

На правах рукописи



Агаркова Вера Валерьевна

**Биохимические основы биотических взаимоотношений  
серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и бурой  
водоросли *Laminaria japonica***

03 00 16 - экология

03 00 04 - биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



ВЛАДИВОСТОК 2007

Работа выполнена в лаборатории технического обеспечения заводских методов разведения гидробионтов Федерального государственного унитарного предприятия “Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр” и в лаборатории химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН

Научные руководители

доктор химических наук,  
старший научный сотрудник  
Звягинцева Татьяна Николаевна

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Крупнова Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, доцент  
Фадеева Наталия Петровна

доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Ковалев Николай Николаевич

Ведущая организация

Тихоокеанский океанологический  
институт им акад В И Ильичева ДВО РАН

Защита состоится 1 ноября 2007 г в 10 00 часов на заседании диссертационного совета Д 212 056 02 при Дальневосточном государственном университете по адресу 690600, г Владивосток, Октябрьская, 27, конференц зал, ауд 435

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу 690600, г. Владивосток, Океанский проспект, 37, Научный музей ДВГУ  
Факс (4232)26-85-43

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ДВГУ

Автореферат разослан “11” сентября 2007 г

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Ю А Галышева

### Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы** Морской еж *Strongylocentrotus intermedius* является основным консументом ламинариевых водорослей, в районах произрастания которых и отмечены его массовые поселения. В водах, где прессинг естественных хищников невелик, основным фактором, регулирующим развитие популяции ежа, являются пищевые ресурсы (т.е. запасы ламинариевых водорослей). Как известно, в морских экосистемах площади твердых субстратов ограничены, что часто является лимитирующим фактором для расселения гидробионтов с подвижной личиночной стадией или водорослей, размножающихся с помощью подвижных зачатков - зооспор. В связи с этим представляет несомненный интерес изучение биотических взаимоотношений серого морского ежа и ламинарии японской для выяснения закономерностей их обитания на одних и тех же площадях.

Как было отмечено при натуральных наблюдениях, здоровые, крепкие водоросли в прижизненном состоянии (июнь – июль) ежом не поедаются. Эти же растения, ранее не привлекательные для морского ежа, в конце своего жизненного цикла (октябрь – ноябрь) покрыты ежом, который их активно поедает. Практически полностью потребляются ежом слоевища ламинарии в виде “выбросов” - растений, оторвавшихся от грунта после шторма, попавших на берег и вторично смытых волнами на морское дно. Поскольку объяснить наблюдаемое в природе предпочтение *S. intermedius* проростков, старых растений и выбросов ламинарии японской и отказ от взрослых, крепких слоевищ трудно, представляется целесообразным изучить поведенческие особенности морского ежа, а именно его пищевой выбор, на основе биохимических подходов.

В водных биоценозах большую роль во взаимодействиях популяций играют биохимические влияния, реализующиеся через выделение в воду различных метаболитов. Известно, что одним из основных механизмов действия токсичных веществ является ингибирование ферментативных процессов. Поэтому привлечение морских животных, поедающих водоросли, или защита от них может быть связана с индукцией синтеза веществ, подавляющих или активирующих ферменты пищеварительного тракта животных. Сообщения о подобном способе защиты для морских ежей отсутствуют, однако известно, что наземные растения защищаются от насекомых и травоядных, синтезируя ингибиторы амилаз (Broadway, 1996, Оно, Umezaki et al., 2001). Согласно литературным данным, такими ферментами у морских беспозвоночных прежде всего являются ламинариназы (1,3-β-D-глюканазы) (Елякова, 1978, Сундукова, Елякова, 1989).

Несмотря на активный промысел *S. intermedius* и его спрос на внешнем рынке многие аспекты биологии морского ежа недостаточно изучены. Наши исследования закономерностей существования и межвидовых отношений морского ежа и ламинарии японской расширяют представления о структуре и функционировании этого сообщества.

21

**Цель и задачи исследования** Цель работы изучить биохимические основы биотических взаимоотношений серого морского ежа *S intermedius* и бурой водоросли *L japonica*

Для достижения цели предстояло решить следующие задачи

- 1 Исследовать действие экстрактивных веществ свежесобранной *L japonica* на различных стадиях развития (от проростков до разрушающегося слоевища в конце ее жизненного цикла) и *L japonica*, хранившейся на берегу на 1,3-β-D-глюкоканазу - основной пищеварительный фермент морского ежа
- 2 Изучить действие экстрактивных веществ *L japonica* на оплодотворяющую способность спермы, оплодотворяемость яйцеклеток и продолжительность жизни развивающихся эмбрионов морского ежа *S intermedius*
- 3 Изучить биохимические особенности питания морского ежа *S intermedius* ламинарией японской Для этого провести сравнительный химический анализ *L japonica* до поедания ее ежом и экскрементов, выделенных ежом после потребления ламинарии
- 4 Изучить пищевую привлекательность *L japonica* (свежесобранной и разрушенной при хранении на берегу) для морского ежа, исследовав изменения в составе веществ ламинарии в зависимости от возраста и в процессе частичного разрушения талломов

**Защищаемые положения**

1 В процессе существования морской еж *S intermedius* и бурая водоросль *L japonica* выработали ряд приспособительных реакций на трофическом и репродуктивном уровнях, позволяющих выжить обоим видам

2 Свежесобранная ламинария первого года жизни содержит вещества, ингибирующие основной фермент пищеварительного тракта морского ежа В процессе разрушения слоевищ водоросли, при ее хранении на берегу, в них накапливаются вещества, активизирующие как пищеварительный процесс, так и процесс оплодотворения

**Научная новизна** Впервые показано, что совместное существование ламинарии японской и морского ежа *S intermedius* в одном биоценозе обеспечивается различными реакциями организмов, происходящими на трофическом и репродуктивном уровнях Впервые в *L japonica* первого года жизни обнаружены вещества, ингибирующие фермент пищеварительного тракта морского ежа Очевидно, поэтому молодая ламинария не поедается ежом Вещества водно-этанольных экстрактов из *L japonica* второго года жизни и разрушенной при хранении на берегу водоросли, активируют пищеварительный фермент морского ежа Действие этих же веществ на репродукцию *S intermedius* аналогично Вещества из водоросли первого года жизни являются наиболее токсичными по отношению к половым продуктам морского ежа, в процессе старения и разрушения *L japonica* вещества, ингибирующие оплодотворение, исчезают Установлено, что выделенный из *L japonica* ингибитор пищеварительного фермента морского ежа является 1,3,1,6-β-D-глюкоолигосахаридом, связанным с полифенольной составляющей

**Практическая значимость работы** Результаты исследований совместного существования *S intermedius* и *L japonica* являются основой для разработки биотехнологии повышения товарных качеств морского ежа. Продукт, полученный после хранения *L japonica* на берегу, является привлекательным пищевым источником для морского ежа, что подтверждается как натурными наблюдениями, так и биохимическими исследованиями, показавшими присутствие среди веществ разрушающейся *L japonica* активатора пищеварительного фермента морского ежа.

**Апробация работы** Основные положения диссертации представлены на XVIII Международном симпозиуме по морским водорослям, Норвегия, 2004, Международном симпозиуме ICES, Владивосток, 2005, Международном симпозиуме по морским водорослям стран Азиатско-Тихоокеанского региона, Банкок, Таиланд, 2005, II Международной конференции "Морские прибрежные экосистемы водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки", Архангельск, 2005.

**Публикации** По теме диссертации опубликовано 8 работ.

**Структура и объем работы** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 198 источников отечественных и иностранных авторов. Работа изложена на 116 страницах, содержит 12 таблиц, иллюстрирована 25 рисунками.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили бурая водоросль *L japonica* и морской еж *S intermedius*, которых собирали с февраля по ноябрь 2000-2005 гг на северном побережье Приморья (на участках от м Дальнего до м Низменного и от м Ватовского до м Четырех скал). Исследования действия экстрактивных веществ из *L japonica* на сперматозоиды, яйцеклетки и развивающиеся эмбрионы *S intermedius* проводили на морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН (Хасанский район, Приморский край).

С целью изучения динамики изменений в химическом составе слоевищ *L japonica*, разрушенных в природных условиях, нами была разработана методика, основанная на хранении на берегу под брезентом свежесобранной, измельченной водоросли. Каждые сутки в течение 7 дней отбирали для анализа по 500 г измельченных, разрушающихся слоевищ *L japonica*. Методика позволяет искусственно создать аналогично так называемым выбросам ламинарии, т.е. водорослям, оторванным от субстрата штормами и скопившимся на берегу.

Получение экстрактов из *L japonica* растворителями. Измельченные образцы свежесобранной и разрушенной при хранении на берегу *L japonica* обрабатывали этанолом (1 л этанола на 1 кг водорослей) при комнатной температуре в течение 2 недель. Водно-этанольный экстракт несколько раз обрабатывали хлороформом. Хлороформенный слой отделяли. Высушенный остаток *L japonica* обрабатывали ацетоном. Ацетоновые,

хлороформенные и водно-этанольные экстракты высушивали под вакуумом. Остаток водоросли использовали для извлечения полисахаридов (Zvyagintseva et al, 1999)

**Фермент 1,3-β-D-Глюканаза** была выделена из пищеварительного тракта серого морского ежа *S. intermedius* по известному методу (Сова и др, 2003)

**Определение активности фермента** Активность 1,3-β-D-глюканазы определяли по увеличению содержания восстанавливающих сахаров методом Нельсона (Nelson, 1944). В качестве субстрата использовали ламинаран (1 мг/мл) в 0,05 М ацетатном буфере, pH 5,4. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль глюкозы за 1 мин в условиях определения.

**Действие веществ *L. japonica* на 1,3-β-D-глюканазу морского ежа** определяли по методу, описанному Т.Н. Звягинцевой и Л.А. Еляковой (Zvyagintseva, Elyakova, 1992)

**Изучение биохимических особенностей питания морского ежа *S. intermedius* ламинарией** Проведен сравнительный химический анализ *L. japonica* до поедания ее ежом и ее массы, неувоенной ежом после съедания. Морские ежи, обитавшие на ламинариевых полях, отбирались в количестве 100 экземпляров и помещались в три емкости с проточной морской водой. Неувоенная, т.е. выделенная с экскрементами, ламинария собиралась и фиксировалась 96 %-ым этиловым спиртом.

**Действие экстрактивных веществ *L. japonica* на жизнеспособность эмбрионов *S. intermedius*** определено по методу, описанному М.И. Киселевой (Киселева и др, 2005)

**Оплодотворяющая способность спермы и оплодотворяемость яйцеклеток морского ежа** определена по методу, описанному П.А. Диннелом (Dinnel, Link, 1987)

Статистическую обработку результатов проводили, используя t-критерий Стьюдента с вероятностью  $p \leq 0,05$ . Доверительная вероятность принималась равной 0,95. В работе приведены данные трех-четырёх экспериментов.

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения взаимодействия морского ежа *S. intermedius* и *L. japonica* использовалось несколько подходов. Один из них, известный для наземных организмов (Broadway, 1996), заключается в поиске среди экстрактивных веществ *L. japonica* эффекторов (активаторов или ингибиторов) 1,3-β-D-глюканазы - пищеварительного фермента *S. intermedius*.

#### 3.1 Действие веществ, выделенных из *L. japonica*, на 1,3-β-D-глюканазу – пищеварительный фермент *S. intermedius*

Как следует из натуральных наблюдений, наиболее охотно *S. intermedius* поедает разрушающиеся или ослабленные растения *L. japonica* (рис 1). Известно, что водоросли разрушаются под воздействием эндогенных (спороношение) и экзогенных (механический обрыв пластины или действие бактериальной флоры) факторов (Duggins et al, 1989, Kirkman, Kendrick, 1997, Vanderklift, Kendrick, 2005). Для исследования действия экстрактивных веществ из *L. japonica* на пищеварительный фермент *S. intermedius*

использовалась как свежесобранная ламинария на различных стадиях развития (от проростков до двухлетней водоросли, в конце ее жизненного цикла), так и разрушающаяся под действием эндоферментов и частично бактерий водоросль (после хранения ее под брезентом на берегу).

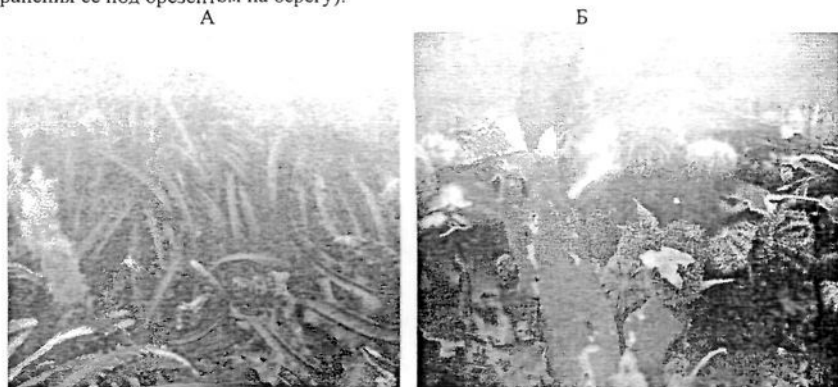


Рис. 1. *L. japonica*: А - водоросль первого и второго годов жизни, не используемая в пищу морским ежом; Б - водоросль второго года жизни, после спороношения, поедаемая морским ежом

Экстракцию веществ из свежесобранной и разрушенной при хранении ламинарии, проводили последовательно водным этанолом, хлороформом, ацетоном, водой. На присутствие эффекторов 1,3-β-D-глюканазы были испытаны вещества водно-этанольных, хлороформенных, ацетоновых, водных экстрактов из различных образцов ламинарии (рис. 2).

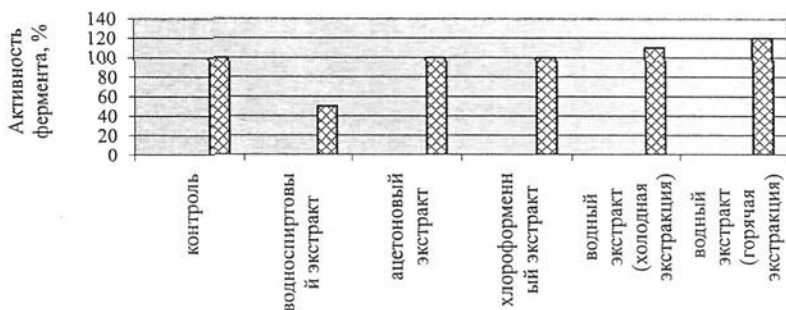


Рис. 2. Действие экстрактивных веществ, извлекаемых растворителями из свежесобранной *L. japonica* первого года жизни, на пищеварительный фермент морского ежа. За 100% принимали активность фермента в стандартных условиях

Вещества, содержащиеся в ацетоновых и хлороформенных экстрактах, не изменяли активности 1,3-β-D-глюканазы. Вещества, присутствовавшие в водных

экстрактах обезжиренных остатков водорослей первого и второго годов жизни, в концентрации 100 мкг/мл проявляли слабое активирующее действие (до 20%) на 1,3-β-D-глюканазу *S. intermedus*. Вещества, ингибирующие пищеварительный фермент морского ежа, были обнаружены только в водно-этанольных экстрактах свежесобранной ламинарии первого года жизни. Максимальное ингибирующее действие экстрактивных веществ на 1,3-β-D-глюканазу достигало 50-70% в интервале концентраций веществ 400-600 мкг/мл. Вещества водно-этанольных экстрактов из свежесобранной ламинарии второго года жизни незначительно активировали пищеварительный фермент морского ежа (до 20%). Вещества водно-этанольных экстрактов из проростков ламинарии не изменяли активность 1,3-β-D-глюканазы.

Более детально исследовано действие на активность 1,3-β-D-глюканазы веществ водно-этанольных экстрактов, полученных из свежесобранной ламинарии первого и второго годов жизни, а также из этих же растений после хранения на берегу (рис 3).

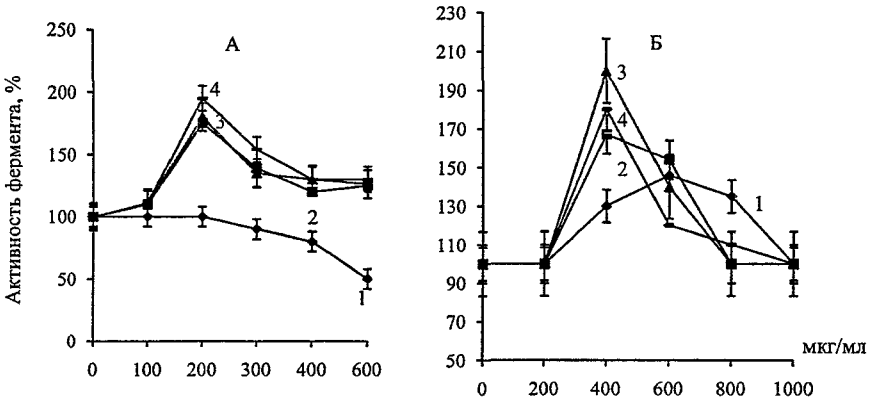


Рис 3 Изменение активности 1,3-β-D-глюканазы *S. intermedus* (активность фермента, % от контроля) под действием веществ водно-этанольных экстрактов, полученных из свежесобранных слоевищ *L. japonica* (1), а также из этих же растений, хранившихся в течение 1 сут (2), 2 сут (3), 3 сут (4), в зависимости от концентрации вещества (мкг/мл) А - *L. japonica* первого года жизни, Б - *L. japonica* второго года жизни

Показано, что ингибирующее действие экстрактивных веществ, полученных из свежесобранной *L. japonica* первого года жизни, на 1,3-β-D-глюканазу возрастает (до 50%) с увеличением концентрации веществ от 200 до 600 мкг/мл. Важно отметить, что вещества водно-этанольных экстрактов, полученных из *L. japonica* первого года жизни, хранившихся в течение 2-4 сут на берегу, напротив, проявляли значительное активирующее действие на фермент ежа. Так, в интервале концентраций веществ от 150 до 400 мкг/мл наблюдалось повышение активности 1,3-β-D-глюканазы практически в 1,5-2 раза (рис 3, А). Экстрактивные вещества, выделенные из свежесобранной *L. japonica*



второго года жизни, обладали незначительным активирующим действием на пищеварительный фермент *S intermedius*. После хранения *L japonica* второго года жизни на берегу в течение 2-4 сут, так же, как и в случае хранившейся водоросли первого года жизни, накапливались вещества, под действием которых активность пищеварительного фермента ежа увеличивалась в 1,5-2 раза (рис 3, Б). Вещества водно-этанольных экстрактов, полученных из растений первого и второго годов жизни, хранившихся в течение 5-7 сут на берегу, не изменяли активность пищеварительного фермента морского ежа.

С целью выяснения природы эффекторов было детально исследовано действие на 1,3-β-D-глюканазу индивидуальных веществ, характерных для *L japonica*. Согласно литературным данным, такими веществами являются углеводы, маннит, аминокислоты, белки, липиды, полифенолы. Нами экспериментально установлено, что маннит, глутаминовая кислота, флоротанин, альгиновая кислота в широком интервале концентраций (10-1000 мкг/мл) не оказывали действия на 1,3-β-D-глюканазу морского ежа. Фукоидан, выделенный из *L japonica* второго года жизни, при концентрации 50-80 мкг/мл, незначительно увеличивал активность фермента (до 20%). Три основных гликолипида *L japonica* — сульфохиновозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин и моногалактозилдиацилглицерин увеличивали активность пищеварительного фермента морского ежа в 2,8, 2,2 и 1,3 раза, соответственно. Наибольшим стимулирующим действием обладал сульфохиновозилдиацилглицерин, повышающий активность фермента на 50% при концентрации вещества 90 мкг/мл и на 100% при концентрации 140 мкг/мл.

Согласно исследованиям Т.Н. Крупновой и В.А. Павлючкова (Крупнова, Павлючков, 2003), *S intermedius* питается в течение всего годового цикла с различной интенсивностью. Пищевая активность ослабляется зимой и повышается к весне с достижением пика в первой половине лета. Накопление ингибирующих веществ в ламинарии первого года жизни находится в обратной связи с пищевой активностью морского ежа. Максимум пищевой активности *S intermedius* приходится на месяцы, когда ингибитор в *L japonica* первого года жизни отсутствует, *L japonica* второго года жизни накапливает вещества, активирующие пищеварительный фермент ежа (рис 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, по всей видимости, механизм защиты от поедания с участием ингибиторов пищеварительного фермента морского ежа возможен только для ламинарии первого года жизни. Появление активирующих веществ в процессе старения и разрушения *L japonica*, усиливает пищевую привлекательность водоросли (рис 5).

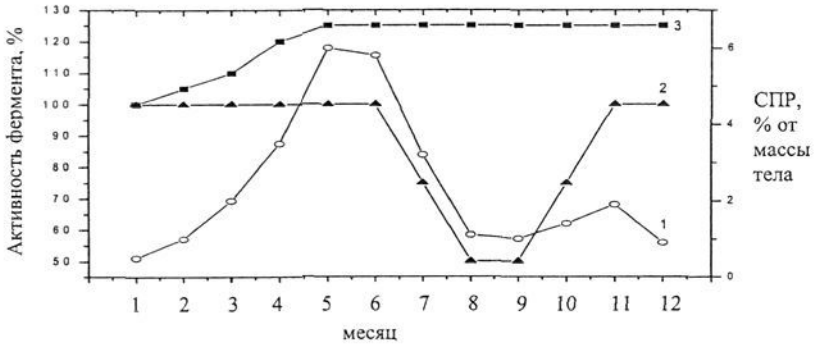


Рис. 4. Действие веществ водно-этанольных экстрактов, полученных из *L. japonica*, собранной в течение года, на активность 1,3-β-D-глюканазы *S. intermedius* с учетом пищевой активности морского ежа. 1 – сезонная динамика суточного пищевого рациона (СПР, % от массы тела) морского ежа (Крупнова, Павлючков 2003); 2 – действие экстрактивных веществ, выделенных из свежесобранной *L. japonica* первого года жизни, на активность 1,3-β-D-глюканазы; 3 – действие экстрактивных веществ, выделенных из свежесобранной *L. japonica* второго года жизни, на активность 1,3-β-D-глюканазы

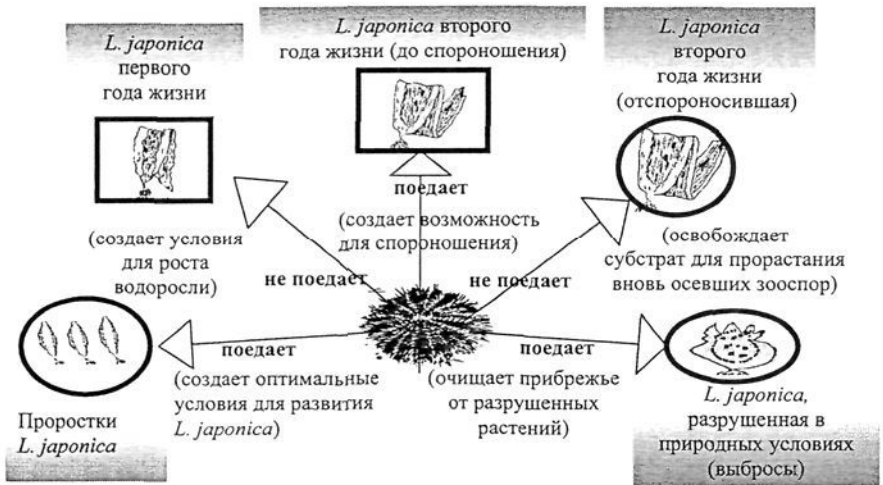


Рис. 5. Взаимоотношения морского ежа *S. intermedius* и водоросли *L. japonica*:  
 ○ - *L. japonica* не содержит ингибитора пищеварительного фермента морского ежа;  
 □ - *L. japonica* содержит ингибитор пищеварительного фермента морского ежа

Наши данные хорошо согласуются с наблюдаемым в природе охотным поеданием морским ежом полуразрушенных растений в виде выбросов. При старении *L. japonica* или отрыве от грунта, помимо накопления активирующих веществ, возможно, происходит деградация токсичных веществ, что делает водоросль привлекательной для морского ежа

(рис 5) Выживаемость проростков *L. japonica* в морской среде обеспечивается за счет их большой численности, обусловленной особенностями размножения *L. japonica* (Sheinber, 1930, Крупнова, 1984) Большая плотность проростков *L. japonica* не дает им хорошо развиваться Морской еж, поедая проростки водоросли, прорезживает их, создавая оптимальные условия для хорошего развития растений, поедая состарившиеся водоросли, т е утилизируя их, очищает прибрежные воды от разлагающихся растений, а также очищает и подготавливает субстрат для оседания новых порций зооспор *L. japonica* и их дальнейшего развития

### 3.2. Влияние веществ из *L. japonica* на сперматозоиды, яйцеклетки и эмбрионы морского ежа *S. intermedius*

Существование организмов в одном биотопе определяется не только их пищевыми предпочтениями, но и возможностью к размножению Согласно литературным данным, ламинараны и фукоиданы, выделенные из ламинарии японской, оказывают стимулирующее действие на половые продукты и на продолжительность жизни эмбрионов морского ежа *S. intermedius* (Киселева и др, 2005) Нами изучено влияние веществ водно-этанольных экстрактов из свежесобранной и разрушенной при хранении на берегу ламинарии на оплодотворяющую способность спермы, оплодотворяемость яйцеклеток и продолжительность жизни эмбрионов морского ежа (табл 1)

Табл 1 Влияние экстрактивных веществ из *L. japonica* на оплодотворяющую способность *S. intermedius*

<i>L. japonica</i>		Сперма		Яйцеклетки	
		ИК <sub>50</sub> *, мкг/мл	ИК <sub>100</sub> ** , мкг/мл	ИК <sub>50</sub> *, мкг/мл	
1 год	жизни	свежесобранная	50	250	>1000
		хранившаяся 1 сут	200	500	>1000
		хранившаяся 2 сут	250	>1000	>1000
2 года	жизни	свежесобранная	500	>1000	>1000, аггл
		хранившаяся 1 сут	500	>1000	>1000, аггл
		хранившаяся 2 сут	500	>1000	>1000, аггл

Примечание аггл – агглютинация, \* - концентрация экстрактивных веществ, ингибирующая оплодотворение на 50%, \*\* - концентрация экстрактивных веществ, ингибирующая оплодотворение на 100%

Как следует из таблицы 1, добавление экстрактивных веществ в концентрации до 1 мг/мл к яйцеклеткам не оказывало влияния на их дальнейшее оплодотворение Сперматозоиды после инкубации в растворе веществ (50 мкг/мл), выделенных из свежесобранной ламинарии первого года жизни, не оплодотворяли до 50% яйцеклеток Увеличение концентрации экстрактивных веществ до 250 мкг/мл приводило к полной потере оплодотворяющей способности сперматозоидов Вещества водно-этанольных экстрактов из ламинарии второго года жизни, добавленные к сперме, ингибировали оплодотворение яйцеклеток в концентрациях, на порядок более высоких

Для исследования действия экстрактивных веществ из *L. japonica* как на неподвижные оплодотворенные яйцеклетки, так и на активнодвигающиеся зародыши, вещества вносили в инкубационную смесь на двух различных стадиях развития эмбрионов морского ежа (зиготы и поздней бластулы 1) (таблицы 2, 3)

Табл 2 Влияние веществ водно-этанольных экстрактов из *L. japonica*, добавленных на стадии зиготы, на развивающиеся эмбрионы морского ежа

Образцы <i>L. japonica</i> , из которых получены экстрактивные вещества		Концентрация веществ, мкг/мл	Стадии развития **			Продолжительность жизни, сутки
			0,5 сут	4 сут	8 сут	
1 год жизни	свежесобранная	10-100* 250 500-1000	10-12 9-11 8-10	25-26, Г-20% 25-26, Г-50% Г	Г Г	7±2,5 6±2,5 2±1,5
	хранившаяся 1 сут	10-100 250-500 1000	10-12 9-11 8-11	25-26 25-26, Г-50% Г	Г Г	8±2,5 6±2,5 2±1,5
	хранившаяся 2 сут	10-100 250-500 1000	10-12 9-11 8-11	25-26 25-26, Г-50% Г	Г Г	10±2,5 6±1,5 2±1,5
2 года жизни	свежесобранная	10-50 100-250 500-1000	10-12 10-12 9-11	25-26 25-26 20-23, Г-80%	Г Г Г	11±1,5 8±1,5 6±1,5
	хранившаяся 1 сут	10-50 100-250 500-1000	10-12 10-11 8-11	25-26 25-26, Г-30% 18-23, Г-80%	Г Г Г	9±2,5 6±1,5 4±1,5
	хранившаяся 2 сут	10-50 100-250 500-1000	10-12 10-11 8-11	25-26 25-26, Г-30% 18-23, Г-80%	Г Г Г	8±1,5 6±1,5 4±1,5
Контроль		0,0	10-11	25-26, Г-30%	Г	6±1,5

Примечание \* - диапазон концентраций означает, что в пределах обозначенного интервала результаты действия не меняются Наблюдения проводили до полной гибели эмбрионов как в контроле, так и в опыте \*\* - Стадии развития 8, 9 – ранняя бластула 1, 2, соответственно, 10–11 – средняя бластула 1, 2, соответственно, 12 – поздняя бластула 1, 15 – ранняя гастрюла 2, 16- средняя гастрюла 1, 17 – средняя гастрюла 2, 18, 19 - поздняя гастрюла 1, 2, соответственно, 20, 21 – призма 1, 2, соответственно, 22, 23, 24 - ранний плутеус 1, 2, 3, соответственно, 25, 26 - средний плутеус 1, 2, соответственно (Бузников, Подмарёв, 1975), Г - гибель эмбрионов

Наибольшее стимулирующее действие оказывали экстрактивные вещества из водоросли второго года жизни (10-50 мкг/мл) В их присутствии наблюдалась наиболее высокая продолжительность жизни эмбрионов морского ежа (почти в 1,5-2 раза больше, чем в контроле) При более высоких концентрациях (500-1000 мкг/мл) все вещества оказывали ингибирующее действие на эмбрионы, выражавшееся в отставании их развития и значительном уменьшении продолжительности жизни Индивидуальные вещества, входящие в состав *L. japonica*, а именно маннит и глутаминовая кислота, в широком интервале концентраций (10-1000 мкг/мл) не влияли на репродуктивные функции морского ежа Возможно, биологическая активность экстрактивных веществ из *L. japonica* определяется присутствием других химических соединений, содержание которых значительно изменяется в процессе онтогенеза водоросли

Табл 3 Влияние веществ водно-этанольных экстрактов *L. japonica*, добавленных на стадии поздней бластулы 1, на развивающиеся эмбрионы морского ежа

Образцы <i>L. japonica</i> , из которых получены экстрактивные вещества		Концентрация веществ, мкг/мл	Стадии развития **			Продолжительность жизни, сутки
			1 сут	4 сут	6 сут	
1 год жизни	свежесобранная	10-100*	21-22	25-26, Г-30%	25-26, Г-80%	6 ± 2,5
		250	18-19, Г-20%	19-21, Г-50%	Г	5 ± 1,5
		500-1000	15-18, Г-30%	Г	Г	2 ± 1,5
1 год жизни	хранившаяся 1 сут	10-100	21-22	25-26	26	8 ± 2,5
		250	21-22	24-25	Г	5 ± 2,5
		500-1000	15-19, Г-30%	Г	Г	2 ± 1,5
1 год жизни	хранившаяся 2 сут	10-100	21-22	25-26	26	9 ± 2,5
		250-500	21-22	25-26	26	6 ± 1,5
		1000	15-19	21-23, Г-80%	Г	4 ± 1,5
2 года жизни	свежесобранная	10	21-22	24-25	25-26, Г-50%	6 ± 2,5
		50-250	21-22	24-25	26	8 ± 2,5
		500-1000	18-20, Г-20%	23-25, Г-30%	23-25, Г-80%	6 ± 1,5
	хранившаяся 1 сут	10	22	25-26, Г-10%	26, Г-50%	6 ± 2,5
		50-250	21-22	25-26, Г-10%	26, Г-50%	8 ± 2,5
		500-1000	18-21, Г-20%	23-25, Г-30%	24-26, Г-80%	6 ± 1,5
	хранившаяся 2 сут	10	22	25-26, Г-30%	25-26, Г-50%	6 ± 2,5
		50-250	22	25-26, Г10%	26, Г-30%	9 ± 2,5
		500-1000	20-21	23-25, Г-10%	25-26, Г-50%	7 ± 1,5
Контроль		0 0	21-22	25-26, Г-30%	25-26, Г-80%	6 ± 1,5

Примечание \* - диапазон концентраций означает, что в пределах обозначенного интервала результаты действия не меняются. Наблюдения проводили до полной гибели эмбрионов как в контроле, так и в опыте \*\* - Стадии развития 15 - ранняя гастрюла 2, 16 - средняя гастрюла 1, 17 - средняя гастрюла 2, 18, 19 - поздняя гастрюла 1, 2, соответственно, 20, 21 - призма 1, 2, соответственно, 22, 23, 24 - ранний плутеус 1, 2, 3, соответственно, 25, 26 - средний плутеус 1, 2, соответственно (Бузников, Подмарев, 1975), Г - гибель эмбрионов

### 3.3 Изменение состава экстрактивных веществ *L. japonica* в зависимости от стадии развития и времени хранения водоросли

Для выявления связи между составом экстрактивных веществ из свежесобранной и разрушенной при хранении ламинарии и их пищевой привлекательностью для морского ежа был проведен сравнительный анализ компонентов водно-этанольных и водных экстрактов из *L. japonica* (рис 6)

Установлено, что в процессе разрушения талломов ламинарии при ее хранении на берегу увеличивается общее количество углеводов, растворяющихся в водном этаноле (на 30-50%), в том числе маннита (на 10-20%) По-видимому, в процессе хранения ламинарии разрушаются клеточные стенки водоросли и появляются низкомолекулярные олиго- и полисахариды, легко переходящие в водный этанол С увеличением времени хранения *L. japonica* на берегу до 4 сут содержание глутаминовой кислоты в экстрактивных веществах уменьшалось в 5 раз, белка в 2 раза, полифенолов в 3 раза

Нами показано активирующее действие фукоидана, выделенного из свежесобранной *L. japonica* второго года жизни, на пищеварительный фермент морского

ежа. В связи с этим исследованы моносахаридный состав и содержание водорастворимых полисахаридов в различных образцах *L. japonica* (табл. 4)

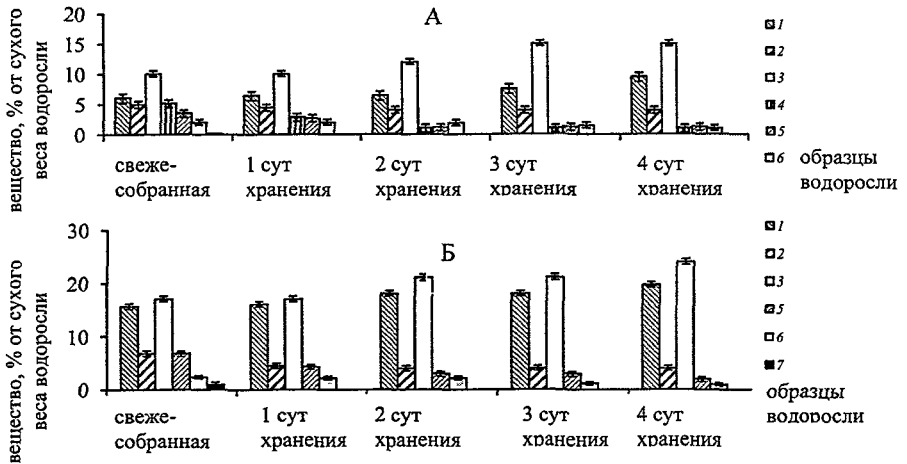


Рис 6 Зависимость состава веществ (% от сухого веса водоросли) *L. japonica* от возраста и времени хранения водоросли А - *L. japonica* первого года жизни, октябрь 2004 г, Б - *L. japonica* второго года жизни, октябрь 2004 г 1 - общий сахар, 2 - фукозосодержащие вещества, 3 - маннит, 4 - глутаминовая кислота, 5 - белок, 6 - полифенолы, 7 - ламинаран

Табл. 4 Моносахаридный состав и содержание водорастворимых полисахаридов (фукоиданов и ламинаранов) (%) в образцах *L. japonica* первого и второго годов жизни, до и после хранения на берегу

Образцы водоросли		Полисахарид	Общие сахара *, % от навески	Моносахаридный состав Glc/Fuc/Gal/Man/Xyl/Rha	Сульфаты **, % от навески
1 год жизни	свеже-собранная	фукоидан	6,8	0 / 54 / 5 / 28 / 10 / 3	14,0
		ламинаран	13,8	52 / 10 / 8 / 28 / 2 / 0	н о
	хранившаяся 3 сут	фукоидан	5,6	0 / 35 / 21 / 39 / 4 / 1	4,8
		ламинаран	9,3	н о	н о
2 года жизни	свеже-собранная	фукоидан	16	2 / 65 / 3 / 23 / 6 / 1	26,0
		ламинаран	22	23 / 20 / 7 / 45 / 3 / 2	н о
	хранившаяся 3 сут	фукоидан	7,8	4 / 49 / 18 / 21 / 6 / 2	3,0
		ламинаран	13,8	н о	н о

\* - содержание сахаров в полисахаридной фракции, определенное фенол-серниокислотным методом, \*\* - сульфаты определены турбодиметрическим методом (Craigier, Wen et al., 1984), н о - не определено

Можно отметить, что фукоидан, выделенный из ламинарии, хранившейся 3 сут, более гетерогенен по моносахаридному составу, чем фукоидан из свежесобранной

ламинарии содержание фукозы, маннозы, галактозы в нем примерно одинаково. В ИК - спектрах фукозосодержащих полисахаридов, выделенных из свежесобранной ламинарии, наблюдаются интенсивные полосы поглощения в области  $850\text{ см}^{-1}$  и  $1200\text{ см}^{-1}$ , соответствующие сульфатным группам. Напротив, образцы полисахаридов, выделенных из хранившейся на берегу водоросли, практически не сульфатированы, что подтверждается турбодиметрическим анализом (табл 4, рис 7)

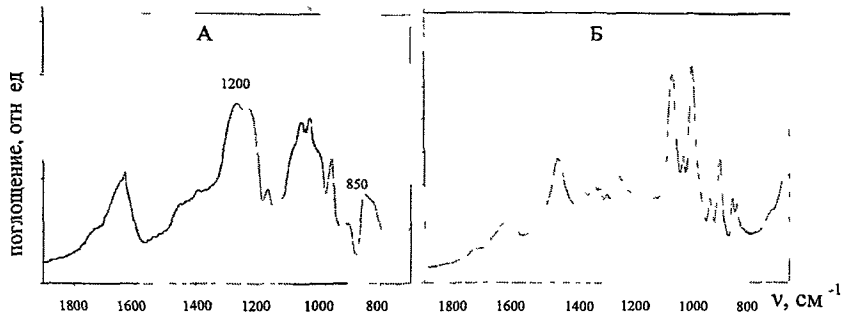


Рис 7 ИК - спектры фукозосодержащих полисахаридов, выделенных из свежесобранной (А) и разрушенной при хранении на берегу в течение трех сут *L. japonica* второго года жизни (Б)

Исследование показало, что *L. japonica* содержит вещества, количество и структура которых, в определенные моменты ее жизненного цикла значительно изменяются, что может быть связано с изменением пищевой привлекательности водоросли для морского ежа. Биохимические характеристики *L. japonica* различных стадий развития хорошо согласуются с характером пищевых предпочтений *S. intermedius*. Данные эксперимента по изучению химического состава веществ *L. japonica* после ее хранения на берегу могут лечь в основу биотехнологии подкормки морского ежа. Продукт, полученный после хранения *L. japonica* на берегу, в течение 3-4 сут привлекателен как пищевой источник для морского ежа, что подтверждается как натурными наблюдениями, так и биохимическими исследованиями.

### 3.4. Биохимические особенности питания морского ежа ламинарией

#### Вещества, усваиваемые *S. intermedius* из пластин *L. japonica*

Представляет интерес, как в процессе переваривания ламинарии ежом изменяется состав ее веществ. Для изучения усвояемости веществ *L. japonica* ежом нами был проведен сбор водоросли до ее поедания и экскрементов, выделенных ежом после потребления ламинарии, с последующим биохимическим анализом веществ, растворимых в водном этаноле и в воде (табл 5). Как следует из табл 5, морской еж в первую очередь усваивает из *L. japonica* маннит и свободные аминокислоты, а так же до 50% белковых веществ.

Табл 5 Общая характеристика ламинарии, потребляемой морским ежом

Образцы водоросли	Вес сырой водоросли, г	Вес сухой водоросли, г	Выход сухой водоросли, %	Выход водорастворимых веществ, %***	Выход веществ, р-римых в водном спирте, %***	Вещества, растворимые в водном этаноле, %***		Водорастворимые вещества, %***		
						Маннит <sup>1</sup>	Свободные а.к. <sup>2</sup>	Белок <sup>3</sup>	ламинаран <sup>4</sup>	фукоидан <sup>5</sup>
К*	200	34,0	17,0	15,7	13,8	10	1,30	2	0,7	2,2
О**	120	13,3	11,15	31,9	23,3	2,3	0,1	1	0,4	11,8

\* - К- контрольный образец ламинарии, служившей продуктом питания для морского ежа, \*\* - О-экскременты морского ежа, \*\*\* - % от веса сухой водоросли <sup>1</sup> - маннит определяли методом Нэша (Vaskovsky, Isay, 1969), <sup>2</sup> - свободные аминокислоты в экстракте определяли на аминокислотном анализаторе "Biotronik", <sup>3</sup> - белок определяли по Лоури (Lowry, 1951)

Известно, что морские ежи усваивают 50-70% растворимых в воде полисахаридов и до 75% альгиновой кислоты (Menelona, Pelletier, 2005), однако сведения об усвоении ими ламинаранов и фукоиданов отсутствуют. Нами исследовано содержание и моносахаридный состав водорастворимых полисахаридов - ламинаранов и фукоиданов в талломах исходной ламинарии и в экскрементах морского ежа (табл 6)

Табл 6 Выход (%) и моносахаридный состав фракций водорастворимых полисахаридов (фукоиданов и ламинаранов) из *L. japonica* до и после питания на ней морского ежа

Образцы водоросли	Полисахарид	Выход (% от обезжир водоросли)	Общие сахара (% от навески)	Моносахаридный состав Glc / Fuc / Gal / Man / Xyl/Rha
К*	Фукоидан	2,2	9,3	0 / 53,0 / 27,8 / 6,25 / 11,8 / 0
	ламинаран	0,7	12,9	16,9 / 38,5 / 30,6 / 2,5 / 9,3 / 0
О**	Фукоидан	11,8	8,3	0 / 28,9 / 43,5 / 5,65 / 14,7 / 5,6
	ламинаран	0,4	10,5	15,2 / 17,6 / 19,5 / 9,3 / 14,5 / 14,5

\* - К-контрольный образец ламинарии, служившей продуктом питания для морского ежа  
\*\* - О-экскременты морского ежа

Показано, что количество заряженных полисахаридов аналогичных фукоидану в отходах питания в 3-5 раз выше, чем в контрольных образцах *L. japonica*. Возможно, фукоидан не усваивается ежом и накапливается в экскрементах. Фукоидан, выделенный из экскрементов морского ежа, содержит практически в 2 раза меньше фукозы и обогащен ксилозой, рамнозой, маннозой, галактозой по сравнению с фукоиданом из *L. japonica*, служившей продуктом питания для морского ежа (табл 6)

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при нахождении *L. japonica* в пищеварительном тракте ежа клеточные стенки водоросли подвергаются значительной деструкции. В составе белковых, полисахаридных и др. веществ *L. japonica*, происходят глубокие изменения. И эти изменения могут являться основой для разработки биотехнологии выращивания *L. japonica* с заданными, привлекательными для питания



ежа, характеристиками (в частности, необходимо выращивать водоросль с повышенным содержанием маннита, аминокислот, полисахаридов, чего возможно достичь в условиях марикультуры водоросли (Крупнова, 2002))

### 3.5. Выделение из слоевищ *L. japonica* ингибитора 1,3-β-D-глюканазы морского ежа *S intermedius*

Выделение ингибитора 1,3-β-D-глюканазы из свежесобранной *L. japonica* первого года жизни проводилось по разработанной нами методике, включающей следующие стадии

1 *Обработка свежесобранной водоросли этанолом (1 л, по весу)* Водно-этанольный экстракт содержал соли, полифенолы и другие низкомолекулярные вещества. В водный этанол экстрагировалось около 30% веществ от сухого веса водоросли, в том числе сюда переходили вещества, обладающие ингибирующим действием на 1,3-β-D-глюканазу морского ежа.

2 *Обработка водно-этанольного экстракта хлороформом* Водно-этанольный экстракт несколько раз обрабатывали хлороформом, в который переходила неактивная липидная фракция. Хлороформенный слой отделяли. Вещества, ингибирующие активность фермента, оставались в супернатанте. Супернатант концентрировали под вакуумом досуха.

3 *Хроматография на гидрофобном носителе Полихром-1* Полученный осадок растворяли в воде и наносили на колонку с гидрофобным носителем Полихромом-1 (политетрафторэтиленом). Вещества с Полихрома-1 последовательно элюировали сначала водой, а затем водным этанолом со ступенчатым градиентом концентрации (10-, 30-, 60-, 80%). Фракция (FV), элюируемая 30%-ым водным этанолом, ингибировала пищеварительный фермент морского ежа на 50% при концентрации экстрактивных веществ 120 мкг/мл. Активную фракцию высушивали лиофильно. Результаты выделения и очистки ингибитора приведены на рис. 8 и в табл. 7. Идентификацию веществ в активной фракции проводили различными методами (рис. 8, табл. 8).

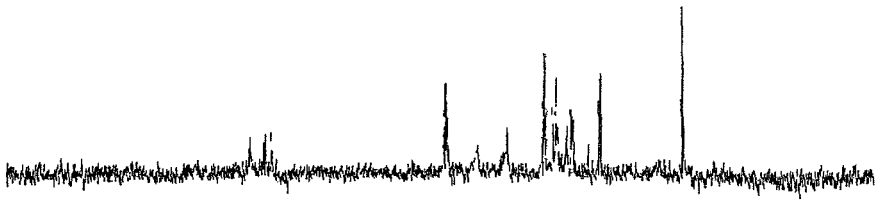


Рис. 8  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр фракции FV, полученной при разделении водно-этанольного экстракта *L. japonica* на ПХ-1

Табл 7 Выделение и характеристика ингибирующей фракции из *L. jaronisa* первого года жизни

Стадии очистки	Выход ингибирующей фракции, % от веса сухой водоросли	I <sub>50</sub> , мкг/мл	Степень очистки по ингибирующей способности
Исходная водоросль	100		
Экстракция водным этанолом, фракция - ФI	30	600±0,5	1
Обработка экстракта хлороформом, фракция ФII	22	0	0
Гидрофобная хроматография, фракция ФIII (вода)	4	0	0
Гидрофобная хроматография, фракция ФIV (10% этанол)	4	0	0
Гидрофобная хроматография, фракция ФV (30% этанол)	2	120±0,5	3,3
Гидрофобная хроматография, фракция ФV (60% этанол)I	1,5	0	0
Гидрофобная хроматография, фракция ФVII (80% этанол)	1,5	0	0

В составе активной фракции ФV был обнаружен и идентифицирован маннит (данные <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии, химические сдвиги 63 9 мд (C1, C6), 72 2 мд (C2, C5), 70 6 мд (C3, C4)) Как уже упоминалось, ингибирующего действия маннита на 1,3-β-D-глюкоаназу не выявлено Углеводы были обнаружены и количественно определены фенол-серноокислотным методом Анализ продуктов кислотного гидролиза на углеводном анализаторе "Biotronik" показал, что основным моносахаридом углеводной компоненты этой фракции является глюкоза

Табл 8 Характеристики фракций, полученных на различных стадиях очистки ингибитора

Характеристика	Фракция						
	ФI	ФII	ФIII	ФIV	ФV	ФVI	ФVII
Содержание белка <sup>1</sup> , % от навески	2	0	2	4	0	3	н о
Содержание углеводов <sup>2</sup> , % от навески	7	8	40	50	50	30	30
Моносахаридный состав <sup>3</sup>	Glc/Mn	Glc/Mn	Glc/Mn	Mn	Glc/Mn	Glc/Mn	н о
	Полифенолы <sup>4</sup>	++	+	-	-	+	-

Анализ фракций проводили <sup>1</sup>- по Лоури <sup>2</sup>- фенолсерноокислотным методом, <sup>3</sup>- после гидролиза 2М HCl (2 ч) на углеводном анализаторе "Biotronik", <sup>4</sup>-реакцией с хлоридом железа (III)

Углеводная компонента идентифицирована как смесь 1,3,1,6-β-D-глюкоолигосахаридов, так как в <sup>13</sup>C-ЯМР-спектрах фракции ФV присутствовали также сигналы, характерные для этих олигосахаридов 103-104 мд (C1), 85-87 мд (C3, β-1,3), 68 5 мд (C4, β-1,3), 69 5 мд (C6, β-1,6), 61-62 мд (свободные C6 атомы) Полифенолы были обнаружены качественной реакцией с хлоридом железа (III) Кроме этого в <sup>13</sup>C-ЯМР

спектре фракции ФV присутствовали сигналы, характерные для полифенолов - 157 2, 152 9, 151 3 мд (рис 8)

### ВЫВОДЫ

1 Впервые в свежесобранной *L. japonica* первого года жизни, обнаружен ингибитор 1,3-β-D-глюканазы - фермента пищеварительного тракта морского ежа В процессе старения и разрушения водоросли в ней накапливаются вещества – активаторы этого фермента

2 В результате деления веществ водно-этанольного экстракта свежесобранной *L. japonica* первого года жизни, содержащего ингибитор, получена фракция, ингибирующая 1,3-β-D-глюканазу Фракция состоит из углеводов и полифенолов Индивидуальные вещества, входящие в состав *L. japonica* маннит, глутаминовая кислота, флоротанин и альгиновая кислота не оказывали действия на этот фермент Три основных гликолипида водоросли сульфохиновозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин и моногалактозилдиацилглицерин увеличивали активность пищеварительного фермента морского ежа от 1,3 до 2,8 раз

3 Установлено, что в процессе старения и разрушения *L. japonica* увеличивается общее количество растворяющихся в водном этаноле углеводов в 1,5 раза, маннита - в 1,2 раза, и, напротив, содержание глутаминовой кислоты уменьшается в 5 раз, белка - в 2 раза, полифенолов - в 3 раза Фукоидан, выделенный из разрушенной при хранении на берегу *L. japonica*, практически несультатирован и более гетерогенен по моносахаридному составу, чем фукоидан, выделенный из свежесобранной водоросли

4 Обнаружено, что экстрактивные вещества из свежесобранной *L. japonica* первого года жизни угнетающе действуют на сперматозоиды, понижая их оплодотворяющую способность до 50% Вещества водно-этанольных экстрактов *L. japonica* второго года жизни и *L. japonica*, разрушенной при хранении на берегу, практически не оказывают действия ни на сперму, ни на яйцеклетки *S. intermedius*

5 Показано, что по отношению к эмбрионам морского ежа наиболее токсичны экстрактивные вещества из свежесобранной *L. japonica* первого года жизни, добавленные как на стадии зиготы, так и на стадии поздней бластулы Вещества свежесобранной *L. japonica* второго года жизни и *L. japonica*, разрушенной при хранении на берегу, напротив, проявляли стимулирующий эффект, увеличивая продолжительность жизни эмбрионов морского ежа

6 Из пластин съеденной ламинарии морской еж полностью усваивает маннит, аминокислоты, однако не усваивает фукоидан

7 Установлено, что в процессе сосуществования морской еж и ламинария выработали целый ряд реакций на трофическом и репродуктивном уровнях, позволяющих выживать обоим видам *L. japonica* первого года жизни синтезирует вещества, ингибирующие как пищеварительные, так и репродуктивные функции морского ежа В

разрушающихся водорослях, наоборот, накапливаются вещества, стимулирующие оба эти процесса

8 Показано, что выявленные закономерности взаимодействия *S. intermedius* и *L. japonica* могут быть использованы в разработке биотехнологии подкормки морского ежа

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах

1 Ермакова С П, Бурцева Ю В, Сова В В, Крачун (Агаркова) В В., Звягинцева Т Н Белки бурых водорослей - ингибиторы эндо-1→3-β-D-глюканаза морских беспозвоночных // Биохимия 2001 Т 66 вып 2 С 234-241

2 Agarkova V.V, Krupnova T N, Ermakova S P, Shevchenko N M, Zvyagintseva T N The action of *Laminaria japonica* extractives on 1,3-D-glucanase, a digestive enzyme of the *Strongylocentrotus intermedius* sea urchin // Applied Biochemistry and Microbiology 2007 Vol 43 № 4 P 511-517

Работы, опубликованные в материалах региональных и международных конференций, симпозиумов

3 Крачун (Агаркова) В.В., Веригина Н С 1→3-β-глюканаза морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Сб тез докл Региональной конференции по фундаментальным исследованиям морской биоты (Биология, Химия и Биотехнология) Владивосток, 2002 С 132

4 Krupnova T, Pavlychkov V, Agarkova V. Biotic relationships of brown alga *Laminaria japonica* and sea urchins *Strongylocentrotus intermedius* // Abstract of the XVIII International Seaweed Symposium, Norway, 2004 P 238

5. Kratchun (Agarkova) V, Krupnova T., Schevchenko N, Zvyagintseva T Effect of the extracts and some substances from brown seaweed *Laminaria japonica* on digestive enzymes of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // Abstract of the XVIII International Seaweed Symposium, Norway, 2004 P 219

6. Krupnova T, Pavlychkov V, Agarkova V Adaptation mechanisms of gray sea urchins and *Laminaria* coexistence // Abstract of the PICES, Vladivostok, 2005 P 171-172

7 Krupnova T, Pavlychkov V, Agarkova V Consumption of kelp forest by sea urchins along Primorye coast (the sea of Japan) // Abstract of the Fourth Asian - Pacific Phycological Forum, Bangkok, Thailand 2005 P 206

8 Агаркова В.В., Крупнова Т Н, Звягинцева Т.Н Экстрактивные вещества бурой водоросли *Laminaria japonica* и их действие на эндо-1→3-β-D-глюканазу серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Сборник статей II Международной конференции "Морские прибрежные экосистемы водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки" М Изд-во ВНИРО 2005 С 242-244

Агаркова Вера Валерьевна

**Биохимические основы биотических взаимоотношений  
серого морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и бурой водоросли *Laminaria japonica***

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано в печать «5» сентября 2007 г Формат 60x84/16 Тираж 100 экз  
Усл печ л 1 25 Заказ № 14515

Отпечатано в Типографии «Краски»

690048, г Владивосток, пр-т 100-летия, 43, тел 36-26-16, 55-95-31 www.krasku.com