria verrucosa* f. *dura* и f. *procerima* показало, что его количество на протяжении трех месяцев культивирования составляет 12,1–16,3 % сухой массы.

В состав белка обеих форм грацилярии входит 18 аминокислот, в т.ч. все незаменимые, составляющие 40,3–33,9 % общего содержания аминокислот. В наибольших количествах содержатся аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аланин, глицин, лейцин, фенилаланин. Упомянутые аминокислоты подвергаются наибольшему количественным изменениям в процессе культивирования *G.verrucosa* (табл. 2).

Таблица 2. Аминокислотный состав белка разных форм марикультуры *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (% сухой массы)

Аминокислота	Возраст марикультуры, сут					
	15	44	79	15	44	79
	<i>G.verrucosa</i> f. <i>procerima</i>			<i>G.verrucosa</i> f. <i>dura</i>		
Аспарагиновая кислота	1,76	1,43	1,33	1,41	1,22	1,86
Треонин	0,85	0,67	0,59	0,65	0,60	0,84
Серин	0,86	0,70	0,61	0,66	0,59	0,85
Глутаминовая кислота	1,72	1,36	1,32	1,33	1,13	1,84
Пролин	0,82	0,69	0,59	0,59	0,53	0,85
Цистин	1,12	0,08	0,15	0,08	0,07	0,21
Глицин	0,93	0,78	0,71	0,75	0,69	0,95
Аланин	1,02	0,77	0,72	0,77	0,72	1,02
Валин	0,71	0,56	0,59	0,57	0,49	0,71
Метисонин	0,27	0,13	0,19	0,12	0,18	0,20
Изолейцин	0,43	0,39	0,35	0,39	0,34	0,61
Лейцин	1,32	1,00	0,89	0,99	0,85	1,14
Тирозин	0,89	0,55	0,28	0,32	0,48	0,88
Фенилаланин	0,95	1,01	0,67	0,81	0,76	1,13
Гистидин	0,37	0,26	0,26	0,25	0,23	0,35
Лизин	0,87	0,56	0,52	0,53	0,51	0,73
Аргинин	0,76	0,53	0,57	0,57	0,43	1,10

Таким образом, марикультура *G.verrucosa* содержит полноценный белок, который может быть использован на корм или для получения незаме-

мых аминокислот. По нашим расчетам, с одной тонны марикультуры грацилярии можно получить: 160 кг белка, 17,6 кг треонина, 8,6 кг серина, 7,1 кг валина, 2,7 кг метионина, 4,3 кг изолейцина, 13,2 кг лейцина, 9,5 кг фенилаланина, 8,7 кг лизина.

Липиды. Качественный состав липидов обеих форм *G. verrucosa* (f. *dura* и f. *procerima*) одинаков и не изменяется в процессе роста культуры. Использование соответствующих окрашивающих веществ (проявителей) и сравнение с известными из литературы величинами подвижности отдельных липидных веществ на ТСХ (тонкослойной хроматографии) позволило установить, что у *G. verrucosa* содержатся следующие полярные липиды: фосфатидилинозит, фосфатидилхолин, сульфолпиды, фосфатидилглицерин, дигалактозилдиглицерид (ДГДГ), фосфатидиловая кислота, гликозиды стерола, моногалактозалдиглицерид (МГДГ), дифосфатидилглицерин, пигменты и нейтральные липиды.

Общее содержание липидов в клетках двух форм *G. verrucosa*, выращенной в марикультуре, невысокое. Максимальное количество липидов отмечено для f. *procerima* на 44-е, а для f. *dura* – на 15-е сутки выращивания (табл. 3). В первые и последние дни роста больше липидов содержится в клетках f. *dura*, в середине цикла – в клетках f. *procerima*.

Таблица 3. Содержание липидов и их жирнокислотный состав в марикультуре *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (мг/г сухого вещества)

Показатель	Возраст культуры, сут					
	15	44	93	15	44	93
	<i>G. verrucosa</i> f. <i>procerima</i>			<i>G. verrucosa</i> f. <i>dura</i>		
Сумма липидов	32,41	74,85	15,03	49,23	26,51	23,22
Галактозилдиглицериды	1,362	1,366	1,602	2,630	2,276	1,667
МГДГ	0,635	0,925	0,698	1,464	1,280	0,446
ДГДГ	0,510	0,355	0,259	1,153	0,871	0,520
Сумма фосфолипидов	0,268	0,107	0,163	0,252	0,168	0,112
Жирные кислоты:						
C8:0-C10:0	-	0,07	-	0,49	0,28	0,02
C11:0	-	-	-	0,35	0,14	0,12
C12:0	-	-	0,17	1,96	0,87	0,75
C13:0	0,65	1,30	0,04	-	2,03	2,75
C14:0	0,59	0,24	1,12	2,15	1,65	1,52
C15:0	0,31	0,36	0,24	0,09	0,03	0,04
C16:0	35,97	34,93	32,26	39,53	34,72	31,72
C16:1	0,51	0,85	0,12	0,06	0,02	2,55
C17:0	0,43	0,46	0,40	0,15	0,15	0,16
C17:1	-	0,08	-	0,38	0,24	0,20
C18:0	0,62	0,26	1,70	3,12	3,97	4,08
C18:1	5,31	2,37	10,04	14,84	11,58	10,74
C18:2	8,22	14,12	1,31	1,62	1,03	0,95
C18:3	0,74	1,49	0,36	0,48	1,85	1,91
C19:0	-	0,18	0,91	1,20	0,76	0,62
C20:0	0,92	1,12	0,85	-	-	-
C20:1	0,56	0,48	0,30	0,48	0,15	0,13
C20:2	0,07	0,33	-	1,20	0,09	0,07
C20:3	2,03	2,72	1,50	1,07	0,66	0,58
C20:4	43,07	38,76	48,66	31,85	39,78	41,11
C18:2 + C18:3 + C20:4 (витаминF)	52,03	54,37	50,33	33,96	42,66	43,97

Максимальное количество галактозилдиацилглицеридов (ГЛ) отмечено у *G. verrucosa* f. *procerima* в 93-суточной культуре, а у f. *dura* в 15-суточной, МГДГ - соответственно на 44-е и 15-е сутки, а ДГДГ - на 15-е сутки у обеих форм. Только по количеству ДГДГ обе формы грацилярии сходны в одинаковые сроки выращивания. Общее содержание ГЛ у f. *procerima* постепенно возрастает от первых до последних суток выращивания, а у f. *dura* - уменьшается; количество МГДГ у первой формы минимально в начале роста (на 15-е сутки), затем возрастает (на 44-е сутки) и в дальнейшем снижается (93-е сутки). У второй формы содержание МГДГ уменьшается постоянно (см. табл. 3).

Однако сравнимая одинаковые по возрасту формы *G. verrucosa*, можно заключить, что общее содержание ГЛ, ДГДГ и МГДГ (кроме 93-х суточной культуры) больше у f. *dura*.

Таким образом, для получения МГДГ возможно использование *G. verrucosa* f. *procerima* в более поздние сроки выращивания марикультуры. У свободно растущей *G. verrucosa* содержание МГДГ в тилакоидах ее пластид в среднем в 3,2 раза больше соответствующих значений для форм, выращенных в марикультуре, ДГДГ - в три раза больше. Максимальное содержание фосфолипидов (ФЛ) у f. *procerima* приходится на начальные этапы роста (15-суточная культура), потом резко уменьшается (44-е сутки - минимум ФЛ) и снова возрастает. Для *G. verrucosa* f. *dura* характерно постепенное уменьшение относительного количества ФЛ в процессе роста марикультуры. Следует отметить, что f. *procerima* содержит больше ФЛ на начальных и завершающих этапах роста (15- и 93-суточные культуры), и потому может быть использована в эти сроки для получения ФЛ.

У *G. verrucosa*, росшей в марикультуре, на протяжении осенне-зимнего периода в клетках присутствует большее количество ФЛ, чем у свободно живущих форм летом. Поскольку со снижением температуры содержание фосфолипидов у *G. verrucosa* повышается, то, возможно, выращивание этого вида в зимних условиях марикультуры более благоприятно для накопления фосфолипидов. Этот факт очень интересен из-за возможности использования фосфолипидных веществ в промышленности и медицине.

Анализ качественного и количественного состава жирных кислот, а также их динамики в процессе выращивания марикультуры двух форм *G. verrucosa* показал, что главными жирными кислотами, входящими в состав липидов обеих ее форм, являются пальмитиновая (C_{16:0}), олеиновая (C_{18:1}), линолевая (C_{18:2}) и арахидоновая (C_{20:4}) кислоты. В небольшом количестве обнаружены также C_{13:0}, C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:1}, C_{17:0}, C_{18:0}, C_{18:3}, C_{20:1}, C_{20:2} и C_{20:3} жирные кислоты. Содержание C₁₃-C₁₅ жирных кислот в процессе выращивания почти не изменяется у f. *procerima*, а у f. *dura* возрастает к концу периода выращивания (см. табл. 3).

Сравнение двух форм *G. verrucosa* в одинаковые сроки выращивания позволяет заключить, что f. *dura* во все сроки роста содержит больше C₈-C₁₅ жирных кислот, а также стерина и олеиновой кислоты. В начале выращивания у этой формы больше пальмитиновой кислоты, а у 44-суточной культуры это содержание почти одинаково у обеих форм, в конце периода выращивания оно выше у f. *procerima*. Суммарное содержание линолевой, линоленовой и арахидоновой кислот, которые составляют комплекс витамина F, во все сроки выращивания выше у f. *procerima*. Поэтому f. *procerima* можно рассматривать как потенциальное сырье для получения витамина F (см. табл. 3), который необходим для нормализации обмена веществ в организме человека.

Хлорофилл и хлорофиллаза *G. verrucosa*, как каждая красная водоросль, содержит хлорофилл *a*, о наличии хлорофилла *d* ведется дискуссия. Общее содержание хлорофиллов разных форм *G. verrucosa* несколько отличается (табл. 4).

Для установления особенностей пигментного аппарата водорослей большое значение имеют исследования фермента хлорофиллазы, которая является компонентом нативных хлорофиллсодержащих систем (Судына и др., 1973). От активности фермента зависит содержание хлорофилла, его накопление и разрушение. Хлорофиллаза красных водорослей изучена недостаточ-

но. Наши эксперименты показали, что у ряда морских водорослей фермент находится в состоянии прочной связи с компонентами мембран, что определяет его низкую гидролитическую активность (Фомішина та ін., 1987, Фомішина, Шевчук, 1990). Опыты показали, что активность хлорофиллазы у

Таблица 4. Содержание хлорофилла (мг/г сухой массы) и активность хлорофиллазы (мг разложенного хлорофилла на 1 г сухой массы) в процессе роста *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf.

Таксон	Показатель	Возраст культуры, сут						
		15	44	79	93	30	50	90
		зимой				летом		
<i>G. verrucosa</i> <i>f. procerima</i>	Хлорофилл	1,51	1,28	-	1,66	-	-	-
<i>G. verrucosa</i> <i>f. dura</i>	"-	2,54	1,35	-	1,98	-	-	-
<i>G. verrucosa</i> <i>f. procerima</i>	Хлорофиллаза	0,12	-	0,07	0,05	0,14	0,14	0,08
<i>G. verrucosa</i> <i>f. dura</i>	"-	0,45	-	0,44	0,45	0,47	0,54	0,51

f. dura в несколько раз выше, чем у *f. procerima* (см. табл. 4). При этом возрастное состояние *f. dura* не влияет на активность фермента. У *f. procerima* активность хлорофиллазы была выше в период ее активного роста. При исследовании активности хлорофиллазы у обеих форм *G. verrucosa* из естественных популяций установлена такая же закономерность (табл. 5).

Таблица 5. Активность хлорофиллазы (мг разложенного хлорофилла на 1 г сухой массы) в образцах разных сроков сбора *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. из природной популяции

Таксон	Июль	Сентябрь	Декабрь
<i>G. verrucosa f. procerima</i>	0,17	0,19	0,00
<i>G. verrucosa f. dura</i>	0,29	0,58	0,05

Большее количество хлорофилла у *G. verrucosa f. dura* соответствует большей активности у нее хлорофиллазы. Эти данные наряду с высоким содержанием ГЛ и соотношением МГДГ/ДГДГ свидетельствуют о значительном развитии мембранной системы хлоропластов (см. табл. 3). Большее количество МГДГ у *f. dura* соответствует стабилизации большей активности хлорофиллазы из-за наличия небислойных фрагментов мембран (Судьина и др., 1990).

Фикобилипротеины. Известно, что в зависимости от вида, стадии развития и условий выращивания содержание главного фикобилинового пигмента - фикоэритрина изменяется от 90 до 1620 мг% (Кизеветтер, 1980).

Количество пигментов у красных водорослей увеличивается с глубиной, что в наибольшей степени относится к фикоэритрину.

О значительной лабильности фикоэритрина красных водорослей свидетельствуют данные литературных источников (Калугина-Гутник, 1988; Калугина-Гутник и др., 1987).

Содержание фотосинтетических пигментов у *G. verrucosa* в большой степени зависит от интенсивности и качества света. Освещение водорослей светом высокой интенсивности приводит к потерям или уменьшению до 80 % фотосинтетических пигментов на протяжении 4-5 ч (Чернова, Звалинский, 1978). Сильное освещение грацилярии (30 Вт/м² и более) способствовало фотоокислению пигментов (Прозуменщикова А.А. и др., Осипова И.Д., 1990). При нехватке света водоросли способны запасать азот, чем, очевидно, и объясняется возросший уровень фикоэритрина (Lapointe, 1981).

В настоящее время актуальным остается детальное исследование свойств и накопления фикобилиновых пигментов в процессе роста *G. verrucosa* в условиях марикультуры. Нами отмечена тенденция увеличения содержания фи-

кобилиновых пигментов в процессе накопления биомассы с наибольшим количеством в возрасте 79 дней. Так, у *G. verrucosa* f. *procerima* в возрасте 44, 79 и 93 сут содержание фикоэритрина составляло 0,43, 0,46 и 0,36 мг/г сухой массы соответственно, а у *G. verrucosa* f. *dura* – 0,80, 0,88 и 0,64 мг/г, т.е. *G. verrucosa* f. *dura* содержит в два раза больше фикоэритрина, чем *G. verrucosa* f. *procerima*.

Для свободно растущих двух форм *G. verrucosa* характерно более высокое содержание фикоэритрина по сравнению с этими же формами в условиях марикультуры: у *G. verrucosa* f. *procerima* – 0,64, а у f. *dura* – 1,05 мг/г сухой массы. Во все сроки фикоэритрина было на порядок больше, чем аллофицианина.

Фикоэритрин *G. verrucosa*, который относится к R-типу, имеет максимумы поглощения в области 498–501, 539–545 и 564–569 нм. Максимум поглощения при 539–545 нм специфичен лишь для красных водорослей.

Методом дискэлектрофореза в ПААГ нами исследован фракционный состав фикобилинового белка в зависимости от возраста марикультуры. Как показал анализ электрофореграмм, в фикобилиновом комплексе есть постоянные и изменчивые в процессе роста компоненты.

Суммарный электрофоретический спектр фикоэритрина f. *procerima* (с учетом возрастной изменчивости) имеет 5 форм, а именно: 0,02–0,03 ОЭП (малоизменчивая), 0,10–0,11 и 0,14–0,16 (стабильные), 0,27–0,28 (изменчивая), 0,30–0,33 (стабильная). Спектр фикоэритрина f. *dura* состоит из четырех стабильных форм с теми же электрофоретическими показателями: фракция с ОЭП 0,27–0,28 отсутствовала. Доминирующей формой фикоэритрина во всех случаях была фракция с ОЭП 0,30–0,33. На основании электрофоретической характеристики двух форм *G. verrucosa* можно сделать вывод о том, что f. *dura* имеет более стабильные фикобилиновые компоненты, чем f. *procerima*, однако в целом их качественный состав подобен. Состав фикобилиновых пигментов марикультуры и этой же водоросли в естественных условиях был идентичным.

В последнее десятилетие наблюдается усиленный интерес к использованию фикобилиновых пигментов. Известные фирмы США начали с 1992 г. производство фикобилипротеинов для пищевой и парфюмерной промышленности. В США запатентовано использование фикоэритрина и фикоцианина как флуоресцентных метчиков для иммуноанализа клеточной поверхности (Stryer Zubert, 1989). Есть сведения об онкостатическом действии фикобилиновых пигментов. В результате наших исследований была показана способность фикобилиновых пигментов проявлять радиопротекторные свойства.

В и т а м и н ы. По сравнению с высшими растениями витаминный состав водорослей изучен крайне недостаточно. У некоторых водорослей отдельных витаминов больше, чем у высших растений, особенно цветковых. Поэтому актуальным является поиск новых объектов, которые могли бы служить источником витаминов. Определенный интерес в этом плане представляет марикультура водорослей. Нами проведено определение водорастворимых витаминов во время роста двух форм *G. verrucosa* в условиях марикультуры. Установлено, что у обеих форм наибольшее относительное содержание тиамина было у 93-суточной культуры (40,0–48,0 мкг/г) (табл. 6).

Таблица 6. Содержание витаминов группы В (мкг/г сухой массы) и аскорбиновой кислоты (мг %) у разных форм *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. в условиях марикультуры

Витамин	Возраст марикультуры, сут			
	15	44	79	93
<i>f. procerima</i>				
Никотиновая кислота	7,40	4,80	11,00	20,00
Пиридоксин	12,75	5,80	14,00	6,25
Тиамин	9,40	10,25	32,80	40,00
Биотин	3,44	3,08	3,44	5,04
Рибофлавин	4,22	7,04	3,40	11,26

Окончание табл.6

Аскорбиновая кислота	58,00	58,00	44,00	48,00
f. dura				
Никотиновая кислота	7,00	10,00	11,00	28,00
Пиридоксин	8,50	7,20	14,00	25,50
Тиамин	7,20	16,40	32,80	48,00
Биотин	4,12	3,96	3,44	3,44
Рибофлавин	4,90	4,85	3,40	1,40
Аскорбиновая кислота	62,00	58,00	44,00	60,00

Важным фактором, который определяет интенсивность роста микроорганизмов, является биотин (витамин Н). Он входит в состав простетической группы ряда ферментов и принимает участие в карбоксилировании и дезаминировании аминокислот, способствует синтезу ненасыщенных жирных кислот.

У *G. verrucosa* в природных условиях накапливается 3,96-5,92 мкг биотина на 1 г сухой массы. В условиях марикультуры у *f. procerima* максимальное относительное содержание биотина (5,04 мкг/г) было констатировано на последних этапах культивирования (у 93-х суточной культуры).

Амид никотиновой кислоты входит в состав ферментов, принимающих участие в окислительно-восстановительных и других процессах обмена. У *G. verrucosa* в естественных условиях его содержание составляет 11,0-40,0 мкг/г сухой массы. Количество этого витамина во время роста водорослей в марикультуре постепенно увеличивается и достигает на 93-е сутки 20,0 мкг/г сухой массы у *f. procerima* и 28,0 у *f. dura*.

Пиридоксин (витамин В₆) в составе аминотрансфераз, декарбоксилаз и других ферментов принимает участие в белковом обмене. Основным источником витамина В₆ являются дрожжи, в которых его количество достигает 50 мкг/г. В природных условиях *G. verrucosa* содержит 29,0-40,0 мкг/г пиридоксина. В условиях марикультуры в данном опыте его накапливалось меньше: 25,5 мкг/г у *G. verrucosa f. dura* в возрасте 93 сут и 14,0 мкг/г у *f. procerima* в возрасте 79 сут.

Рибофлавин (витамин В₂) в составе флавиновых ферментов принимает участие в окислительно-восстановительных процессах клеток. В биомассе природных популяций *G. verrucosa* количество рибофлавина колеблется от 1,4 до 4,22 мкг/г сухой массы. В условиях марикультуры рибофлавин накапливается в большем количестве; у *G. verrucosa f. procerima* в возрасте 79 сут его было 4,85 мкг/г, а у *f. dura* максимум отмечен на 93-е сутки - 11,26 мкг/г.

Из водорастворимых витаминов наиболее изучена аскорбиновая кислота (витамин С). Она широко распространена в растительном мире. Функциональная роль ее связана со взаимным превращением аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот, что определяет их активное участие в окислительно-восстановительных реакциях.

Результаты опытов свидетельствуют о том, что максимальное содержание витамина С совпадает с максимальным приростом *G. verrucosa f. procerima* (15 сут). В более поздние сроки выращивания *G. verrucosa* количество этого витамина уменьшается.

В целом, можно сделать вывод о том, что две исследованные формы *G. verrucosa* синтезируют широкий спектр водорастворимых витаминов. Учитывая сведения о количестве и характере накопления водорастворимых витаминов *G. verrucosa* в условиях марикультуры, можно получить биохимические препараты, обогащенные такими физиологически активными веществами, как витамины В₂, В₆, биотин, амид никотиновой кислоты, аскорбиновая кислота.

Заключение

Обе формы *G. verrucosa* (*f. dura* и *f. procerima*), выращенные в условиях марикультуры, содержат ряд ценных компонентов, которые можно

получить из них, расширив тем самым спектр использования биомассы, которая до этого применялась лишь как источник агара. Исследованные формы значительно отличаются по коэффициенту прироста, который был выше у *f. procerima*. Обе формы содержат значительное количество углеводов (19,3-25,8 %), среди которых преобладают моно- и дисахара, структурные полигликаны, полноценный белок, в состав которого входят все незаменимые аминокислоты (40,3-43,9 % общего содержания аминокислот), широкий набор липидных компонентов с богатым жирнокислотным составом. Они накапливают водорастворимые витамины, фикобилины.

При наличии многих общих черт две изученные формы *G. verrucosa* отличаются уровнем накопления компонентов и их динамикой. Так у *f. procerima* больше углеводов, галактолипидов, целого ряда жирных кислот, фикоэритрина. Учитывая существенный прирост ее биомассы, по сравнению с *f. dura*, можно получить значительно большее количество соответствующих веществ за более короткий срок. При расчете выхода соответствующих веществ необходимо учитывать изменения их содержания с возрастом культуры. Содержание аминокислот соответствует динамике прироста культур исследованных форм. Количество разных углеводных фракций у двух форм постепенно увеличивается. Это же касается таких витаминов, как тиамин, никотиновая кислота, пиридоксин. Количество фикоэритрина было наибольшим у обеих форм в 2-месячном возрасте.

Учитывая наличие и уровень содержания отдельных веществ у *G. verrucosa* и перспективы ее промышленного использования, предлагаем схему ее поэтапной переработки. Первый этап – экстракция водорастворимых компонентов (фикобилипротеиды, витамины, моносахара, свободные аминокислоты). Второй – выделение из осадка липидных веществ, полисахаридов и некоторых белковых фракций. Приведенная выше биохимическая характеристика форм *G. verrucosa* позволяет рекомендовать именно ту ее форму в качестве сырья для получения определенных веществ, которая имеет преимущества в их содержании.

*E.G. Sudyina*¹, *A.A. Kalugina-Gutnik*², *E.I. Shnyukova*¹, *G.I. Lozovaya*¹,
*P.A. Mushak*¹, *S.I. Los*¹, *N.D. Tupik*¹, *R.N. Fomishyna*¹, *N.V. Mironova*²

¹N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Tereshchenkovskaya Str., Kiev-4, GSP, 252601, Ukraine

²A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas,
National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Nakhimov Prospect, Sevastopol, 335011, Republic of Crimea, Ukraine

BIOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF MARICULTURE OF *GRACILARIA VERRUCOSA* (HUDS.) PAPENF. AND PROSPECTS FOR ITS USING

The general characteristic of literature data on biochemical composition of different red algae species, mainly of genus *Gracilaria* is given. Importance of this data when using mentioned algae in national economy is discussed. Dynamics of biomass increasing and content of mono- and disaccharides, colloidal low-molecular polysaccharides, reserve polyglucans, structural easily hydrolysing polysaccharides and cellulose are determined. Content and amino acids composition of protein are presented. Dynamics of contents of total lipids, galactosyldiacylglycerides, monogalactosyldiglycerides and digalactosyldiglycerides, phospholipids, chlorophyll, phycobilliproteins, dynamics of fatty acids composition of lipides, activity of chlorophyllase, water-soluble vitamins of the group B and ascorbic acid are ascertained. Scheme of consecutive unwaite processing of each form and their harvest times are elaborated.

Key words: mariculture, red algae, *Gracilaria*, biochemistry, proteins, carbohydrates, lipids, pigments, vitamins, technology.

Барашков Г.К. Химия водорослей. - М.: Изд-во АН СССР, 1963. - 144 с.

Бойко Л.И., Головачева О.В., Кремер Ю.Н., Витоль С.П. Оценка белковых веществ водорослей как кормовых средств и поиски путей повышения их биологической ценности // III Всесоюз. совещ. по морской альгологии - макрофитобентосу, Севастополь, 1979. Тез. докл. - Киев, 1979. - С. 26-27.

- Каганович Е.Б., Каминер К.М. Биохимические особенности черноморской красной водоросли *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J.Ag. // Гидробиол. журн. - 1978. - 14, № 2. - С. 51.
- Калугина-Гутник А.А. Культивирование водорослей на Черном море // Рыбное хозяйство. - 1988. - № 9. - С. 60-63.
- Калугина-Гутник А.А., Миронова Н.В., Полищук Р.А. Морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика роста *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. в опытах с различными питательными средами // Промысловые водоросли и их использование: Сб. науч. тр. - М., 1987. - С. 84-98.
- Кизеветтер И.З. Химический состав и народно-хозяйственное значение промысловых макрофитов морей // Использование биологических ресурсов мирового океана - М.: Наука, 1980. - С. 214.
- Красильникова С.В., Медведева Е.И. О некоторых особенностях щелочерастворимого белка красной водоросли *Furcellaria fastigiata* // Химия природ. соедин. - 1975. - № 3. - С. 400-404.
- Медведева Е.И., Селич Е.Ф. О щелочерастворимом белке красной черноморской водоросли *Phyllophora nervosa* // Биохимия. - 1968. - 33, № 3. - С. 685.
- Медведева Е.И., Красильникова С.В., Панченко К.А. и др. Белки водорослей и возможные пути их использования // Растительные белки и их биосинтез. - М.: Наука, 1975. - С. 167-172.
- Прокуменищкова Л.Т., Ядыкин А.А., Осипова И.Д. Действие света и минерального питания на активность фотосинтетических ферментов и содержание пигментов у красной водоросли *Gracilaria verrucosa* // Биология моря. - 1990. - № 1. - С. 52-56.
- Судьина Е.Г., Голод М.Г., Сиваш А.А., Шевчук Т.А. Хлорофиллаза в обращенных мицеллах // Докл. АН УССР. Сер. Б. Геол., хим. и биол. науки. - 1990. - № 1. - С. 69-72.
- Судьина Е.Г., Лозовая Г.И., Довбыш Е.Ф. и др. К вопросу о локализации хлорофиллазы // Физиол. и биохимия культ. раст. - 1973. - 5, № 2. - С. 154-158.
- Усов А.И., Иванова Е.Г. Полисахариды водорослей. 42. Состав и свойства агаров из черноморских красных водорослей *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. f. *procerima* и *Gracilaria dura* (Ag.) J.Ag. // Биоорг. химия. - 1990. - 16, № 11. - С. 1545-1552.
- Федоров А.А., Курсанов А.Л., Тахтаджян А.Л. и др. Жизнь растений. Т. 3. - М.: Просвещение, 1977. - 487 с.
- Фомішина Р.М., Довбиш К.П., Донцова І.Г. Хлорофілаза морських водоростей // Тез. доп. Укр. біохім. з'їзду. - Київ: Наук. думка, 1987. - С. 282-283.
- Фомішина Р.М., Шевчук Т.А. Сравнительная характеристика хлорофиллазы красных морских водорослей // Тез. докл. I Всесоюз. совещ. "Хемотаксономическое изучение споровых растений и грибов. Достижения и перспективы развития". - Киев, 1990. - С. 102-104.
- Чернова С.И., Звалинский В.И. Действие света высокой интенсивности на состояние хлорофилла в морских водорослях // Экологические аспекты фотосинтеза морских макроводорослей. - Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1978. - С. 167-174.
- Ahern T.J., Katon S., Sada E. Arachidonic acid production by the red alga *Porphyridium cruentum* // Biotechnol. and Bioeng. - 1983. - 25. - P. 1057-1059.
- Craigie J.S. Storage products // Algal Physiol. and Biochem. - Oxford etc., 1974. - P. 206-235.
- Fernandez L.E., Valiente O.G., Mainardi V. et al. Isolation and characterization of an antitumor active agartype polysaccharide of *Gracilaria domingensis* // Carbohydr. Res. - 1989. - 190, N 1. - P. 77-83.
- Fujimara-Arasari Teruco. In vitro digestibility of algal proteins // J. Phycol. - 1984. - 32, N 4. - P. 293-299.
- Goodwin T.W. Carotenoid and biliproteins // Algal Physiol. and Biochem. - Oxford etc., 1974. - P. 176-205.
- Hansen J.E. Strain selection and physiology in the development of *Gracilaria* mariculture // Hydrobiologia. - 1984. - 116. - P. 89-94.
- Hashimoto H., Murakami M. Red algae in Japan // Plant and Cell Physiol. - 1975. - 16. - P. 895-902.
- Jorgensen K.A., Dyerberg J. Platelets and atherosclerosis // Adv. Nutritional Res. - 1983. - 5. - P. 57-60.
- Lapointe. The effect of light and nitrogen on growth, pigment content and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta) // J. Phycol. - 1981. - 17. - P. 90-95.
- Lewis E.J. The protein, peptide and free amino acid composition in some species of *Laurencia* from Saurashtra coast // Proc. Indian Nat. Sci. Acad. - 1974. - 40, N1. - P. 38-43.
- Percival E. The polysaccharides of green, red and brown sea weeds: their basic structure, biosynthesis and function // Brit J. Phycol. - 1979. - 14, N 2. - P. 103-117.
- Rüdiger W. Phycobilliproteide // Ber. Dtsch. Bot. Ges. - 1975. - 88, N 1. - S. 125-139.
- Pat. 4859582 USA. Fluorescent conjugates for analysis of molecules and cells // Stryer Zubert, A.N. Glazer, O. Vernon. - Publ. 22.08.89.

Получена 26.03.93

Подписал в печать В.Е.Семененко