

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи



Тхан Тайк

**Физико-химические свойства и
антиокислительная активность каротиноидов
и хлорофиллов из морских водорослей**

02.00.04 – физическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата

химических наук

Научный руководитель
Ревина Александра Анатольевна
доктор химических наук, профессор

Москва – 2017

Содержание

Введение.....	8
Глава I. Литературный обзор	14
1.1. Химический состав водорослей.....	14
1.2. Физико-химические свойства каротиноидов, хлорофиллов, полисахаридов, маннита, выделенных из водорослей	16
1.2.1. Каротиноиды	16
1.2.2. Хлорофиллы	21
1.2.3. Полисахариды.....	27
1.2.4. Маннит	30
1.3. Физико-химические подходы при разработке эффективных методов культивирования морских водорослей	32
1.4. Физико-химические проблемы стерилизации водорослей.....	33
1.5. Физико-химические методы для установления механизма окислительно- восстановительных (redox) реакций различных соединений при воздействии ионизирующего излучения	34
1.5.1. Оптические методы изучения свойств промежуточных частиц, возникающих при радиолизе водных и водно-органических растворов	34
1.5.2. Методы спектрофотометрии в исследованиях радиационной чувствительности экстрактов водорослей.....	38
Глава II. Экспериментальная часть	42
2.1. Исходные материалы и их квалификация	42

2.2. Получение экстрактов из водорослей	44
2.3. Экспериментальные методы физико-химических исследований	44
2.3.1. Метод UV-VIS спектрофотометрии.....	44
2.3.2. Разделение экстрактов методом тонкослойной хроматографии	46
2.3.3. Метод стационарного радиолiza при использовании гамма- излучения ^{60}Co РХМ- γ -20.....	47
2.3.4. Исследование механизма окислительно-восстановительных реакций в растворах экстрактов водорослей при облучении	48
Глава III. Экспериментальные результаты и их обсуждение	49
3.1. Эффективность экстракции биологически активных соединений из водорослей <i>Jenit-M</i> и <i>Jemo-D</i>	49
3.1.1. Спектры оптического поглощения органических и водно- органических экстрактов водорослей <i>Jenit-M</i> и <i>Jemo-D</i>	49
3.1.2. Влияние разбавления на спектральные характеристики спиртовых и ацетоновых экстрактов <i>Jenit-M</i>	51
3.1.3. Спектральные характеристики оптического поглощения спиртовых и ацетоновых экстрактов водорослей <i>Jemo-D</i> при различных разбавлениях.....	53
3.1.4. Сравнение эффективности экстракции каротиноидных и хлорофилловых фракций из водорослей разных видов	55
3.2. Спектры оптического поглощения каротиноидных и хлорофилловых фракций в водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактах водорослей	56

3.2.1. Влияние разбавления на оптическое поглощение водно-спиртовых экстрактов водорослей <i>Jenit-M</i> и <i>Jemo-D</i>	56
3.2.2. Влияние разбавления на оптические свойства водно-ацетоновых экстрактов водорослей <i>Jenit-M</i> и <i>Jemo-D</i>	58
3.2.3. Влияние разбавления на спектры оптического поглощения водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов <i>Cylindrotheca Closterium</i>	59
3.3. Влияние облучения водорослей <i>Laminaria japonica</i> и <i>Cylindrotheca Closterium</i> в сухом виде на процесс экстракции биологически активных соединений.....	61
3.3.1. Оптические свойства водно-спиртовых экстрактов <i>Laminaria japonica Jenit</i> и <i>Jemo</i> , облученных в сухом виде при дозе 15 ÷ 22 кГр..	61
3.3.2. Оптические свойства этанольных экстрактов водорослей <i>Cylindrotheca Closterium</i> , облученных в сухом виде при дозе 15 ÷ 22 кГр	64
3.4. Моделирование окислительно-восстановительных реакций в растворах водно-органических экстрактов водорослей за счет изменения условий облучения: аэробных, анаэробных и в присутствии закиси азота	65
3.4.1. Изменения спектров оптического поглощения водно-этанольных экстрактов водорослей <i>Jenit-M</i>	65
3.4.2. Изменения спектров поглощения водно-этанольных экстрактов водорослей <i>Jemo - D</i>	67
3.5. Изменения спектров оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей после облучения при разных условиях	69
3.5.1. Спектры оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей <i>Jenit-M</i>	69

3.5.2. Спектры оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей <i>Jemo-D</i>	70
3.5.3. Влияние облучения на спектры водно-этанольных и водно-ацетоновых экстрактов водорослей <i>Cylindrotheca closterium</i>	72
3.6. Анализ спектральных характеристик различных растворов экстрактов водорослей в "пост радиационный период"	77
3.6.1. Изменение спектров поглощения водно-спиртовых экстрактов водорослей	77
3.6.2. Изменение спектров поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей в "пост радиационный период"	81
Глава IV. Исследование физико-химических свойств компонентов из бурых водорослей, выделенных методом тонкослойной хроматографии.....	86
4.1. Сравнение спектров оптического поглощения выделенных компонентов из водорослей <i>Jenit-M</i> , <i>Jemo-D</i> и <i>Cylindrotheca Closterium</i>	86
4.2. Оптические свойства и радиационная стабильность каротиноида фукоксантина, выделенного из морской диатомеи <i>Cylindrotheca Closterium</i>	89
4.2.1. Стабильность каротиноида фукоксантина при хранении микроводорослей <i>Cylindrotheca Closterium</i> в сухом виде	89
4.2.2. Спектрофотометрия водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей <i>Cylindrotheca Closterium</i> , облученных в аэробных условиях.....	91
4.2.3. Спектрофотометрия водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей <i>Cylindrotheca Closterium</i> , облученных в присутствии Ar и N ₂ O.....	94

4.2.4 Сравнение радиационной стабильности хлорофилловых фракций в ацетоновых экстрактах водорослей <i>Laminaria Japonica</i>	98
4.2.5. Спектрофотометрические исследования водно-спиртовых растворов фукоксантина.....	100
4.2.6. Радиационная стабильность водно-спиртового раствора фукоксантина при разных условиях γ -облучения	102
4.3. Сравнение стабильности водорослей в зависимости от времени хранения в сухом виде.....	104
4.3.1. Изменение оптических свойств экстрактов водорослей <i>Jenit-M</i> и <i>Jemo-D</i> в зависимости от времени хранения образцов в сухом виде	104
Выводы	110
Список использованной литературы.....	112
Список сокращений	123
Приложение 1	124
Морские бурые водоросли в природе и основные направления их использования.....	124
Приложение 2	130
Культивирование бурых морских водорослей.....	130
Приложение 3	138
Физико-химические подходы при разработке методов интенсивного использования бурых морских водорослей.....	138
1. Биологически активные соединения из водорослей в промышленности	138

2. Применение препаратов из водорослей в медицине	140
Список литературы приложения 1	145
Список литературы приложения 2	147
Список литературы приложения 3	148

Введение

Актуальность темы: Для широкого использования биологически активных соединений из морских водорослей и других морепродуктов нужны высокотехнологичные методы их *извлечения* с оптимальным содержанием [1-12]. Эффективное извлечение определенных пигментов и химических соединений из морекультур требует разработки способов и определению условий, что может быть реализовано лишь при использовании физико-химических подходов [13, 14]. Необходимость и целесообразность использования современных физико-химических методов для изучения оптических характеристик, антиокислительных и других важных свойств, функциональной активности биологически активных веществ из природного сырья, очевидна и поддерживается многими учеными нашей страны и ведущими учеными мира [14]. Физико-химические исследования необходимы при решении проблем сохранения сырья и вопросов стабильности фармпрепаратов на основе биологически активных веществ из водорослей и других морских организмов.

В настоящее время в нашей стране и в мировой практике широко применяется обработка сырья из морекультур и фармпрепаратов при использовании внешнего воздействия ионизирующего излучения [15]. Использование метода радиационной обработки сырья и препаратов требует обязательного применения современных физико-химических методов измерения энергии, поглощенной образцами, и определения радиационной стабильности выделенных биологически активных соединений из облученных образцов. Из-за отсутствия импульсных методов внешнего воздействия ионизирующего излучения и скоростной регистрации промежуточных короткоживущих частиц, образующихся в момент радиолиза, исследования превращений различных соединений проводят путём регистрации *в пострадиационный период* спектров оптического поглощения экстрактов из облученного сырья водорослей или облученных растворов индивидуальных

химических соединений. На основании этих данных делаются выводы о «допустимой дозе» облучения препаратов. Используя спектрофотометрические результаты регистрации изменений спектров оптического поглощения, БАС после внешнего воздействия ионизирующего излучения в зависимости от выбранных параметров и условий эксперимента делается заключение о механизме окислительно-восстановительных реакций с участием компонентов водорослей.

Для изучения стабильности и реакционной способности индивидуальных химических соединений проводится предварительное их выделение из экстрактов водорослей, очистка от примесей методом тонкослойной хроматографии и определение изменений их оптических свойств за счет участия в модельных окислительно-восстановительных реакциях.

Результаты фундаментальных исследований и теоретические представления о механизме радиационно-химических процессов генерации и превращений активных короткоживущих частиц в водных и водно-органических растворах, таких, как $e^-_{\text{гидр}}$, ($e^-_{\text{сольв}}$), H, OH радикалы, супероксид-анион O_2^- , и данных по константам реакций их взаимодействия с субстратом [А. К. Пикаев 1986 г.], позволяют проводить радиационно-химическое моделирование окислительно-восстановительных реакций. Для установления механизма сложных процессов в растворах экстрактов водорослей при заданных условиях эксперимента с участием БАС необходимо использовать современные физико-химические методы [16].

Цель работы: является установление механизма окислительно-восстановительных реакций в химических превращениях хлорофилловых и каротиноидных фракций из экстрактов макроводорослей *Jemo*, *Jenit* и микроводорослей *Cylindrotheka Closterium* при воздействия ионизирующего излучения.

Задачи исследования:

- получить спиртовые и ацетоновые экстракты БАС из культивируемых макроводорослей *Laminaria Japonica Jemo, Jenit* и микроводорослей *Cylindrotheka Closterium*;
- определить спектральные характеристики каротиноидной и хлорофилловой фракций в спиртовых и водно-спиртовых, ацетоновых и водно-ацетоновых экстрактах и их изменения в зависимости от времени хранения;
- на основании результатов сравнения спектров оптического поглощения спиртовых экстрактов из водорослей, облученных в сухом виде, и спектров экстрактов из необлученных образцов, определить условия стерилизации культивируемых водорослей.
- провести физико-химическими методами исследование механизма окислительно-восстановительных реакций каротиноидных и хлорофилловых фракций в составе спиртовых и ацетоновых экстрактов водорослей в зависимости от дозы облучения: в присутствии и в отсутствие кислорода (насыщение Ar или N₂O).
- исследовать редокс - превращения каротиноида фукоксантина, выделенного методом ТСХ из микроводорослей *Cylindrotheka Closterium*, при разных условиях гамма-облучения ⁶⁰Co.
- провести сравнения спектральных характеристик поглощения и люминесценции спиртовых растворов каротиноидных фракций, выделенных из экстрактов водорослей *Jemo* и *Jenit*, с оптическими свойствами спиртовых растворов монокристаллического фукоксантина.

Научная новизна и практическая значимость работы:

- ✓ впервые исследована радиационная чувствительность экстрактов водорослей *Cylindrotheka Closterium* и *Laminaria Japonica Jemo* и *Jenit* из облученных образцов в сухом виде для определения условий радиационной стерилизации;

- ✓ определены методом UV-VIS спектрофотометрии спектральные характеристики каротиноидных и хлорофилловых фракций в экстрактах водорослей и эффективность экстракции в различных растворителях;
- ✓ впервые для культивированных водорослей использован метод радиационно-химического моделирования редокс реакций в водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактах, что позволило выяснить влияние природы, различных условий радиолита на антиокислительные свойства и протекторную активность каротиноидных и хлорофилловых фракций;
- ✓ обнаружены концентрационные эффекты при разбавлении экстрактов, которые проявляются в нелинейной зависимости интенсивности оптического поглощения от коэффициента разбавления;
- ✓ впервые с помощью метода радиационно-химического моделирования реакций фукоксантина (*Cylindrotheka*) с промежуточными частицами радиолита растворителя в *аэробных* условиях дано объяснение аномально высокой стабильности пигмента за счет его частичной регенерации при участии молекулярного кислорода.

Практическая значимость работы состоит в том, что

1. Полученные результаты физико-химических исследований макро- и микроводорослей могут быть использованы для решения ряда прикладных задач в области химии растительного сырья, биотехнологии морекультуры, фитотерапии, радиобиологии - прогнозирования антиокислительной активности, протекторных свойств экстрактов и фармпрепаратов и совершенствования технологичных методов сохранения сырья.
2. Анализ результатов проведенных исследований химических превращений каротиноидной и хлорофилловой фракций в различных экстрактах водорослей *Laminaria japonica* Jemo (D) и *Jenit* (M) и *Cylindrotheca Closterium* при воздействии ионизирующего излучения показали возможность *управления* окислительно-восстановительными реакциями в этих системах за счёт внешнего воздействия, условий облучения, разных растворителей *при*

использовании разных методов сохранения сухого сырья и препаратов из водорослей.

Основные положения, выносимые на защиту

- Разработана технология выделения ценных биологически активных соединений - каротиноида фукоксантина и хлорофиллов из разных видов бурых макроводорослей *Jemo* (D) и *Jenit* (M), культивируемых в естественных водоёмах с пресной водой, и из бурых микроводорослей *Cylindrotheca Closterium*, выращенной в режиме накопительного культивирования в морской воде при использовании модифицированной питательной среды.
- Результаты спектрофотометрических исследований спиртовых экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* и макроводорослей *Laminaria Japonica*, облученных в сухом виде при дозах ~ 15÷22 кГр, показали высокую радиационную стабильность и подтвердили возможность применения радиационной стерилизации культивируемых водорослей.
- На основании результатов люминесцентного анализа каротиноидов выделенных методом ТСХ из экстрактов водорослей *Jenit* и *Jemo* (Мьянма), сделан вывод о том, что каротиноиды из этих водорослей по своим физико-химическим свойствам и активности близки фукоксантину из (*Cylindrotheca Closterium*) с аномально высокими антиокислительными свойствами.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в постановке основных задач исследования, в обосновании и выборе объектов, в проведении экспериментов, в интерпретации полученных результатов и подготовке публикаций.

Достоверность результатов работы: Достоверность полученных результатов была обеспечена применением аттестованных измерительных приборов, апробированных методик измерений и воспроизводимостью полученных результатов.

Апробация работы и публикации: Основные результаты работы представлены на следующих конференциях: на Международной конференции посвященной 85-летию Вилар (Москва - 23-24 апреля 2014 г); на конференции «Успехи в химии и химической технологии» (Москва-РХТУ-2014); на 2-й международной научно-практической конференции «Сопроводительная фитотерапия в онкологии» (Москва-23 мая 2015 г); на IV Международной конференции «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела». 21 сентября – 25 сентября 2015 г. Туапсе.

Публикации: по теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК.

Глава I. Литературный обзор

1.1. Химический состав водорослей

Морские водоросли богаты минеральными солями и микроэлементами: Fe, V, Zr, Nb, Mo, Co, Mg, Ca, Mn. Большое содержание йода. Основным структурным полисахаридом бурых морских водорослей является альгиновая кислота [17]. В бурых морских водорослях содержится полный набор минеральных веществ. В водорослях найдено более сорока макро- и микроэлементов (табл. 1.1) [18, 19].

Таблица 1.1. Содержание минеральных макро- и микроэлементов в сухом веществе бурых водорослей

Элементы	Содержание, %	Элементы	Содержание, %
Хлор	9,8-14,7	Натрий	3,6-3,8
Фосфор	0,31-0,55	Мышьяк	0,0007-0,005
Стронций	0,002-0,02	Ванадий	0,0016
Рубидий	$0,6-1 \times 10^{-4}$	Кадмий	$1,4 \times 10^{-5}$
Радий	$1-56 \times 10^{-11}$	Магний	1-2,01
Сера	0,7-1,9	Железо	0,09-0,19
Бром	0,034-0,13	Цинк	0,0018-0,0027
Алюминий	0,0058-0,0062	Никель	$0,2-8,3 \times 10^{-5}$
Молибден	$1,6-9,6 \times 10^{-5}$	Калий	6,4-7,8
Кальций	0,2-0,29	Марганец	0,0006-0,0015
Кобальт	$1,5 \times 10^{-4}$	Иод	0,16-0,8
Кремний	0,46-0,65	Бор	0,003-0,04
Титан	$5,4-6,0 \times 10^{-4}$		

Альгиновая кислота - это сополимер β -D маннуронозойной и α -L гулууронозойной кислот, не способный расщепляться и всасываться в желудочно-кишечном тракте человека. Очень важным свойством альгинатов (кальция и натрия) является их способность задерживать всасывание радиоактивного стронция, попадающего в кишечник, предотвращая, таким образом, его накопление в организме [17-21]. Альгинатные гели используют как средства для

иммобилизации клеток бактерий и дрожжей. В табл. 1.2 представлены данные по химическому составу ламинарии и фукуса.

Азотистые вещества в бурых морских водорослях представлены 17-ю аминокислотами, среди которых 7 аминокислот, являются незаменимыми для жизнеобеспечения человеческого организма.

Таблица 1.2. Общий химический состав и количественная характеристика бурых морских водорослей

Наименование веществ	содержание в % на сухое вещество	
	ламинарии	фукусы
Альгиновая кислота	15,0-32,6	9,1 - 28,0
Азотистые вещества	6,8 - 15,5	4,6-5,9
Водорослевый крахмал (ламинаран)	8,5 -19,6	до 8,5
Целлюлоза (альгулеза)	5,7-6,2	5,7 - 7,4
Маннит	3,7-28,9	до 2,5
Пентозаны	6,5-10,6	20,5-29,0
Растворимые в эфире вещества	0,3-1,6	0,5-2,2

В процессе обработки ламинарии происходит освобождение альгиновой кислоты, которая и определяет основные свойства гелей из бурых морских водорослей. Альгинаты обладают высокой хилатирующей способностью по отношению к ионам тяжелых и радиоактивных металлов и антиокислительной активностью. Методом радиационно-химического моделирования важных окислительно-восстановительных реакций в растворах альгиновой кислоты из разных источников доказано, что это соединение является активным ингибитором радикалов ОН, обладающих высоким окислительным потенциалом [17].

По своему значению, биологической активности и возможному применению в качестве природных пигментов в фармакопии, каротиноиды являются одним из важных компонентов бурых водорослей [22, 23].

1.2. Физико-химические свойства каротиноидов, хлорофиллов, полисахаридов, маннита, выделенных из водорослей

1.2.1. Каротиноиды

Каротиноиды (от лат. *carota* - морковь и греч. *eidos* - вид) - желто-оранжевые пигменты, которые синтезируются высшими растениями, а также грибами, бактериями, водорослями. Каротиноиды обеспечивают красную, желтую и пурпурную окраску плодов и цветов. Каротиноиды являются полиненасыщенными соединениями терпенового ряда, которые содержат в молекуле 40 углеродных атомов. Для выделения каротиноидов из растений используют различные органические растворители с последующим разделением методом хроматографии.

Среди каротиноидов самое широкое применение имеют альфа -, бета -, гамма-каротины [23-29]. Данные изомеры отличаются строением циклогексановых колец и биологической активностью. Все каротины не растворимы в воде и растворяются только в органических растворителях - бензоле, хлороформе, эфире, жирах и маслах.

Эти соединения легко окисляются кислородом воздуха, нестойкие при нагревании, в присутствии кислот и щелочей, разрушаются под действием света. Однако, работы известных советских биохимиков показали, что в бурых водорослях содержатся каротиноиды, которые устойчивы к свету, стабильны в атмосфере кислорода, растворяются в спиртовых растворах, это *ксантофиллы*, молекулы которых в своей структуре содержат атомы кислорода, к ним относится и фукоксантин из бурых водорослей *Cystoseira* [30-33]. На рис. 1.1 представлены структурные формулы каротиноидов: β - каротина, лютеина, виолаксантина и фукоксантина.

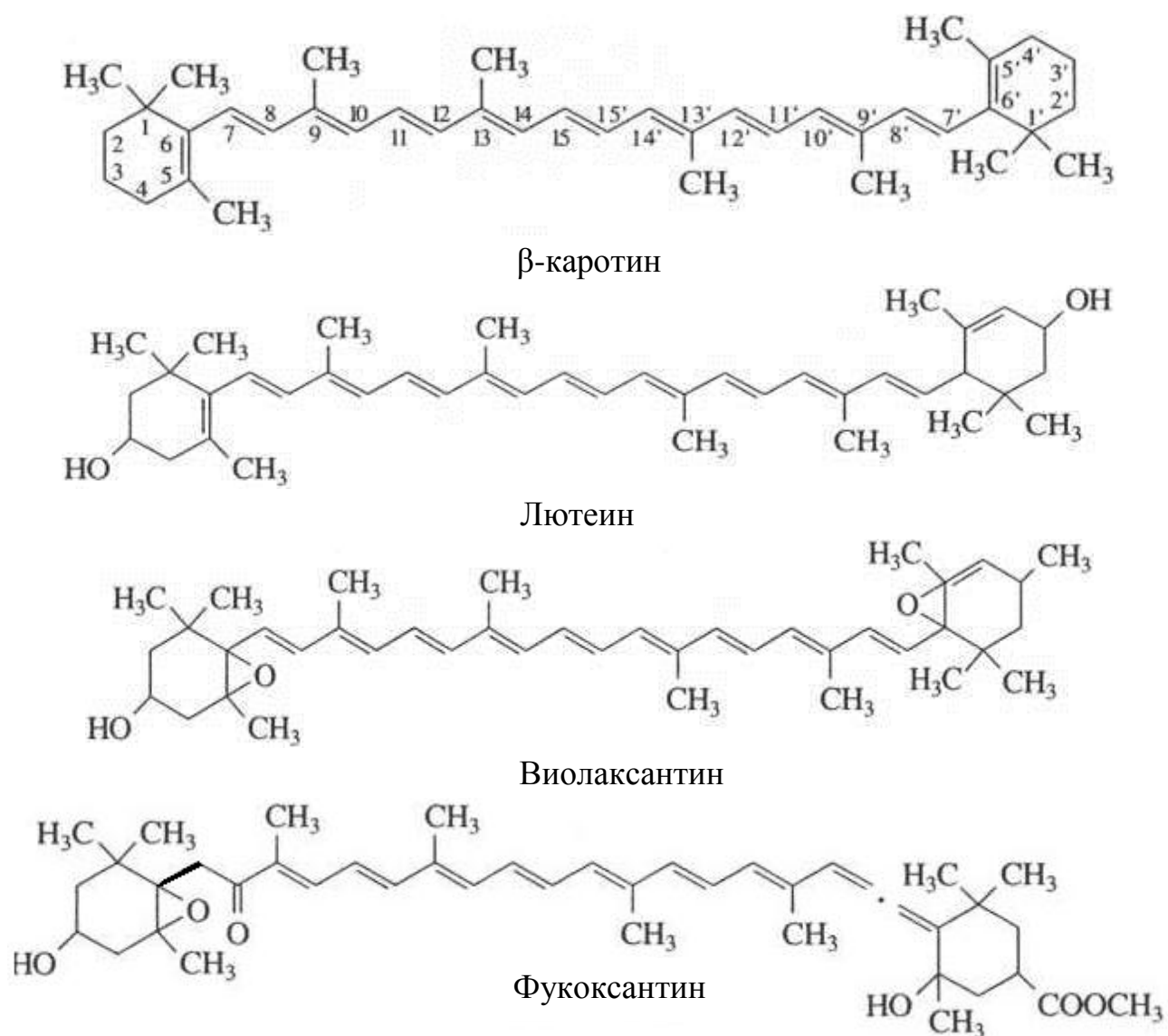


Рисунок 1.1. Структурные формулы каротиноидов [33]

Каротиноиды ксантофиллы, как виолаксантин и фукоксантин, имеющие в своей структуре атомы кислорода, от других каротиноидов резко отличаются высокой стабильностью. На рис. 1.2 представлены результаты исследования изменений спектров оптического поглощения некоторых растворов каротиноидов в присутствии кислорода воздуха в зависимости от времени хранения растворов, на основании которых был сделан вывод о высокой стабильности ксантофиллов. Анализ этих результатов (при сравнении спектров 1 и 4, рис. 1.2) показывает, что самым стабильным каротиноидом является фукоксантин, поскольку ни форма, ни интенсивность спектра его раствора после 30-суточного хранения на воздухе - не изменились.

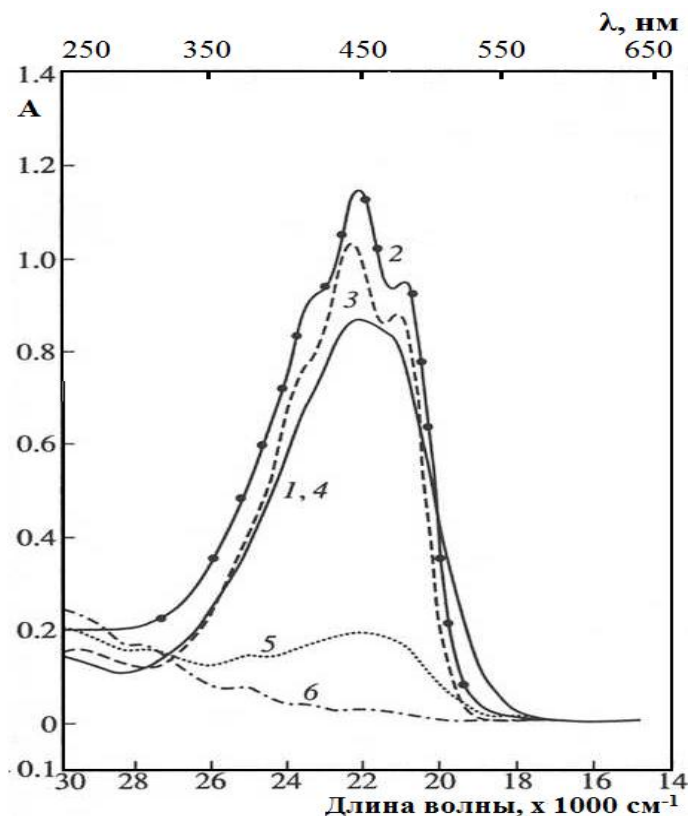


Рисунок 1.2. Спектры поглощения свежеприготовленных растворов фукоксантина, зеаксантина (в этаноле) и β -каротина (в гексане) (1-3) и после 30-суточного хранения на воздухе при 8°C (4-6)

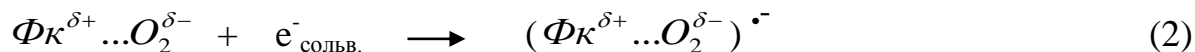
Особое внимание в работе Прохоровой Л.И. и Ревинной А.А. [33-35] было уделено изучению начальных стадий *активирования* молекулярного кислорода, благодаря образованию лабильных обратимых оксокомплексов каротиноидов в аэробной среде. Изучению лабильных обратимых оксокомплексов каротиноидов необходимо для уточнения вероятности формирования и понимания роли оксокомплексов в процессах, где они отвечают за радиационно-химическую стабильность, способность каротиноидов уменьшать концентрацию наиболее активных форм кислорода, таких как супероксид анион-радикал, $\text{O}_2^{\bullet -}$, и синглетный кислород, $^1\text{O}_2^*$. Наиболее важные функции каротиноидов связаны с их участием в окислительном метаболизме живых организмов в аэробных условиях. Изучение кинетики окислительно-восстановительных процессов в аэробных условиях играют важную роль в определении механизма элементарных стадий реакций взаимодействия молекул

каротиноидов с кислородом в различных формах, таких как молекулярный кислород, супероксид анион-радикал, синглетный кислород, соответственно O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $^1O_2^*$, что определяет антиокислительные свойства природных пигментов.

В работе [34, 35] были исследованы антиокислительные свойства каротиноидов различного строения (β -каротин, фукоксантин, лютеин, виолоксантин) в разных растворителях и зарегистрировано образование лабильных оксокомплексов O_2 с каротиноидами. При сравнении оптических спектров поглощения растворов каротиноидов в УФ и видимом диапазоне в аэробных и анаэробных условиях, было сделано заключение о высокой способности молекул каротиноидов взаимодействовать с молекулярным O_2 с образованием *обратимого* комплекса с частичным переносом заряда, $Car^{\delta+} \dots O_2^{\delta-}$:



На рис. 1.3 представлены спектры растворов фукоксантина из водорослей *Cystoseira* в различных растворителях в присутствии и в отсутствие кислорода. В спектрах оптического поглощения спиртовых растворов в УФ-области спектра отчетливо проявляется полоса поглощения обратимого комплекса Фк с кислородом, $Фк^{\delta+} \dots O_2^{\delta-}$ (рис. 1.3-а), а при взаимодействии с $e^-_{\text{сольв.}}$ образуется анион-радикал оксокомплекса - $(Фк^{\delta+} \dots O_2^{\delta-})^{\bullet-}$:



Следует обратить особое внимание на результаты спектрофотометрических измерений влияния кислорода на спектры растворителя, *этанола* (рис. 1.3 -а) [36]. Полученные данные позволили сделать важный вывод о формировании комплекса с частичным переносом заряда между молекулами спирта и кислорода. Эти данные позволили авторам работы объяснить возможность фотолитического разложения спирта при $\lambda >$

230 нм, т. е. при возбуждении светом за полосой поглощения спирта ($\lambda \sim 185$ нм).

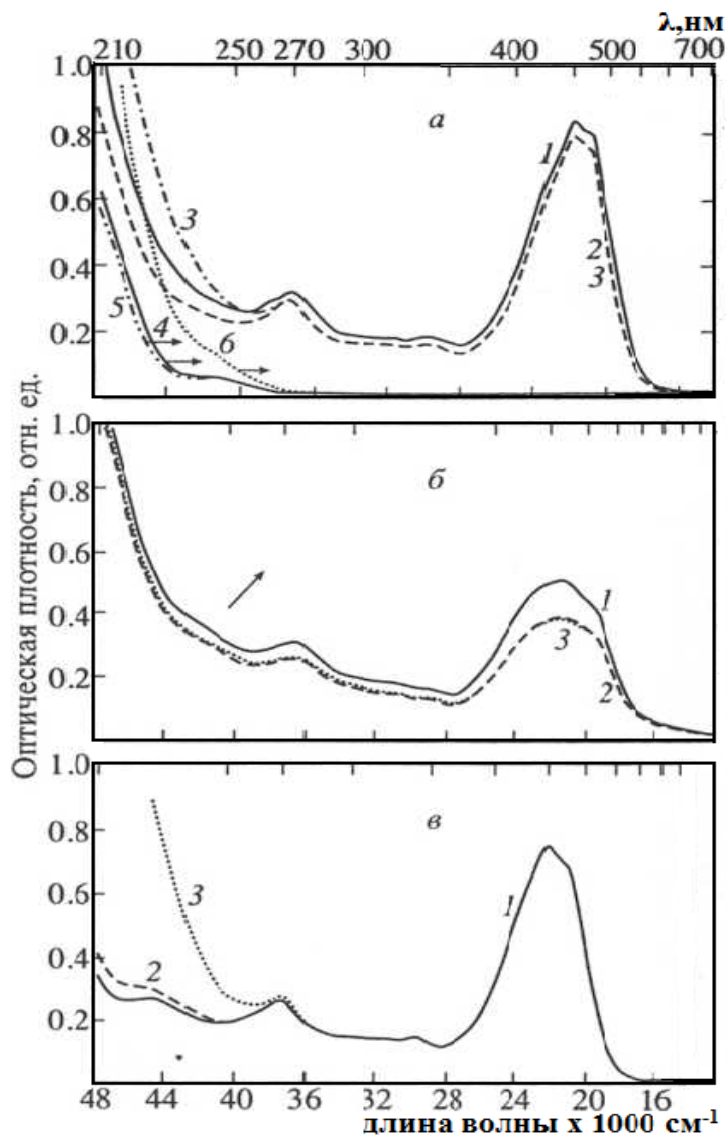


Рисунок 1.3. Спектры оптического поглощения этанольных растворов фукоксантина и чистого этанола в зависимости от присутствия кислорода. По оси абсцисс - длина волны в нанометрах (нм) по верхней оси и в обратных сантиметрах ($\times 1000 \text{ см}^{-1}$) по нижней оси. По оси ординат - оптическая плотность, *a* - спектры поглощения растворов Фк в этаноле (1-3) и чистого спирта (4-6), на воздухе (1,4); в присутствии He (2,5) и после контакта с кислородом после насыщения гелием раствора (3,6); *б* - спектры поглощения Фк в фосфатном буфере (рН 7.5): на воздухе (1); после вытеснения O_2 гелием (2); после контакта раствора с O_2 (3); *в* - спектры поглощения этанольных

растворов в Фк: в вакууме (1); после контакта с воздухом (2); после контакта с кислородом (3)

В работах Бучаченко Л.П. и Покровской М.Ю.[37] представлены результаты, подтверждающие формирование лабильных оксокомплексов кислорода с неполярными молекулами углеводородов, полосы поглощения которых имеют в аэробных условиях батохромный сдвиг:



На ранних стадиях взаимодействия кислорода с молекулами неполярных растворителей в спектрах оптического поглощения их растворов зарегистрированы полосы поглощения лабильных оксокомплексов, определяющих направление редокс-реакций с участием многих антиокислителей и радиопротекторов в модельных системах [38]. Результаты этих исследований на основе экспериментально доказанного формирования и стабилизации оксокомплексов с частичным переносом заряда со многими органическими молекулами являются современным развитием теории медленного (перекисного) окисления известного советского биохимика А.Н. Баха (1897 г.) и его представлений о *ранних стадиях активирования молекулярного кислорода* биологически активными молекулами [39, 40]. Благодаря скоростной регистрации оптического поглощения короткоживущих продуктов радиолиза Фк в присутствии O_2 была зарегистрирована полоса оптического поглощения анион-радикала комплекса – с частичным переносом заряда $(\text{Фк}^{+\delta} \dots \text{O}_2^{-\delta})^-$ с $\lambda_{\text{макс}} \sim 280$ нм, по сравнению с максимумом поглощения супероксид иона, $(\text{O}_2^{\cdot-})$ при $\lambda_{\text{макс}} \sim 250$ нм [33], который образуется при взаимодействии оксокомплекса Фк $(\text{Фк}^{+\delta} \dots \text{O}_2^{-\delta})$ с электроном.

1.2.2. Хлорофиллы

Хлорофиллы (от греч. «зелёный» и «лист») - зелёные пигменты, производные порфирина, окрашивающие хлоропласты самых различных

растений и водорослей в зелёный цвет. При их участии осуществляется процесс фотосинтеза. По химическому строению хлорофиллы - магниевые комплексы различных тетрапирролов. По своему химическому строению хлорофилл близок к пигменту крови человека - гемоглобину (рис. 1.4) [41]. Хлорофилл - сложный эфир дикарбоновой кислоты, хлорофиллина, у которого одна карбоксильная группа этерифицирована остатком метилового спирта, а другая остатком одноатомного непредельного спирта фитола. Структурные формулы хлорофилла *a* и хлорофилла *b* представлено на рис. 1.4.

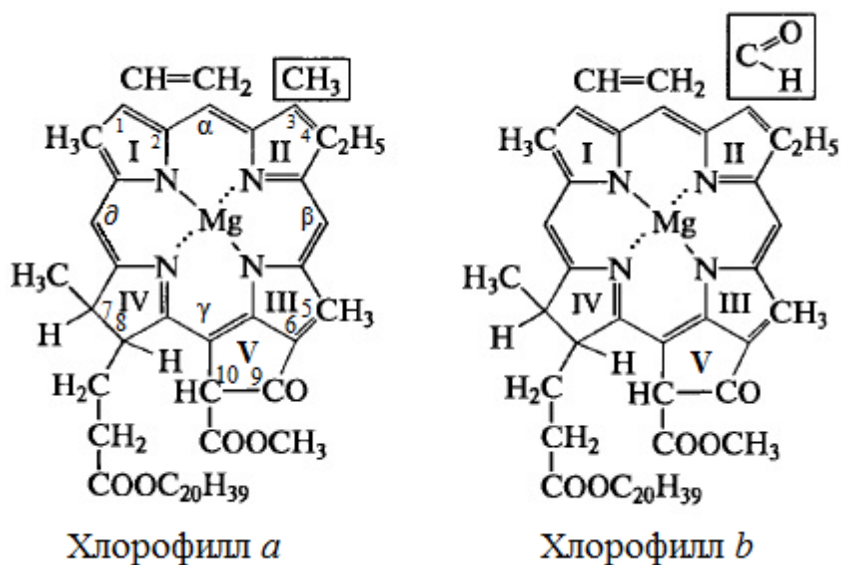


Рисунок 1.4. Структурные формулы хлорофилла *a* и хлорофилла *b*

Четыре пиррольных кольца (I - IV) соединены между собой метановыми мостиками, образуя порфириновое ядро. Наружные атомы углерода в тетрапиррольном цикле обозначены цифрами 1 - 10. Атомы азота пиррольных колец четырьмя «координационными» связями взаимодействуют с атомом магния. В структуре порфиринового ядра есть также кольцо(V), образованное остатком кетопропионовой кислоты и содержащее химически активную карбонильную группу у C₉ и метилированную карбоксильную группу у C₁₀. Структура, состоящая из тетрапиррольного и циклопентанового колец, получила название форбина. Боковая цепь IV пиррольного кольца включает в себя пропионовую кислоту, связанную сложно эфирной связью с полиизопреновым непредельным спиртом фитолом (C₂₀H₃₉OH). У углеродов C₁, C₃,

C₅ и C₈-го пиррольных колец имеются метильные группы, у C₂ - винильная, у C₄ - этильная группа. Порфириновое кольцо представляет собой систему из девяти пар конъюгированных (сопряженных) чередующихся двойных и одинарных связей с 18 делокализованными p-электронами. *Хлорофилл b* отличается от *хлорофилла a* тем, что у 3-го углерода вместо метильной находится формильная (-CHO) группа. Структура хлорофилла, лишенная фитола, называется хлорофиллидом. При замещении в молекуле хлорофиллов атома магния протонами образуются соответствующие феофетины.

У высших растений и водорослей обнаружены хлорофиллы a, b, c, d. Все фотосинтезирующие растения, включая все группы водорослей, а также цианобактерии, содержат хлорофиллы a. Хлорофилл b представлен у высших растений, у зеленых водорослей и эвгленовых. У бурых и диатомовых водорослей вместо хлорофилла b присутствует хлорофилл c, а у многих красных водорослей – хлорофилл d. В некоторых фотосинтезирующих бактериях, в которых происходит фотовосстановление, найдены различные бактериохлорофиллы [42-44].

Функциональное значение хлорофилла заключается в следующем: сопряженные двойные связи ответственны за избирательное поглощение световой энергии; центральный атом магния стабилизирует структуру молекулы, участвует в образовании ассоциатов молекулы хлорофилла с другими пигментами, белками, липидами, фосфолипидами и другими компонентами хлоропласта; фитол способствует определенной ориентации молекул хлорофилла в мембране. Молекула фитола не участвует в поглощении света, но косвенно влияет на этот процесс, меняя ориентацию порфиринового ядра хлорофилла.

В твердом виде *хлорофилл a* представляет собой аморфное вещество сине-черного цвета. Температура плавления хлорофилла a лежит в интервале 117 - 120 °С. Хлорофиллы хорошо растворимы в этиловом эфире, бензоле, хлороформе, ацетоне, этиловом спирте, плохо растворимы в петролейном эфире и нерастворимы в воде. Раствор *хлорофилла a* в этиловом эфире имеет

сине-зеленый цвет, *хлорофилла b* желто-зеленый. Резко выраженные максимумы поглощения хлорофиллов в красной и синей областях спектра представлены на рис. 1.5 [43].



Рисунок 1.5. Спектры поглощения пигментов пластиид [43]

В растворах этилового эфира максимумы поглощения хлорофиллов группы *a* регистрируются в красной области спектра - в пределах $\lambda \sim 660 \div 663$ нм и в синей области $\lambda \sim 428 \div 430$ нм, хлорофилла *b*, соответственно, в пределах $\lambda \sim 642 \div 644$ нм и $\lambda \sim 452 \div 455$ нм. Хлорофиллы очень слабо поглощают оранжевый и желтый свет и совсем не поглощают зеленые и инфракрасные лучи. Поглощение в сине - фиолетовой части спектра обусловлено системой конъюгированных одинарных и двойных связей порфиринового кольца молекулы хлорофилла. Интенсивная полоса поглощения в красной области связана с гидрированием двойной связи у $C_7 - C_8$ в пиррольном ядре IV (при переходе от протохлорофиллида к хлорофиллиду) и присутствием магния в порфириновом кольце. Эти же условия способствуют снижению поглощения в желтой и зеленой частях спектра. Замещение магния протонами при обработке хлорофилла кислотой приводит к образованию

феофетина, имеющего буро-зеленый цвет и ослабленное поглощение в красной области спектра. Удаление остатков фитола и метилового спирта путем щелочного гидролиза мало сказывается на спектре поглощения хлорофилла. У хлорофиллина те же спектральные свойства, что и у хлорофилла: он имеет максимумы поглощения в красной и синей области спектра. На положение максимумов в спектрах поглощения оказывают влияние природа растворителя и взаимодействие молекул хлорофилла друг с другом, а также с другими пигментами, липидами и белками. Фикобилины, пигменты красных водорослей и цианобактерий: фикоэритрины - красные, фикоцианины - синие [44, 45]. У агрегированных молекул хлорофилла (например, в твердых пленках и у хлорофилла, находящегося в хлоропластах) *красный* максимум полосы поглощения сдвинут в более длинную волновую область - до 680 нм.

Растворы хлорофиллов в полярных растворителях имеют яркое свечение *флуоресценцию* (люминесценцию). В растворе этилового эфира хлорофилла *a* наблюдается рубиново-красная флуоресценция с $\lambda_{\text{макс.}}$ при 668 нм, у хлорофилла *b* - $\lambda_{\text{макс.}} = 648$ нм, т. е. максимумы флуоресценции в соответствии с правилом Стокса несколько сдвинуты в более длинноволновую часть спектра по отношению к $\lambda_{\text{макс.}}$ поглощения. Агрегированный хлорофилл и хлорофилл в нативном состоянии (в живом листе) флуоресцируют слабо. При исследовании оптических свойств растворов хлорофиллов обнаружено длительное послесвечение (фосфоресценция), максимум полосы которого лежит в ИК- области [43].

Хлорофилл *a*, присутствующий в клетках красных водорослей, имеет максимум поглощения при $\lambda \sim 664$ нм [43] и характеризуется чувствительностью к воздействию различных физических и химических факторов, в том числе повышенной температуры и света [41-43]. Производные хлорофилла в медицине широко используются в виде препаратов для фотодинамической терапии рака [46, 47] и с большой перспективой применения в качестве активных добавок в фотокатализе и фотовольтаике [48].

В литературе описано бактерицидное и антиоксидантное действие хлорофилла [43], которое определяет его применение в технике. Хлорофилл и композиты на его основе используется для окраски продуктов пищевой промышленности, при создании косметических средств и в других целях. В Японии хлорофиллы используют для подкрашивания продуктов из рыбы некоторых кулинарных изделий. В Европе хлорофилл применяется для подкрашивания масел, жиров, ароматических эссенций. Для выделения хлорофилла используют метод спиртовой экстракции, для идентификации полученного соединения в экстракте применяют метод спектрофотометрии.

Структура молекулы хлорофилла, отобранная в процессе эволюции из многих других органических пигментов, прекрасно приспособлена к своим функциям сенсibilизатора фотохимических реакций. В состав молекулы входят 18 делокализованных π -электронов (представленных структурной формулой хлорофилла в виде 18-членного кольца из конъюгированных двойных связей), что делает молекулу хлорофилла легко возбуждаемой при поглощении квантов света. Ещё академиком К.А. Тимирязевым было сделано предположение о том, что хлорофилл способен к окислительно-восстановительному превращению. Впервые реакция фотовосстановления хлорофилла была осуществлена А. А. Красновским (1948 г.) в модельных биохимических опытах [43]. Хлорофилл, растворенный в пиридине, в анаэробных условиях под действием света восстанавливался аскорбиновой кислотой или другими донорами электронов. При этом образуется восстановленная («красная») форма хлорофилла с максимумом поглощения при $\lambda=525$ нм. После выключения света реакция идет в обратном направлении. Фотовосстановленный хлорофилл, в свою очередь, может восстанавливать различные акцепторы электронов. В той же модельной системе, но с добавлением акцептора электронов хлорофилл при освещении действует как *сенсibilизатор*. В этих условиях происходит восстановление рибофлавина, хинона, ионов Fe^{3+} , кислорода. Таким образом, молекула хлорофилла может выступать не только в роли первичного акцептора электрона, но и в роли его

первичного донора. Из всего сказанного следует, что молекула хлорофилла благодаря структурным и физико-химическим свойствам способна выполнять три важнейшие функции: 1) избирательно поглощать энергию света, 2) запасать ее в виде энергии электронного возбуждения, 3) фотохимически преобразовывать энергию возбужденного состояния в химическую энергию первичных фотовосстановленных и фотоокисленных соединений [43- 45].

Для выделения *фикобилипротеинов* был использован метод, предложенный F. W. J. Teale и R. E. Daled (Бирмингемский университет). При идентификации фикобилипротеинов спектрофотометрическим методом авторами работы [49] был зарегистрирован сложный спектр с $\lambda_{\text{макс}}$ поглощения фикоцианина при длине волны ~ 620 нм, фикоэритрина при $\lambda \sim 565$ нм и аллофикоцианина при $\lambda \sim 654$ нм.

1.2.3. Полисахариды

Основным структурным полисахаридом бурых морских водорослей является альгиновая кислота [50, 51]. Это сополимер β -D маннуроновой и α -L гулууроновой кислот, который не способен расщепляться и всасываться в желудочно-кишечном тракте человека [52-56]. Очень важным свойством альгинатов (кальция и натрия) является их хилатирующая способность, что мешает всасыванию радиоактивного стронция в кишечнике и таким образом предотвращает его накопление в организме [57]. Альгинатные гели широко используют как средства для иммобилизации клеток бактерий и дрожжей [58]. Основой клеточных стенок бурых водорослей являются сульфатированные полисахариды - агары и каррагинаны. В основе их структуры лежит повторяющееся дисахаридное звено, состоящее из остатков D-галактозы и ее производных, соединенных регулярно чередующимися β -(1 \rightarrow 4) и α -(1 \rightarrow 3) гликозидными связями. Большое структурное разнообразие данных полисахаридов обусловлено тем, что 4-O-замещенный моносахаридный остаток может быть представлен как галактозой, так и ее 3,6-ангидропроизводным. Если 1,4-связанные остатки 3,6-ангидропроизводного находятся в L-форме, то

полисахариды относятся к группе агара, как представлено на (рис. 1.6). В каррагинанах 1,4-связанные остатки 3,6-ангидрогалактозы имеют D-конфигурацию [59, 60].

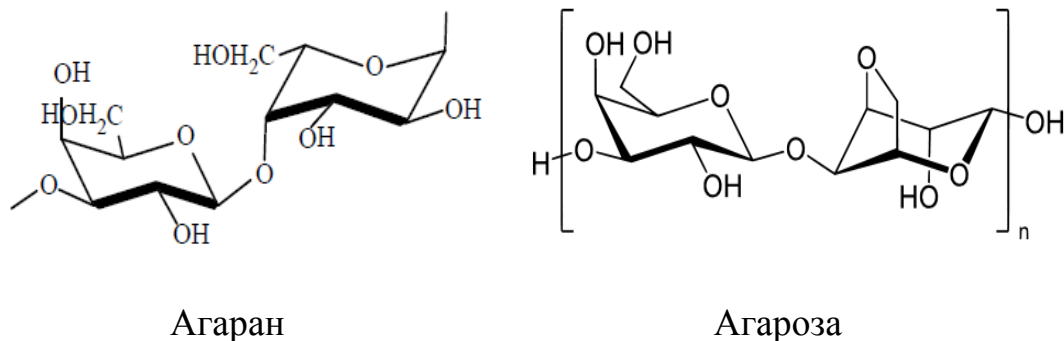
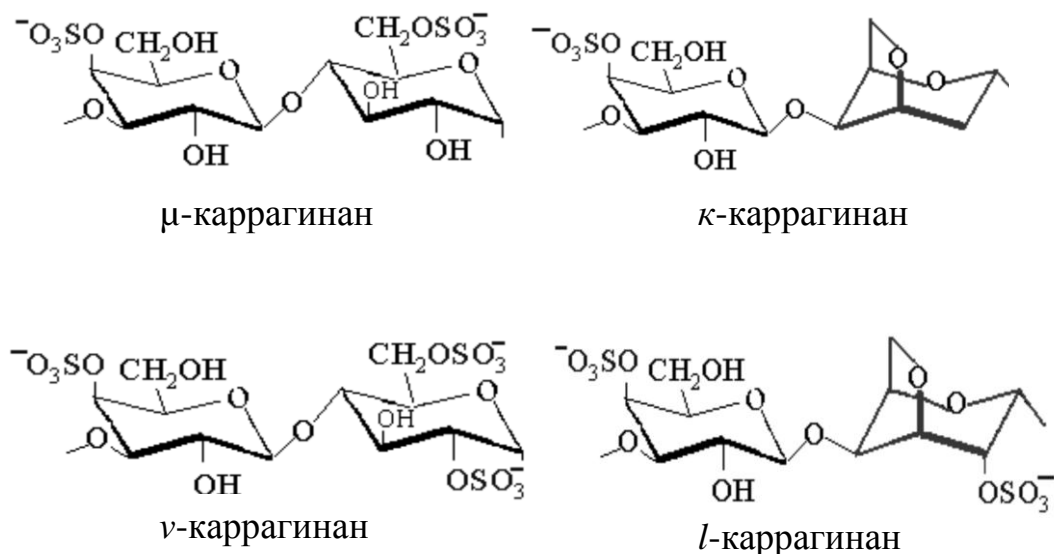


Рисунок 1.6. Структура основных дисахаридных звеньев агара

Гидроксильные группы этих полисахаридов могут быть метилированы, сульфатированы или замещены остатками пировиноградной кислоты [61]. Как правило, полисахариды группы агара сильнее метоксилированы и менее сульфатированы, чем каррагинаны (особый сахарид из красных водорослей) [62]. Из водорослей рода *Callophycus* (Solieraceae) был выделен полисахарид с высоким содержанием пировиноградной кислоты [63]. Структура основных типов дисахаридных звеньев каррагинана представлена на рис. 1.7.



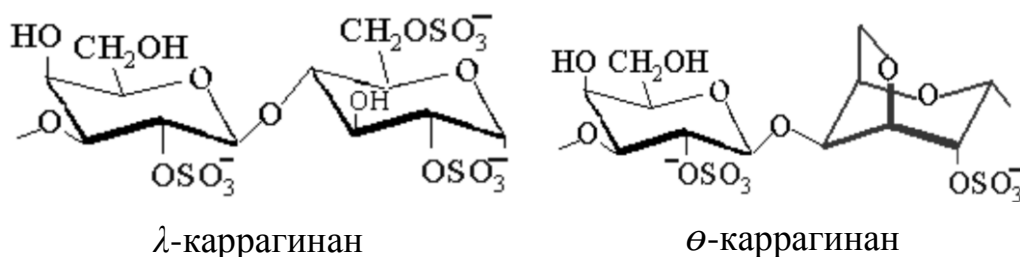


Рисунок 1.7. Структура основных типов дисахаридных звеньев каррагинана

Природные полисахариды, как правило, имеют нерегулярную структуру. Чаще всего они содержат повторяющиеся дисахаридные звенья нескольких типов каррагинанов [64]. В процессе сложного, многоступенчатого биосинтеза полисахаридов в клеточной стенке водоросли может образовываться комбинация из различных идеализированных каррабиозных звеньев, распределенных вдоль полимерной цепи, что приводит к образованию сложных гибридных структур.

В работе [65] изучен химический состав бурых водорослей, определен их макро-, микроэлементный и моносахаридный состав. Установлено, что увеличение содержания иода и сульфатирование полисахаридов приводит к увеличению биологической активности препаратов на их основе. *Сульфатированные полисахариды* бурых водорослей - *фукоиданы* обладают противовирусным и противоопухолевым действием. На основе этих свойств фукоидан стал востребованным компонентом при создании важных полифункциональных препаратов с высокой биологической активностью и совместимостью с другими лекарственными формами.

Было установлено, что все альгинаты по их растворимости в воде можно разделить на две группы. К первой группе относят водорастворимый альгинат натрия, важными технологическими свойствами которого являются его растворимость и студнеобразующая способность. Альгинат натрия, растворяясь в воде, обладает способностью снижать поверхностное натяжение на границе раздела фаз, т.е. проявляет свойство ПАВ, что подтверждает

возможность его использования в качестве эмульгатора. Ко второй группе относится альгинат кальция – нерастворимый в воде полисахарид.

В работе [17] использованы радиационно-химические методы изучения антиокислительной активности альгиновой кислоты и альгината натрия, выделенных из бурых водорослей *Cystoseira*. Исследованы их радиационно-химические превращения в водно-буферных растворах, насыщенных N_2O , Ar и O_2 , под воздействием различных доз гамма-излучения ^{60}Co . При использовании спектрофотометрического метода было зарегистрировано накопление стабильных продуктов радиолита, которые имеют характерные полосы оптического поглощения с $\lambda_{\text{макс.1}} = 200 - 210$ нм, $\lambda_{\text{макс.2}} = 264$ нм с дополнительной широкой полосой с $\lambda_{\text{макс.3}} = 410$ нм. Обнаружена сложная зависимость реакции образования продукта радиолита альгиновой кислоты с $\lambda_{\text{макс.2}} = 264$ нм от pH среды в диапазоне 5.2 - 9.0. Показано, что альгиновая кислота и альгинат натрия являются сильными акцепторами радикалов OH , окислительными частицами, отвечающими за многие разрушительные процессы в химических, биологических системах, включая живые организмы. Увеличение радиационно-химического выхода продукта радиолита альгината натрия в присутствии закиси азота N_2O и регистрация полосы поглощения с $\lambda_{\text{макс.2}} = 264$ нм позволило предположить, что за это поглощение принадлежит малоновому диальдегиду и сделать вывод о преимущественном вкладе реакции радикалов OH в его образование. Установление механизма реакций окисления альгинатов в водно-органических растворах показало преимущество метода радиационно-химического моделирования редокс-процессов с возможным изменением условий реакций взаимодействия с промежуточными частицами, которые регистрируются методом импульсного радиолита [17].

1.2.4. Маннит

Исключительную ценность представляет выделяемый из бурых водорослей шестиатомный спирт маннит. Маннит шестиатомный спирт,

бесцветные кристаллы которого имеют сладкий вкус и хорошо растворимы в воде. Содержится во многих растениях. Маннит и его производные применяют для получения поверхностно-активных веществ, олиф, смол, лаков, взрывчатых веществ. Структурная формула маннита представлена на рис. 1.8.

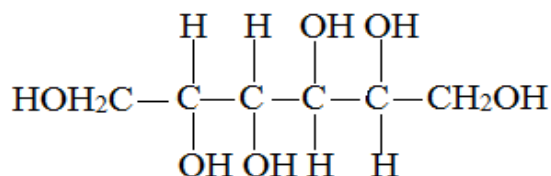


Рисунок 1.8. Структурная формула маннита

Маннит - один из основных продуктов фотосинтеза бурых водорослей, который интенсивно накапливается в летние месяцы [66]. Максимальное его количество обнаружено в водорослях *Laminariales: Laminaria japonica, L. Bongardiana* (12,3 - 15,3 %). Маннит применяется при консервации крови, используется в медицинских целях в качестве средства от отека головного мозга и как наполнитель для таблеток и добавок в диабетические продукты питания. Важно, что в технике маннит применяется в производствах синтетических смол, красок, бумаги, взрывчатых веществ, при выделке кожи.

Кроме этого в работе на основе результатов радиационно-химических исследований, проведенных методом ЭПР [67], показано, что маннит обладает парамагнитными свойствами, поэтому его можно использовать в качестве дозиметра или «маркера» для определения дозы ионизирующего излучения с высокой чувствительностью и широким интервалом линейной зависимости выхода радикалов от поглощенной дозы. Важно понимать, что этот «маркер» находится внутри облучаемых образцов морских водорослей именно в момент воздействия ионизирующего излучения, которое в последнее время широко применяется в биотехнологии морекультур для стерилизации исходного сырья водорослей. Радиационно-химическая стерилизация является эффективным способом защиты водорослей от развития патогенной флоры и микроорганизмов при хранении не только водорослей, но и пищевых продуктов

и фармпрепаратов на их основе. Для стерилизации используются гамма-установки ^{60}Co и ускорители электронов [15].

1.3. Физико-химические подходы при разработке эффективных методов культивирования морских водорослей

Для успешного внедрения ценных продуктов из водорослей, необходимо: во-первых, найти подходящие *виды водорослей* для выращивания их в искусственных условиях без потери важных пигментов и других важных соединений; во-вторых, важно выбрать *технологические условия культивирования: состав среды, концентрации питательных веществ, температуру, энергетические параметры, длительность светового воздействия* (подсветки) и режим аэрирования [68]. Кроме того, необходимо контролировать физико-химическими методами выходы БАС и условия культивирования, чтобы выбрать наиболее технологичные. Как показано в работе [69] культивирование водорослей *Cylindrotheca closterium* в морской воде позволило повысить выход каротиноида фукоксантина ~ в два раза по сравнению с выращиванием в дистиллированной воде. Не менее важной проблемой является необходимость длительного сохранения и свежих водорослей, и высушенного сырья. В последнее время большое внимание уделяется изучению влияния спектральных характеристик света и концентрации NO_3^- рост водорослей и на содержание хлорофиллов и каротиноидов. Авторы работы [70] показали, что на рост водорослей и содержание пигментов влияет больше концентрация азота, чем подсветка светом в красной области спектра. Разработан многоступенчатый процесс экстракции и ультрафильтрации пигментов из водорослей при использовании ультразвука, что необходимо для получения фармпрепаратов специального назначения [71].

1.4. Физико-химические проблемы стерилизации водорослей

Стерилизация, или обеспложивание (от лат. «sterilis» - бесплодный) означает полное уничтожение зародышей микроорганизмов в питательных средах, продуктах, сырье. Существует множество видов стерилизации: путем нагревания, стерилизация при помощи электро-магнитного излучения, стерилизация при помощи фильтрации и методов химической и радиационно-химической стерилизации.

Ультрафиолетовая радиация - широко используются в промышленных целях (например, для стерилизации пластиковой посуды), эти методы можно также использовать и в лабораторных условиях. УФ - радиация подходит для использования в лаборатории, включая стерилизацию ламинарных боксов и рабочих поверхностей. УФ - радиация опасна для человека (особенно для глаз). Вдобавок, при использовании УФ - облучения образуется озон, что также нежелательно для обслуживающего персонала. УФ - радиация при $\lambda = 260$ нм способствует образованию ковалентных связей в тимине ДНК, что приводит к возникновению потенциально летальных мутаций. УФ - радиация не проникает через обычное стекло, поэтому для стерилизации жидкостей, особенно в больших объемах, рекомендуется использовать водостойкие пригодные для использования под водой лампы. Стеклоянную посуду можно заменить кварцевой, которая пропускает УФ - излучение, однако такая посуда стоит очень дорого. Постоянное перемешивание воды и достаточное время экспозиции позволяет решить эту проблему, однако если организмы прикрепляются к внутренней части емкости, то последующая стерилизация может быть неэффективной без использования более мощной лампы и более длительного времени экспозиции [72].

Стерилизация сырья различных аквакультур при воздействии ионизирующего излучения используется и в нашей стране, и зарубежом, однако, данных по радиационной стабильности и радиационно-химическим превращениям биологически активных соединений, выделяемых из

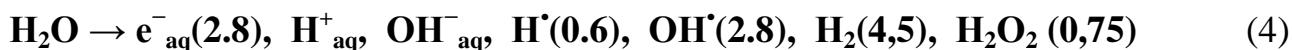
облученных водорослей, особенно культивируемых, не достаточно. В отечественной и зарубежной литературе данные по радиационной стабильности экстрактов водорослей, особенно диатомей с повышенным содержанием каротиноида фукоксантина, практически отсутствуют.

Используя результаты фундаментальных и прикладных исследований с помощью физико-химических методов механизма радиационно-химического окисления химических [73-75], биологических соединений [75, 76] и их растворов, авторы в работе [32, 38] представлены экспериментальные результаты изучения радиационной стабильности фукоксантина, выделенного из водорослей *Cystoseira*. Полученные результаты спектрофотометрических исследований растворов фукоксантина, содержащих молекулярный кислород, позволили сделать вывод о частичной регенерации этого пигмента в пострадиационный период. Однако, и в отечественной и зарубежной литературе недостаточно сведений о радиационной стабильности других биологически активных соединений из бурых водорослей, включая хлорофилл, порфирины, и данных по их деструкции при радиационной стерилизации. Особое внимание нужно обратить на выбор допустимых доз облучения, оптимально достаточных для стерилизации сырья культивируемых микроводорослей, состав и структура которых критически зависит даже от незначительных изменений условий технологических процессов их выращивания и обработки.

1.5. Физико-химические методы для установления механизма окислительно-восстановительных (redox) реакций различных соединений при воздействии ионизирующего излучения

1.5.1. Оптические методы изучения свойств промежуточных частиц, возникающих при радиолизе водных и водно-органических растворов

В результате радиолиза воды в деаэрированных условиях образуются следующие короткоживущие частицы и стабильные продукты радиолиза воды, согласно данных работы [73]:



e^-_{aq} - уникальный восстановитель ($E_0 = -2.9$ эВ)



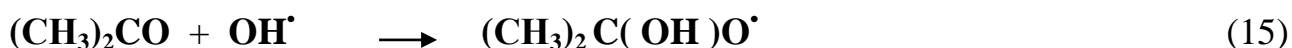
OH^\cdot - самый сильный окислитель ($E_0 = 2.32$ эВ при pH 7), константа восстановления молекулы спирта по реакции (8) равна $1.6 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ образованием гидроксиэтильного радикала [73]:



который обладает высоким восстановительным потенциалом, $E_0 = -1.4$ эВ, поэтому, как e^-_{aq} , может участвовать в процессах восстановления. Реакции радикалов $\text{CH}_3\text{CH}^\cdot\text{OH}$ могут приводить к образованию ацетальдегида и исходной молекулы спирта:



В водной среде в присутствии молекул ацетона происходит реакция (13) [73]:



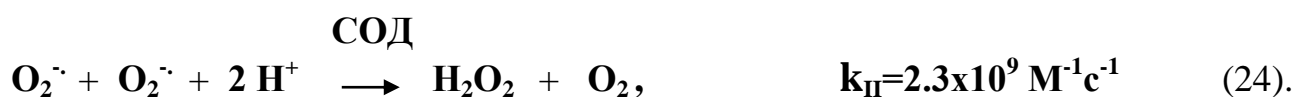
В аэробных условиях промежуточные частицы ацетона взаимодействуют с молекулярным кислородом супероксид анион-радикала (18) и перекисных радикалов согласно реакциям (19) и (20) [38, 74, 75]:



При наличии кислорода в водно-спиртовых растворах молекулы O_2 взаимодействуют с e^-_{aq} или с атомарным водородом H , что приводит к образованию супероксид анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$ или его гидратированной формы HO_2^{\cdot} , которые находятся в равновесии между собой в зависимости от pH раствора:



Супероксид анион-радикалы являются активными реакционно-способными частицами, которые в зависимости от условий: pH среды, T и примесей в растворе могут инициировать окислительно-восстановительные реакции. Скорость гибели $\text{O}_2^{\cdot-}$ за счет реакции диспропорционирования возрастает от $2 \div 4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $2.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ при введении в раствор антиоксидантов, например, супероксиддисмутазы (СОД):



Перекись водорода сама активно участвует в окс-редокс реакциях, но более опасными инициаторами окислительных процессов и стрессов в живых организмах являются радикалы OH , которые образуются при распаде молекул H_2O_2 . Менее изученными реакциями супероксид анион-радикалов являются реакции с участием оксокомплексов молекул БАС (порфиринов, флавоноидов, лакказ, церулоплазмина (ЦП), и антиоксидантов с особой активностью, АО*) [33, 77-79]. Важность такого уровня высокой антиоксидантной активности

заключается в том, что в системе без АО* генерируются $O_2^{\cdot-}$, регистрируется перекись водорода, наблюдается дополнительная окислительная деструкция биологических соединений. Но в присутствии АО* с особой активностью в этой системе при радиоллизе *содержание его* почти не *меняется*, но их протекторные свойства подтверждаются биохимическими методами. Так концентрация $O_2^{\cdot-}$ по мере увеличения вносимого количества, церулоплазмينا, при $[Цп] = 3 \times 10^{-6}$ М, снижается почти до нуля [78]. В ходе реакций с высокой константой скорости Цп возвращается в систему, согласно схеме (25):



Существование лабильных оксокомплексов с частичным переносом заряда подтверждается теорией медленного окисления (А.Н. Бах 1897г.) [39, 76] и обратимым изменением спектров оптического поглощения растворов этих АО* при вакуумировании и повторном впуске O_2 [33]. Благодаря использованию импульсного радиолиза, было доказано, что эти реакции проходят с высокими константами «внутрикомплексных» процессов переноса электрона до *регенерации* исходных молекул антиоксидантов.

Подобные окислительно-восстановительные реакции происходят и в водно-ацетоновых растворах. Но подробно в данной диссертации будут описаны реакции с участием промежуточных частиц радиолиза водно-спиртовых растворов в присутствии и в отсутствие кислорода, чтобы показать, какими исследованиями элементарных реакций в процессах радиационно-химических превращений БАС можно моделировать протекание восстановительных или окислительных реакций в сложных биологических системах. На основе спектрофотометрических данных измерения оптической плотности исходных растворов БАС или экстрактов водорослей после радиолиза в присутствии и в отсутствие молекулярного кислорода можно

судить только о направлении *редокс*-реакций, отвечающих за конкретный механизм антиокислительной активности [38, 77].

1.5.2. Методы спектрофотометрии в исследованиях радиационной чувствительности экстрактов водорослей

Данные по радиационной чувствительности экстрактов водорослей, полученные только на основании спектрофотометрических результатов изменения оптической плотности характерных полос поглощения в такой сложной по составу системе позволяют сделать *оценку* стабильности различных фракций при радиационной стерилизации фармпрепаратов из водорослей. Значительно расширены возможности радиационно-химических исследований растворов экстрактов водорослей и сравнения их стабильности в разных варьируемых условиях протекания окислительно-восстановительных реакций за счет насыщения растворов различными газами [38]. В водно-этанольных растворах, насыщенных аргоном для удаления кислорода, при радиолизе воды образуются промежуточные короткоживущие частицы, такие как гидратированные электроны, $e^-_{\text{гидр.}}$, атомы водорода H, обладающие высокими восстановительными потенциалами, и радикалы OH, самые сильные окислительные реакционные центры. Для того чтобы изменить условия окислительно-восстановительных реакций при радиолизе экстрактов проводят насыщение растворов аргоном для удаления кислорода с целью подавления окислительных процессов. В присутствии молекул этанола, активного акцептора радикалов OH, образуются гидрокси-этильные радикалы, имеющие тоже высокие восстановительные свойства, поэтому в исследуемых системах при этих условиях протекают только восстановительные процессы с участием биологических молекул экстрактов.

При радиолизе водно-этанольных растворов экстрактов водорослей в присутствии закиси азота, N_2O образуется дополнительное количество радикалов OH, что увеличивает вклад реакций окисления и снижает стабильность биологически активных соединений. В радиационной химии

часто используют реакцию между e_{aq}^- и N_2O , приводящую к образованию дополнительного количества радикалов $OH\cdot$.

Более полная информация о радиационной стабильности и антиокислительной активности каротиноида фукоксантина в сравнении с другими каротиноидами была получена при изучении взаимодействия Фк с супероксид анион-радикалом [34]. При использовании метода *импульсного* радиолиза и скоростной регистрации сигналов оптического поглощения короткоживущих продуктов радиолиза Фк в присутствии O_2 было зарегистрировано батохромное смещение полосы оптического поглощения анион-радикала комплекса - $(Фк^{+\delta} \dots O_2^{-\delta})^-$, $\lambda_{\text{макс}} \sim 280$ нм, по сравнению с максимумом поглощения супероксид анион-радикала, $O_2^{\cdot-}$ ($\lambda_{\text{макс}} \sim 250$ нм).

На рис. 1.9 представлены спектры оптического поглощения супероксокомплекса - $(Фк^{+\delta} \dots O_2^{-\delta})^-$ и кинетика его гибели.

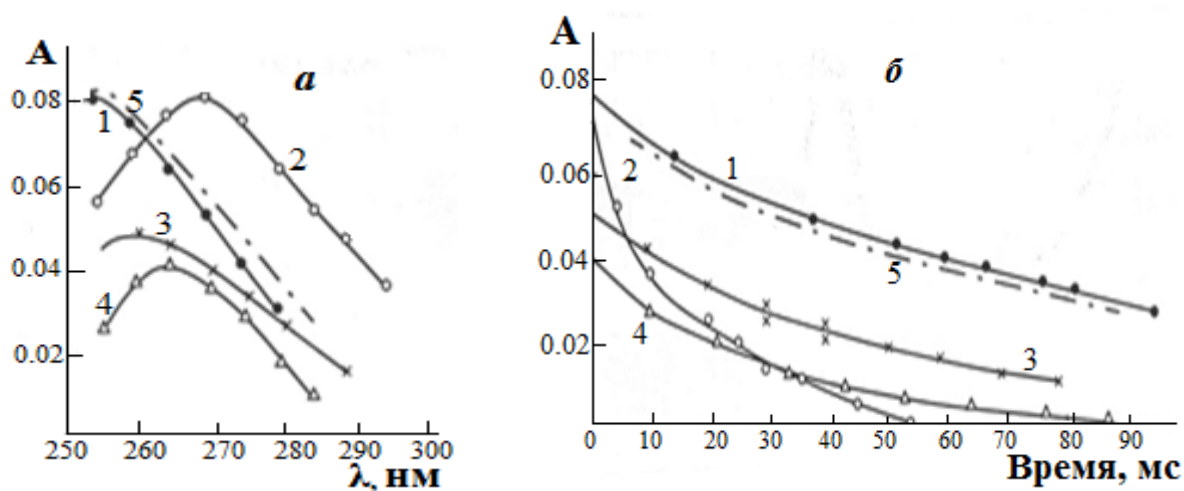


Рисунок 1.9. Спектральные характеристики поглощения промежуточных частиц импульсного радиолиза: супероксид анион-радикала в фосфатно-формиатном буфере (а) и кинетика их гибели (б) в присутствии различных каротиноидов: 1 - буфер; 2 - фукоксантин; 3 - лютин; 4 - виолоксантин; 5 - бета-каротин

Физико-химические методы анализа превращений экстрактов после воздействия ионизирующего излучения на сухие образцы водорослей используются для выбора технологичных условий радиационной стерилизации:

дозы облучения, мощности дозы [80], температуры и времени хранения облученного сырья. Обычно сравниваются спектральные характеристики исходных экстрактов и облученных. На основании изменения характера спектров и интенсивности полос поглощения, характерных для важных компонентов водорослей, делается заключение об их стабильности при выбранных условиях облучения. Вторая важная проблема изучения радиационной стабильности экстрактов, выделенных из соответствующих фракций БАС, и фармпрепаратов на их основе, связана с тем, что они могут подвергаться воздействию ионизирующего излучения или при стерилизации препаратов [15, 81], или во время облучения больных, принимающих соответствующие препараты, при проведении лучевой терапии.

Третья проблема, которую можно успешно решать, используя методы радиационно-химического моделирования редокс-реакций, связана с изучением антиокислительных и протекторных свойств биологически активных соединений, выделенных различными методами из водорослей и других видов морекультур.

Изучение механизма радиационно-химических реакций с участием активных промежуточных частиц, таких как сольватированные электроны, радикалы Н и ОН, перекисные радикалы RO_2 , синглетный кислород 1O_2 и супероксид O_2^- , позволяет моделировать окислительно-восстановительные реакции в биологических системах разной степени организации в присутствии и в отсутствие антиоксидантов и сенсibilизаторов. В литературе много сведений об антиокислительных свойствах биологически активных соединений из водорослей, полученных биохимическими методами, однако более полная информация об антиокислительной и радиопротекторной активности фукоксантина и сравнение её с активностью других каротиноидов, была получена при изучении взаимодействия Фк с молекулярным кислородом и образования супероксид анион-радикалов и их комплексов с Фк при использовании метода импульсного радиолиза со скоростной регистрацией

сигналов оптического поглощения короткоживущих промежуточных частиц радиолиза [32, 33]. Объяснение образования и роли лабильных комплексов БАС с кислородом в реакциях окисления каротиноидов было сделано на основании теории медленного окисления А.Н. Баха [39, 82]. Результаты импульсного радиолиза, полученные для различных растворителей, можно использовать для объяснения данных по радиолизу экстрактов и их растворов, полученных при воздействии гамма - излучения и потока ускоренных электронов при стационарных условиях облучения [83].

Глава II. Экспериментальная часть

2.1. Исходные материалы и их квалификация

Растворители:

спирт (этанол) C_2H_5OH , марки «хч»,

ацетон $(CH_3)_2CO$, «хч»,

водно - органические растворы 50 % этанола,

водно - органические растворы 50 % ацетона,

дистиллированная вода (свежеперегнанная),

посуда, стеклянная с притертыми пробками).

Бурые морские водоросли (*Laminaria Japonica*), собранные в 2012 году (Государство Мьянма), двух видов: *Jenit* (M) и *Jemo* (D), культивирование которых проходило в водоёмах с пресной водой. Фотографии высушенных образцов водорослей представлены на рис. 2.1.



Jenit (M)



Jemo (D)

Рисунок 2.1. Фотографии сухих образцов макроводорослей *Laminaria Japonica Jenit* (M) и *Jemo* (D)

Образцы диатомовых водорослей *Cylindrotheca Closterium* (Ehrenberg) *Reimannand J. C. Lewin* из коллекции культур Ланской (ИнБИОМ, РАНг. Севастополь). Фотография микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* представлена на рис. 2.2.



Рисунок 2.2. Микроводоросли диатомия *Cyndrotheca Closterium*

Культура микроводорослей *Cyndrotheca Closterium* (рис. 2.2) выращена в режиме накопительного культивирования при температуре 20-22 °С при использовании модифицированной питательной среды состава (табл. 2.1), приготовленной на стерильной морской воде, в плоских культиваторах, оптический путь которых составлял 5 см. Культуру освещали круглосуточно люминесцентной лампой ЛБ (мощность 18-80 Вт, частота 50 Гц, освещаемая поверхность 0,042 кв. м).

Таблица 2.1. Состав модифицированной питательной среды для накопительного культивирования микроводорослей *Cyndrotheca Closterium*

Компонент	Навеска, г*л ⁻¹
NaNO ₃	7,500
Na ₂ SiO ₃ *9H ₂ O	3,000
NaH ₂ PO ₄ *2 H ₂ O	0,500
Na ₂ EDTA	0,872
FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,630
NaMoO ₄ * H ₂ O	0,063
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,100
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	0,220
CoCl ₂ *6 H ₂ O	0,100
MnCl ₂ *4 H ₂ O	0,180

2.2. Получение экстрактов из водорослей

В работе использованы высушенные образцы водорослей *Laminaria japonica* (Республика Мьянма) -М (*Jenit*) и -D (*Jemo*) и *Cylindrotheca Closterium*. Экстракты готовили добавлением 100 (200) мл растворителя к навеске водорослей массой ~ 5 (10) г. В качестве растворителей были выбраны спирт (этанол), ацетон, водные растворы 50 % этанола и 50 % ацетона. Растворы выдерживали в течение 10 дней при $T_{\text{комн.}} \sim 22 \div 25$ С. Предварительно было установлено, что этого времени достаточно для полного экстрагирования пигментов хлорофиллов и каротиноидов. Были измерены спектры оптического поглощения растворов после фильтрации и после облучения.

2.3. Экспериментальные методы физико-химических исследований

2.3.1. Метод UV-VIS спектрофотометрии

Метод UV-VIS спектрофотометрии был выбран для измерения спектров оптического поглощения исходных растворов экстрактов и их изменений после воздействия ионизирующего излучения. В основном использовали спектрофотометр СФ-2000. Раствором сравнения служили выбранные растворители, длина оптического пути кварцевой кюветы равна 1.0 см. Принцип работы многоэлементного приемника спектрофотометра СФ-2000 состоит в преобразовании светового сигнала в электрический, причем величина электрического сигнала прямо пропорциональна как величине светового сигнала, так и времени освещения приемника (экспозиции).

Технические характеристики:

- Спектральный диапазон от 200 до 1100 нм;
- Предел допускаемого значения абсолютной погрешности при измерении спектральных коэффициентов направленного пропускания равен 1 %;
- Спектральный диапазон ультрафиолетового канала от 200 до 390 нм;

—Спектральный диапазон видимого и ближнего инфракрасного канала от 390 до 1100 нм;

— Источники излучения при работе в спектральном диапазоне:

от 200 до 390 нм – дейтериевая лампа;

от 390 до 1100 нм – галогенная лампа.

Принцип действия спектрофотометра основан на измерении отношения двух световых потоков: светового потока, прошедшего через исследуемый образец, и потока, падающего на исследуемый образец (или прошедшего через контрольный образец).

Коэффициент пропускания исследуемого образца рассчитывается по формуле, $T = (I - I_T) / (I_K - I_T)$,

Где, I - сигнал, пропорциональный световому потоку, прошедшему через исследуемый образец;

I_K - сигнал, пропорциональный световому потоку, прошедшему через контрольный образец;

I_T - сигнал, пропорциональный темновому току приемника.

Расчет концентрации раствора через оптическую плотность можно вести, используя закон *Бугера-Ламберта-Бера* [84].

$$D = c * \varepsilon * l = \lg(I_0/I_c)$$

Где, c – концентрация измеряемого раствора, моль/л;

ε - коэффициент экстинкции, л/моль*см;

l – Толщина кюветы, мм;

I_0, I_c –интенсивность света после прохождения исходного и исследуемого растворов.

Точность *определения оптической плотности 0.05 отн. единиц, спектральное разрешение прибора - до 1 нм.*

Использовали кварцевые ячейки с длиной оптического пути 1.0 мм и 10 мм. Растворами сравнения были выбраны соответствующие растворители.

Кроме спектрофотометра СФ-2000 был использован Spectrophotometer Hitachi 3310; для измерения спектров люминесценции - спектрофлюориметр Hitachi -7000.

2.3.2. Разделение экстрактов методом тонкослойной хроматографии

В научно-исследовательском институте биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН (г. Севастополь), было проведено разделение экстрактов БАС методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), выделенных из двух видов водорослей (*Jenit-M* и *Jemo-D*) по методике вед. н.с., к.х.н. Нехорошева М.В. при участии аспиранта Железновой С.Н.

Предварительно отбирали 10 мл экстракта водорослей, центрифугировали при 3000 об/мин, насадочную жидкость удаляли. Суммарный спиртовой экстракт разделяли на хроматографических пластинках, с закрепленным слоем силикагеля толщиной слоя 0,5 мм, в системе ацетон-гексан 3:7. Фракцию силикагеля, содержащую Фк, экстрагировали спиртом с последующим центрифугированием. Концентрацию Фк ($\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$) определяли по величине оптического поглощения (спектрофотометр СФ-2000) на длине волны 450 нм с последующим пересчетом на сухую массу микроводоросли по формуле:

$$\Phi_k = \frac{10 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot D_{450}}{E \cdot V_3 \cdot B \text{ (г)}} \quad (26)$$

Где, V_1 - объём объединенного элюата с пластины, мл; V_2 - объём экстракта из навески, мл; V_3 - объём аликвоты, нанесенной на пластину, мл; D_{450} - оптическая плотность при $\lambda = 450$ нм; $B_{(г)}$ - навеска сухой биомассы, г; $E=1280$ - удельной коэффициент экстинкции фукоксантина в этаноле (оптическая плотность 1% - раствора при λ нм и длине оптического пути $l = 1$ см), 10 - содержание каротиноида в 1 мл 1 % раствора в спирте в мг.

2.3.3. Метод стационарного радиоллиза при использовании гамма-излучения ^{60}Co РХМ- γ -20

Для облучения растворов экстрактов водорослей использовали многокамерную установку с источником γ - ^{60}Co (РХМ- γ -Co-60, РХТУ им. Д. И. Менделеева), предназначенную для проведения научных исследований в области радиационной химии, радиобиологии, физики твердого тела, и др., при температуре от -40 до $+400$ $^{\circ}\text{C}$ и давлении ~ 1 мПа. Мощность дозы, определенная методом ферросульфатной дозиметрии, была равной $0,08 \div 0,11$ Гр/сек, [80]. Доза облучения варьировалась от $0,2$ кГр до $1,3$ кГр.

Установка представляет собой свинцовый контейнер, установленный на станине. В центре контейнера расположен облучатель типа «белые колесо» с 30-ю источниками гамма – лучей ^{60}Co с максимальной мощностью поглощенной энергии ионизирующего излучения в диапазоне $0,08 \div 0,11$ Гр/с. Объект облучения устанавливается на рабочий столик. Обслуживающий персонал и исследователь покидают служебное помещение. Рабочий столик образцами при помощи специального механизма опускается в зону облучения. После завершения экспозиции облучения столик поднимается вверх, и образцы извлекаются из рабочей камеры. Помимо центральной камеры ($V=4,4$ л) установка имеет шесть меньших боковых камер ($V=0,6$ л). В данной работе облучение образцов экстрактов водорослей в стеклянных ампулах проводилось в центральной камере.

Облучение образцов водорослей *в сухом виде* проводилось потоком ускоренных электронов (Доза $15 \div 22$ кГр, ускоритель УЭЛВ-10-10-Т-1 ИФХЭ РАН). Конструкция установки размещена в специальном служебном помещении, которое обеспечивает биологическую защиту обслуживающего персонала.

2.3.4. Исследование механизма окислительно-восстановительных реакций в растворах экстрактов водорослей при облучении

Облучение образцов водорослей в сухом виде проводилось при $T_{\text{комн.}}$ потоком ускоренных электронов при дозах 15÷22 кГр при использовании ускорителя УЭЛВ-10-10-Т-1 [83]. После радиолиза из облучённых образцов водорослей готовили спиртовые и ацетоновые экстракты, измеряли их спектры оптического поглощения и сравнивали со спектрами необлученных образцов водорослей. На основании анализа этих результатов делали вывод о влиянии ионизирующего облучения на стабильность и сохранность БАС в хлорофилловой и каротиноидной фракциях. При исследовании механизма окислительно-восстановительных реакций в растворах экстрактов водорослей для облучения использовали установку γ - ^{60}Co (РХМ- γ -20 Со-60, РХТУ), при мощности дозы 0,08 ÷ 0,11 Гр/сек, определенной методом ферросульфатной дозиметрии [80]. Доза облучения образцов варьировалась от 0,2 до 1,3 кГр. Облучение образцов водорослей в сухом виде проводилось в пластиковых пакетах потоком ускоренных электронов с мощностью дозы 3 кГр/с при дозах облучения от 15 до 22 кГр (ускоритель УЭЛВ-10-10-Т-1, ИФХЭ РАН).

Глава III. Экспериментальные результаты и их обсуждение

С целью успешного использования бурых водорослей и других морепродуктов в современной биотехнологии для создания медицинских препаратов, функциональных продуктов питания, природных пигментов в электронике и фототехнике необходимо исследовать их физико-химические свойства и функциональную активность. Для технологических процессов важно определить стабильность сырья и сохранение физико-химических свойств и антиокислительной активности при хранении в сухом виде, при воздействии ионизирующего излучения. В задачи полной экстракции ценных веществ из водорослей входит подбор растворителей, условий экстракции.

3.1. Эффективность экстракции биологически активных соединений из водорослей *Jenit-M* и *Jemo-D*

3.1.1. Спектры оптического поглощения органических и водно-органических экстрактов водорослей *Jenit-M* и *Jemo-D*

Проведенно спектрофотометрическое сравнение эффективности экстракции БАС из водорослей *Jenit-M* и *Jemo-D* при использовании разных растворителей: этанольных и водно-этанольных (1:1), ацетоновых и водно-ацетоновых (1:1) растворов. Главное внимание было уделено влиянию природы растворителя на структуру и интенсивность характерных полос поглощения *каротиноидной* и *хлорофилловой* фракций, соответственно полос в области длин волн $\sim \lambda=400-450$ нм и $\sim 600-680$ нм [43].

Спектры оптического поглощения этанольных и водно-этанольных (50 %) растворов *Jenit-M* и *Jemo-D* представлены на рис. 3.1 -а и 3.1 -б. Наблюдаемое различие ОП соответствующих полос поглощения в спектрах связано с тем, что экстракция из водорослей *Jenit-M* происходит и в этанольном, и в водно-этанольном растворе несколько интенсивнее, чем из водорослей *Jemo-D*, особенно это проявляется на экстрагировании каротиноидов. Экстракция из

водорослей *Jenit-M* в водно-спиртовом растворе проходит интенсивнее, чем в спиртовом. Большой выход хлорофилловой фракции из водорослей *Jemo-D* ~ на 30 % и несколько выше выход каротиноидов обнаружен в этанольных растворах, чем в водно-спиртовых растворах.

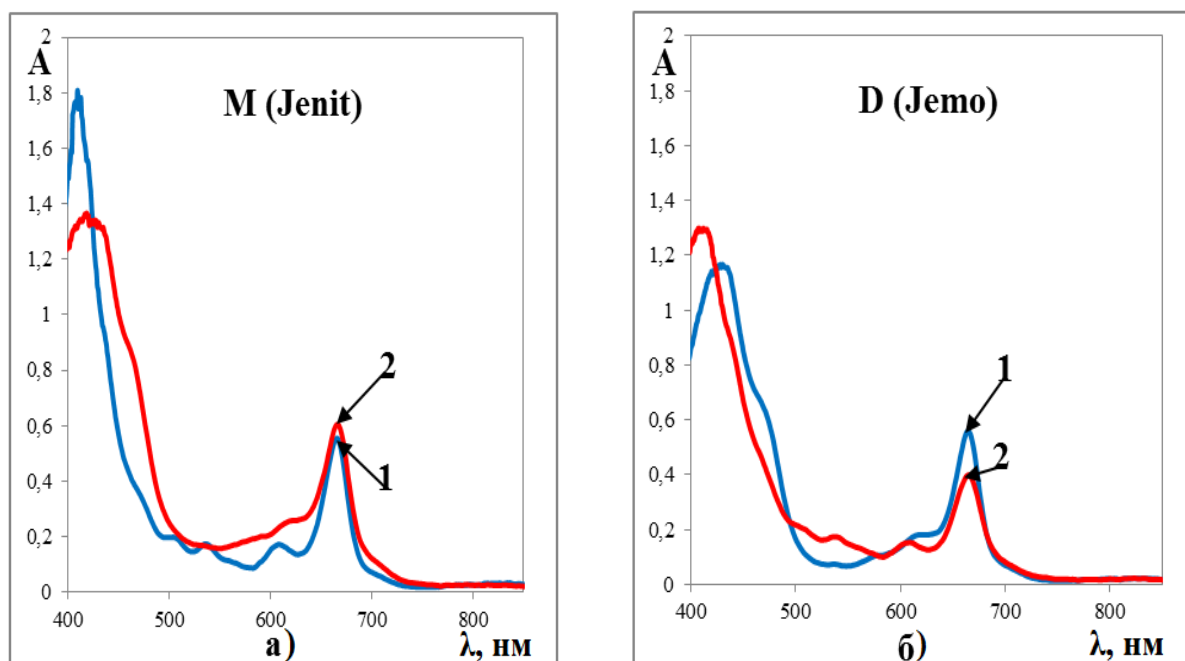


Рисунок 3.1. Спектры оптического поглощения **100 %** этанольных экстрактов М-I, (1) и **50%** водно-этанольных М-II (2) -а), этанольных экстрактов D-I (1) и 50% водно-этанольных D-II (2), - б);

Существенные различия в спектрах оптического поглощения ацетоновых и водно-ацетоновых (1:1) экстрактов зарегистрированы и для водорослей *Jenit-M*, и для *Jemo-D*. Как представлено на рис. 3.2 -а и 3.2 -б, эффективность экстрагирования биологических соединений в водно-ацетоновых экстрактах значительно превосходит экстракцию всех компонент в 100 % ацетоновых растворах.

Особенно различие в спектрах выражено в увеличении интенсивности всего спектра поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей *Jenit-M* (рис. 3.2 -а). Поэтому для использования выделяемых пигментов *в технических целях* лучше использовать *водно-ацетоновые* растворы для более полного извлечения биологически активных соединений из природного сырья

водорослей, чем ацетоновые и спиртовые.

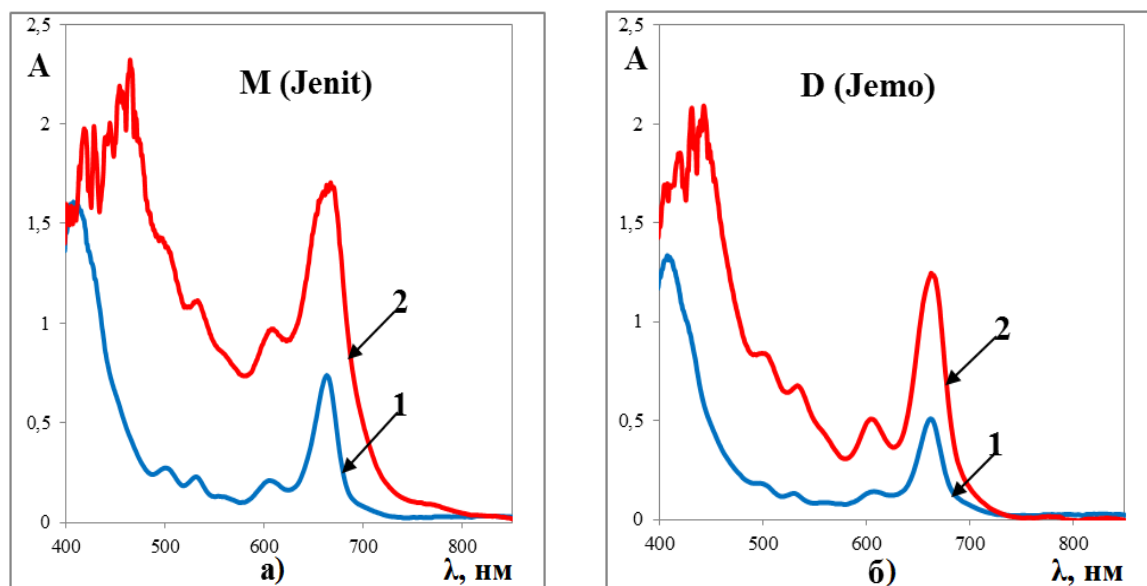


Рисунок 3.2. Спектры оптического поглощения **100 %** ацетоновых экстрактов М-I (1) и **50 %** водно-ацетоновых М-II (2), -а); **100 %** ацетоновых D-I (1) и **50 %** водно-ацетоновых экстрактов D-II (2) -б)

Как можно видеть, интенсивность полос оптического поглощения и каротиноидных фракций ($\lambda \sim 450$ нм), и хлорофилловых ($\lambda \sim 665$ нм) водорослей *Jemo* и *Jenit* в водно-ацетоновых экстрактах выше.

3.1.2. Влияние разбавления на спектральные характеристики спиртовых и ацетоновых экстрактов *Jenit*-M

Для сравнения оптических спектров исходных и облученных образцов водорослей было необходимо провести измерение влияния разбавления на спектральные характеристики необлученных экстрактов.

Спектры оптического поглощения 100 % спиртовых и 100 % ацетоновых экстрактов макроводорослей *Jenit*(M) (СФ-2000) представлены на рис. 3.3 -а и 3.3 -б. Для разбавления спиртовых экстрактов в 3 раза брали 1 мл экстракта и добавляли 2 мл спирта. Для разбавления экстракта в 6 раз брали 1 мл экстракта и добавляли 5 мл спирта. Для разбавления ацетоновых экстрактов использовали те же самые пропорции.

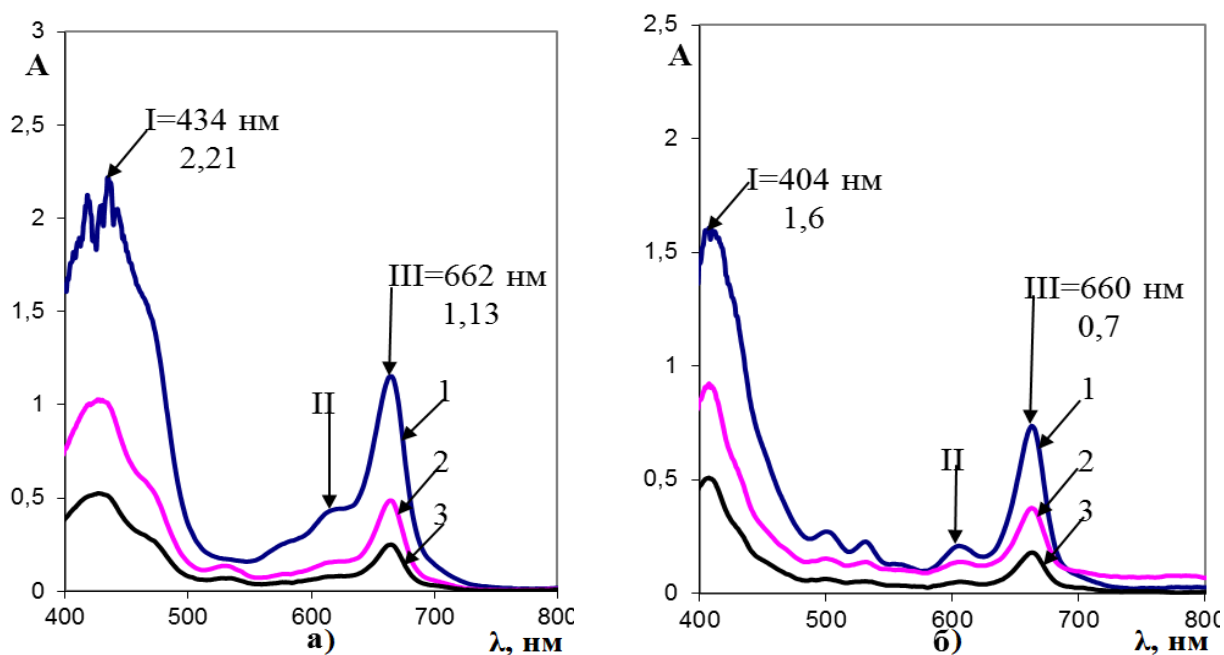


Рисунок 3.3. Спектры оптического поглощения **100 % спиртовых экстрактов М-I, -а); 100 % ацетоновых экстрактов М-I, -б):** исходные образцы - **1**, при разбавлении в 3 раза - **2**, при разбавлении в 6 раз - **3**

Изменение оптической плотности полос, ответственных за поглощение каротиноидной и хлорофилловой фракций, представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1. Спектральные характеристики оптического поглощения *спиртовых* и *ацетоновых* экстрактов М - I и при разных разбавлениях растворителем

Спиртовые М-I				Ацетоновые М-I			
λ , нм /ОП	I	II	III	λ , нм /ОП	I	II	III
	~420	~617	~662		~414	~605	~660
Исходный	2,2	0,4	1,1	Исходный	1,5	0,18	0,70
Разбавление спиртом в 3 раза	1,0 (0,7)	0,3 (0,13)	0,5 (0,34)	Разбавление ацетоном в 3 раза	0,6 (0,5)	0,13 (0,06)	0,30 (0,23)
Разбавление спиртом в 6 раз	0,5 (0,35)	0,08 (0,1)	0,20 (0,2)	Разбавление ацетоном в 6 раз	0,3 (0,25)	0,04 (0,03)	0,14 (0,12)

*в скобках значение оптической плотности, ОП, соответствующее степени показателю разбавления

Основной задачей этих измерений было оценить изменения оптической плотности при разбавлении растворов для определения возможного нарушения пропорциональной зависимости оптической плотности (ОП) от коэффициента разбавления за счет присутствия некоторого количества молекул пигментов в агрегированном состоянии в концентрированных растворах. Этот вопрос было необходимо выяснить, чтобы для изучения радиационно-химических превращений хлорофилловых и каротиноидных фракций выбирать такие концентрации исходных растворов, в которых присутствует меньшее количество агрегатов.

Под действием ионизирующего излучения агрегаты могут разрушаться, за счет этого увеличится концентрация одиночных молекул, что приведет к снижению *определяемого* значения радиационно-химического выхода разложения пигментов.

Представленные данные в таблице 3.1 показывают, что изменение оптической плотности полос фракций I (каротиноидной) и III (хлорофилловой) для спиртовых и ацетоновых растворов водорослей *Jenit* не следует прямой зависимости от коэффициента разбавления. В скобках отмечены ОП, которые должны соответствовать разбавлению. На основании этих данных сделан вывод о необходимости проведения радиолитических исследований в разбавленных растворах экстрактов.

3.1.3. Спектральные характеристики оптического поглощения спиртовых и ацетоновых экстрактов водорослей *Jemo-D* при различных разбавлениях

Спектры оптического поглощения 100 % спиртовых и 100 % ацетоновых экстрактов макроводорослей *Jemo(D)* (СФ-2000) при разных разбавлениях представлены на рис. 3.4 -а и рис. 3.4 -б. Изменение ОП соответствующих полос каротиноидных и хлорофилловых фракций экстрактов при разбавлении растворителем спиртом (ацетоном) данов таблице 3.2.

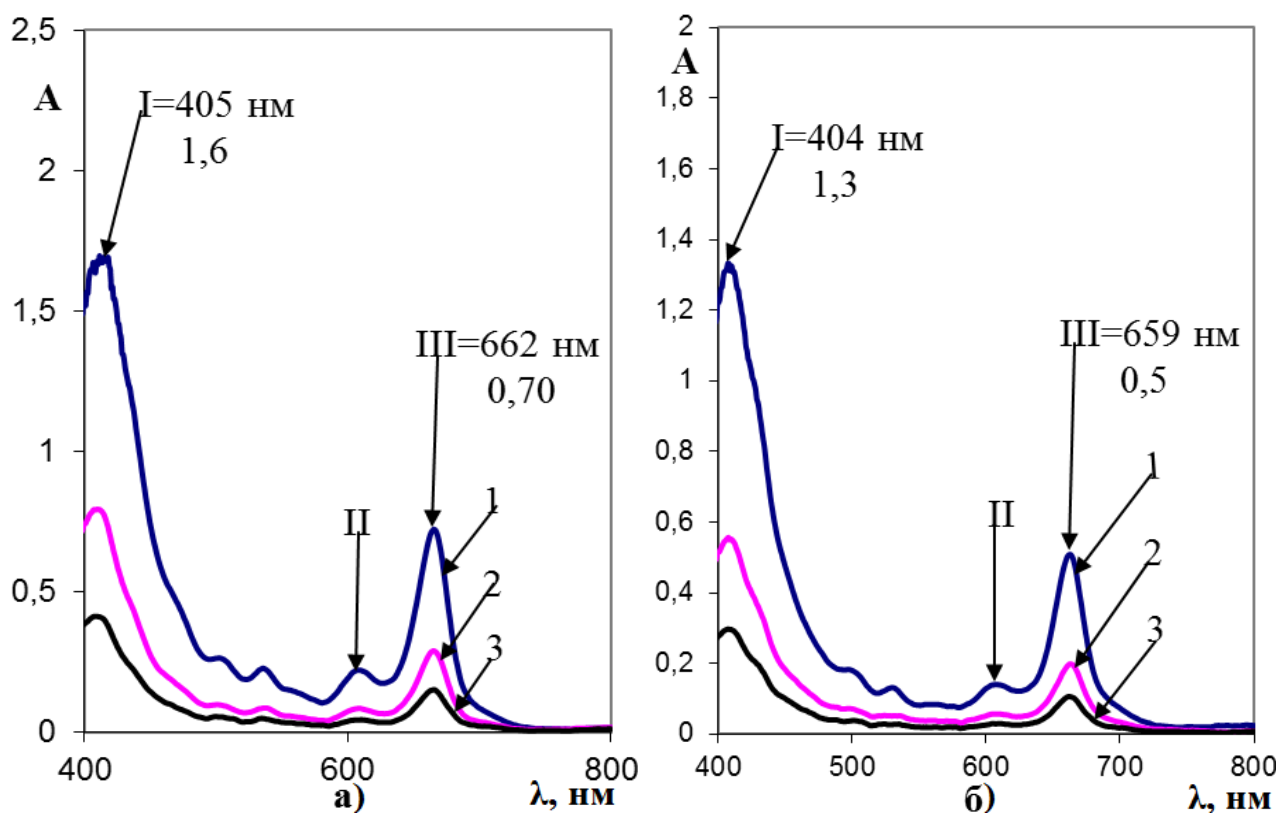


Рисунок 3.4. Спектры оптического поглощения 100 % спиртовых экстрактов **D-I**, -**а**); 100 % ацетоновых экстрактов **D-I**, -**б**): исходные образцы - **1**, при разбавлении в 3 раза - **2**, при разбавлении в 6 раз - **3**

Таблица 3.2. Спектральные характеристики оптического поглощения **100 % спиртовых** и **ацетоновых** экстрактов **D - I** и при разных разбавлениях растворителем

Спиртовые экстракты D - I				Ацетоновые экстракты D - I			
λ , нм /ОП	I	II	III	λ , нм /ОП	I	II	III
	~405	~610	~660		~404	~602	~660
Исходный	1,60	0,21	0,70	Исходный	1,3	0,13	0,50
Разбавл. в 3 раза	0,80 (0,53)	0,04 (0,07)	0,27 (0,23)	Разбавл. в 3 раза	0,5 (0,43)	0,02 (0,04)	0,18 (0,17)
Разбавл. в 6 раз	0,4 (0,26)	0,03 (0,03)	0,13 (0,12)	Разбавл. в 6 раз	0,27 (0,21)	0,01 (0,02)	0,10 (0,08)

*в скобках значение оптической плотности, ОП, соответствующее степени показателю разбавления

Анализ полученных данных по влиянию разбавления растворов экстрактов *Jemo-D* позволил также сделать заключение о наличии агрегированных состояний пигментов в концентрированных растворах. При разбавлении в растворах увеличивается содержание индивидуальных молекул и, соответственно получается более высокая оптическая плотность. На основании этих результатов сделан вывод о необходимости работы с растворами, содержащими активные биологические соединения, в которых концентрация компонент меняется пропорционально коэффициенту разбавления. Следует обратить внимание на тот факт, что и в спиртовых, и в ацетоновых растворах макроводорослей *Jenit* и *Jemo* больше подвержены агрегации соединения каротиноидных фракций.

3.1.4. Сравнение эффективности экстракции каротиноидных и хлорофилловых фракций из водорослей разных видов

Сравнение эффективности экстракции каротиноидных и хлорофилловых фракций из разных видов водорослей в водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактах макро- и микроводорослей представлены на рис. 3.5 -а и рис. 3.5 -б. Как показано, интенсивность поглощения каротиноидной и хлорофилловой фракций намного выше в образцах из свежих культивируемых микроводорослей *Cylindrotheca Closterium*, чем водорослей *Laminaria japonica*, образцы которой в сухом виде, хранились больше двух лет. Интенсивность каротиноидной водно-ацетоновой фракции (*Cylindrotheca Closterium*) на ~ 35 % выше чем, водно-спиртовой. Для водорослей *Laminaria japonica* М-II в водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактах содержание каротиноидной фракции одинаковое, в то время как для водорослей D-II в водно-спиртовом экстракте регистрируется существенное снижение ОП каротиноидов. При длительном хранении всех водорослей наблюдается резкое уменьшение содержания хлорофиллов. Следует обратить внимание, что условия культивирования этих

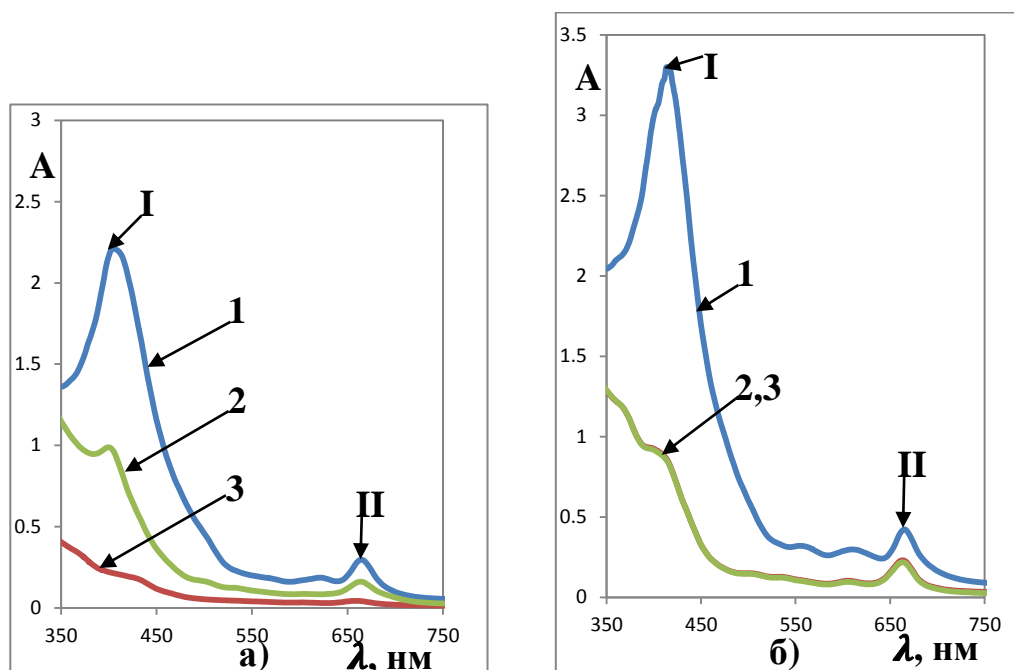


Рисунок 3.5. Спектры оптического поглощения 50 % водно-спиртовых экстрактов, разных видов водорослей -а); 50 % водно-ацетоновых экстрактов разных видов водорослей -б): *Cylindrotheca Closterium* - 1, *Laminaria*: 2 - М-II, 3 - D-II

водорослей различны. Микроводоросли *Cylindrotheca Closterium* отличаются тем, что они выращены в режиме накопительного культивирования в модифицированной питательной среде, приготовленной на стерильной морской воде. Макроводоросли *Laminaria japonica Jenit* (М) и *Jemo* (D) выращиваются в пресной воде природных водохранилищ [85].

3.2. Спектры оптического поглощения каротиноидных и хлорофилловых фракций в водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактах водорослей

3.2.1. Влияние разбавления на оптическое поглощение водно-спиртовых экстрактов водорослей *Jenit*-М и *Jemo*-D

Спектры оптического поглощения водно-спиртовых экстрактов (СФ-2000) в зависимости от природы водорослей (М и D) и разбавления исходных экстрактов М-II и D-II водно-спиртовыми растворами, представлены на рис. 3.6 -а), -б). Для разбавления экстракта в 3 раза брали 1 мл экстракта и добавляли 2

мл водно-спиртового раствора. Для разбавления экстракта в 6 раз брали 1 мл экстракта и добавляли 5 мл водно-спиртового раствора. Изменения оптической плотности полос поглощения отдельных компонентов за счет разбавления экстрактов растворителем представлены в таблице 3.3.

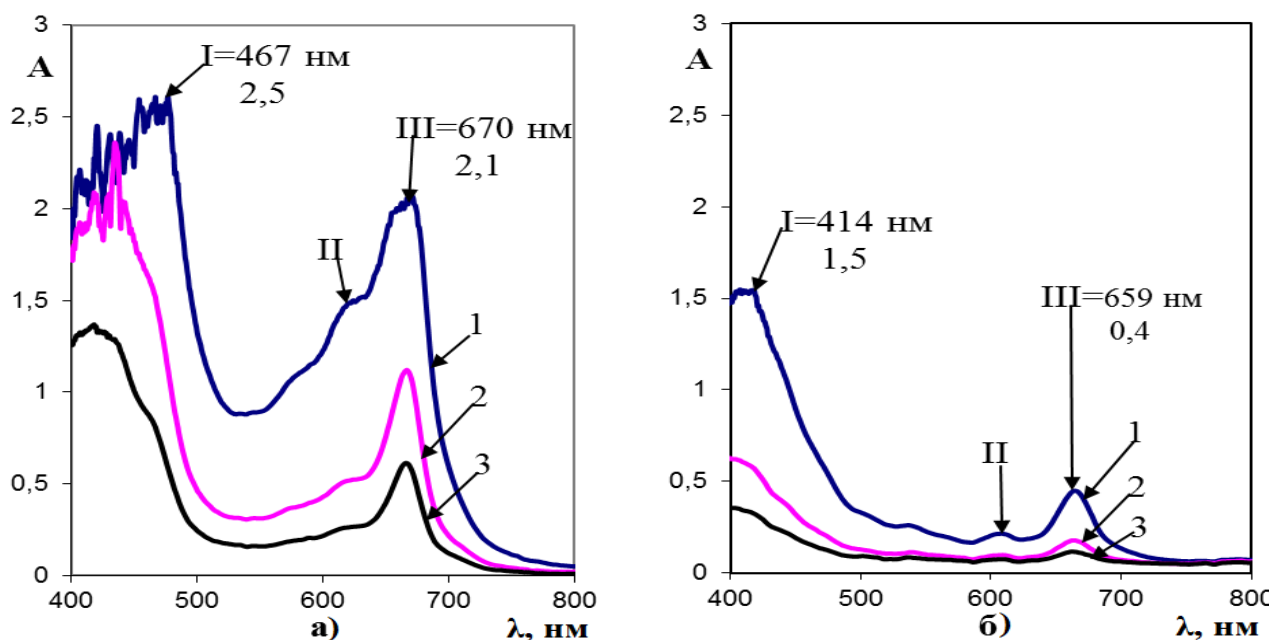


Рисунок 3.6. Спектры оптического поглощения **50 %** водно-спиртовых экстрактов **М-П, -а)**; **Д-П, -б)**: исходные экстракты - **1**, при разбавлении спирта водно-спиртовыми растворами: в 3 раза - **2**, в 6 раз - **3**, раствор сравнения - растворитель

Таблица 3.3. Спектральные характеристики оптического поглощения *водно-спиртовых* экстрактов М - П и Д - П при разных разбавлениях растворителем

λ , нм /ОП	I	II	III	λ , нм /ОП	I	II	III
	~430	~620	~660		~410	~600	~660
Исходный М - П	2,4	1,5	2,1	Исходный Д - П	1,5	0,20	0,40
Разбавление в 3 раза	2,3 (0,8)	0,52 (0,3)	1,1 (0,7)	Разбавление в 3 раза	0,6 (0,5)	0,07 (0,06)	0,16 (0,1)
Разбавление в 6 раз	1,3 (0,4)	0,26 (0,25)	0,60 (0,35)	Разбавление в 6 раз	0,3 (0,25)	0,06 (0,03)	0,10 (0,06)

*в скобках значение оптической плотности, ОП, соответствующее степени показателю разбавления

Можно видеть, что в водно-спиртовых растворах (рис. 3.6. -а и -б) при разбавлении 50 % растворов оптическая плотность уменьшается не пропорционально коэффициенту разбавления, особенно это выражено у водорослей *Jenit*-М-П.

3.2.2. Влияние разбавления на оптические свойства водно-ацетоновых экстрактов водорослей *Jenit*-М и *Jemo*-D

Спектры оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов (СФ-2000) в зависимости от природы водорослей (М и D), полученных добавлением водно-ацетоновых растворов в исходные экстракты М-П и D-П, представлены на рис. 3.7 -а), -б). Для разбавления экстракта в 3 раза брали 1 мл экстракта и добавляли 2 мл водно-ацетонового раствора, а для разбавления экстракта в 6 раз брали 1 мл экстракта и добавляли 5 мл водно-ацетонового раствора.

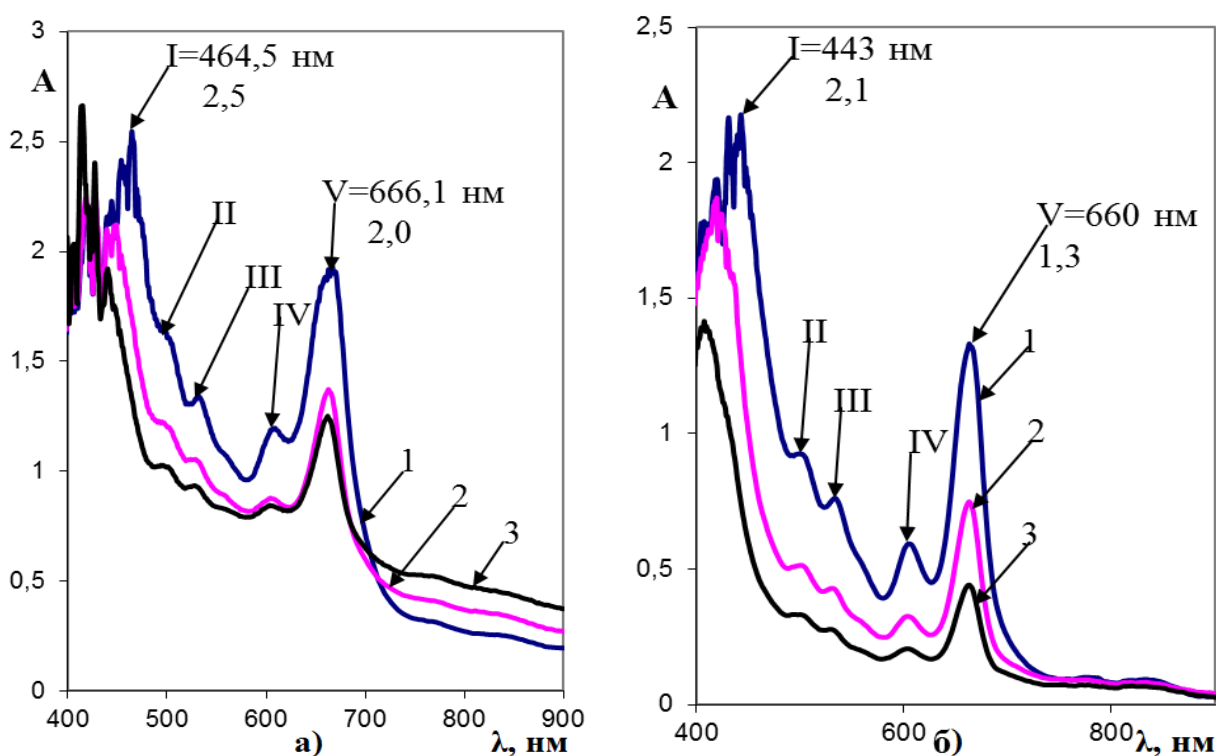


Рисунок 3.7. Спектры оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов М-П, -а); D-П, -б): исходные образцы - 1, при разбавлении водно-ацетоновым раствором в 3 раза - 2, при разбавлении в 6 раз - 3

Изменение оптической плотности полос поглощения пигментов представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов М -II и D- II при разных разбавлениях водно-ацетоновых экстрактов

λ , нм /ОП	I	IV	V	λ , нм /ОП	I	IV	V
	~ 464	~ 600	~ 660		~ 440	~ 600	~ 660
Исходный М-II	2,5	1,1	2,0	Исходный D - II	2,1	0,51	1,3
Разбавл. ацетона водой в 3 раза	2,0 (0,83)	0,8 (0,37)	1,3 (0,66)	Разбавл. ацетона водой в 3 раза	1,8 (0,7)	0,3 (0,17)	0,7 (0,43)
Разбавл. ацетона водой в 6 раз	1,8 (0,42)	0,7 (0,18)	1,7 (0,33)	Разбавл. ацетона водой в 6 раз	1,4 (0,4)	0,2 (0,09)	0,4 (0,22)

*в скобках значение оптической плотности, ОП, соответствующее степени показателю разбавления

Анализ полученных результатов (таблица 3.4) позволяет сделать вывод о том, что при дополнительном разбавлении растворов растворителем (50 % водно-ацетоновым раствором) (рис. 3.7) ОП разбавленных растворов возрастает, т.е. увеличивается эффективность извлечения молекул пигментов или распадаются агрегаты молекул.

3.2.3. Влияние разбавления на спектры оптического поглощения водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов *Cylindrotheca Closterium*

Спектры оптического поглощения водно-спиртовых (этанол) и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей *C. Closterium* (ИнБИОМ, г. Севастополь) (СФ-2000) представлены на рис 3.8 -а), -б). Для водно-ацетоновых экстрактов растворителем был 50 % водно-ацетоновый раствор при тех же самых разбавлениях.

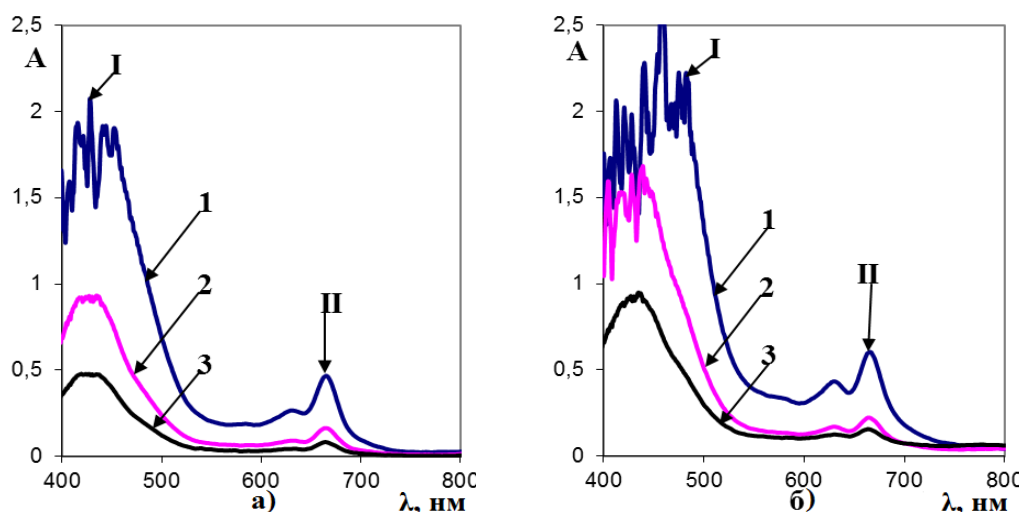


Рисунок 3.8. Спектры оптического поглощения водно-спиртовых экстрактов *Cyndrotheca Closterium* -а); водно-ацетоновых экстрактов *Cyndrotheca Closterium* -б): исходные образцы - 1, при разбавлении в 3 раза - 2, при разбавлении в 6 раз - 3

Изменение оптической плотности при $\lambda_{\text{макс}}$ отдельных компонентов растворов водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов водорослей *C.Closterium* представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5. Изменения характеристик спектров поглощения водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов *C.Closterium* при разных разбавлениях

образец	λ , нм / ОП			
	<i>C. Closterium</i> (водно-спиртовый)		<i>C. Closterium</i> (водно-ацетоновый)	
	I ~ 430 нм	II ~ 660 нм	I ~ 461 нм	II ~ 662 нм
Исходные экстракты	2,07	0,41	2,42	0,59
Разбавление в 3 раза	0,93(0,69)	0,15(0,13)	1,62(0,80)	0,22(0,19)
Разбавление в 6 раз	0,48(0,34)	0,07(0,06)	0,90(0,40)	0,16(0,09)

*в скобках значение ОП(i), соответствующее показателю степени разбавления

На основании данных (рис. 3.8 и таблица 3.5) можно сделать вывод о том, что оптическая плотность водно-спиртовых экстрактов *C.Closterium* при

разбавлении выше, чем значение ОП, соответствующее коэффициентам разбавления. Например, значение ОП ($\lambda \sim 430$ нм) при разбавлении в 3 раза должно быть 0,69, а по экспериментальным данным - 0,93. Кроме этого, в водно-ацетоновых экстрактах для каротиноидной фракции это различие ещё выше: 0,80, а зарегистрировали - 1,62. Это может указывать на значительно более высокое содержание в концентрированных растворах молекул каротиноидов в агрегированном состоянии (ассоциатов).

3.3. Влияние облучения водорослей *Laminaria japonica* и *Cylindrotheca Closterium* в сухом виде на процесс экстракции биологически активных соединений

3.3.1. Оптические свойства водно-спиртовых экстрактов *Laminaria japonica Jenit* и *Jemo*, облученных в сухом виде при дозе 15 ÷ 22 кГр

Особое внимание было уделено изучению эффективности экстракции биологически активных компонент из макроводорослей *Laminaria japonica Jenit (M)* и *Jemo (D)* и, для сравнения микроводорослей *C. Closterium* после облучения в сухом виде потоком ускоренных электронов при дозах облучения от 15 до 22 кГр и мощности дозы 3 кГр/с (ускоритель УЭЛВ-10-10-Т-1, ИФХЭ РАН). Следует отметить, что эти две группы водорослей различаются условиями культивирования. Макроводоросли *Laminaria japonica, Jenit (M)* и *Jemo (D)* культивированы в пресной воде, а микроводоросли *Cylindrotheca Closterium* - в морской воде. Исследования, проведенные в ИНБЮМ подтвердили, что именно переход на культивирование водорослей в морской воде позволило повысить почти в два раза выход ксантофилла фукоксантина [13]. Результаты исследования оптических свойств и радиационно-химических превращений экстрактов водорослей *C. Closterium*, представленные в гл. 3.3.2 и на рис. 3.11, показали их высокую радиационную стойкость.

Для облучения макроводорослей *Laminaria japonica, Jenit* и *Jemo* (из сухого сырья, Δt хранения ~ 3 года) и микроводорослей *C. Closterium* (из сухого

сырья, Δt хранения ~2-месяца.) были подготовлены по 2 образца этих 3-х водорослей (навески ~ 2,5 г), которые помещались в целлофановые пакеты. После облучения образцы водорослей переносили в колбы с этанолом (50 мл), а другие образцы тех же водорослей - в колбы с 50 % водно-этанольным раствором (50 мл). Для более полной экстракции БАС образцы растворов водорослей выдерживались при $T_{\text{комн.}}$ в течение 10 суток.

На рис. 3.9 -А и рис. 3.9 -Б представлены спектры оптического поглощения этанольных и водно-этанольных растворов водорослей *Jemo* (D-I и D-II) до и после облучения ускоренными электронами.

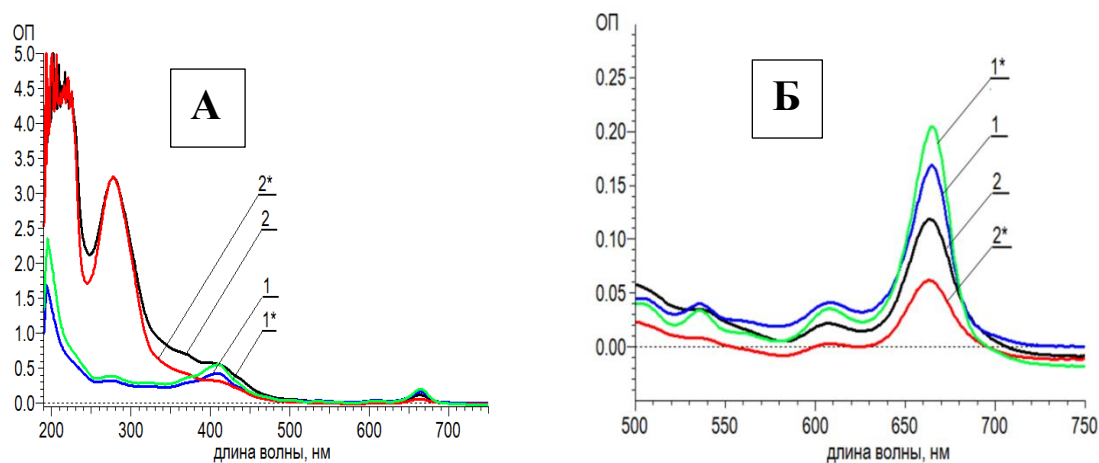


Рисунок 3.9. Спектры поглощения этанольных *Jemo* (D-I) (1) и водно-этанольных экстрактов *Jemo* (D-II)-(2) – А) и для хлорофилловой фракции -Б); до облучения – 1 и 2, после облучения – 1* и 2*, доза облучения ~ 18 кГр. Спектрофотометр Hitachi 3100

При сравнении спектров спиртовых и водно-спиртовых экстрактов водорослей *Jemo* (D), облученных образцов сухого сырья, следует обратить внимание на высокую радиационную стабильность (рис. 3.9 -А) фракций флавоноидов, кислот (поглощение в УФ-области) и каротиноидных фракций (в спиртовых растворах). При этих же условиях облучения и экстрагирования, оптические плотности хлорофиллов после облучения изменились в зависимости от природы используемых растворителей. Так при экстракции облученных водорослей *Jemo*-D в 100 % растворе этанола ОП хлорофилловой фракции после облучения сырья *увеличилась* на ~ 23 %, в то время как в

экстракте в 50 % растворе этанола зарегистрировано уменьшение ОП, а значит и содержания хлорофиллов - почти на ~ 50 % (рис. 3.9 -Б).

Проведено сравнение спектров исходных водорослей *Jenit* (М), выделенных из сухих образцов водорослей и из образцов этих же водорослей, предварительно облученных в сухом виде. Спектры оптического поглощения этанольных и водно-этанольных растворов водорослей *Jenit* (М-I и М-II) представлены на рис. 3.10 - А и - Б.

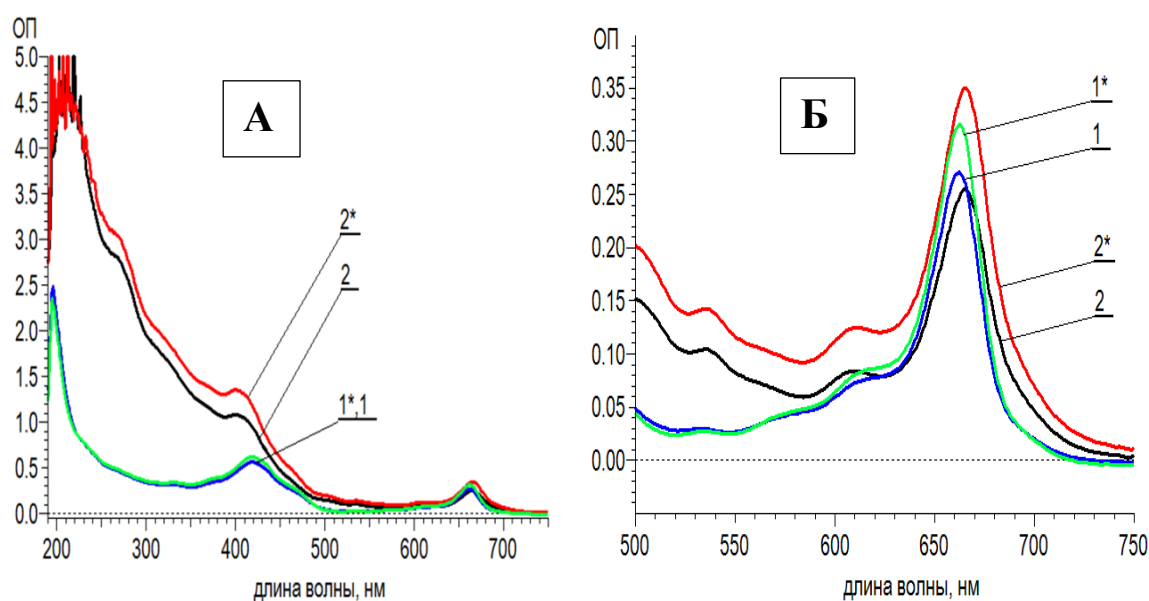


Рисунок 3.10. Спектры поглощения этанольных *Jenit* (М-I)-(1) и водно-этанольных экстрактов *Jenit* (М-II)-(2) – А) и для хлорофилловой фракции - Б); до облучения – 1 и 2, после облучения – 1* и 2*, доза облучения ~18 кГр. Спектрофотометр Hitachi 3100

Сравнение спектров оптического поглощения, представленных на рис. 3.9 и 3.10 - А и - Б позволяет зарегистрировать полосы поглощения соединений в УФ-области, которые также, как и пигменты каротиноидных фракций в экстрактах из облученных образцов *Jenit*-М, имеют близкие значения с необлученными образцами. Это говорит о высокой радиационной стабильности полифенольных соединений и каротиноидов при облучении водорослей в диапазоне доз, принятых в биотехнологии для стерилизации сырья. Содержание хлорофиллов в водорослях *Jenit*-М после таких доз облучения при экстракции в 50 % водно-спиртовой раствор увеличивается, возможно за счет

радиационной деструкции тканей и разрыва связей в комплексах молекул хлорофиллов с другими компонентами.

3.3.2. Оптические свойства этанольных экстрактов водорослей

Cylindrotheca Closterium, облученных в сухом виде при дозе 15 ÷ 22 кГр

Спектры оптического поглощения этанольных растворов водорослей *Cylindrotheca Closterium* из образцов исходного и облученного сырья представлены на рис. 3.11.

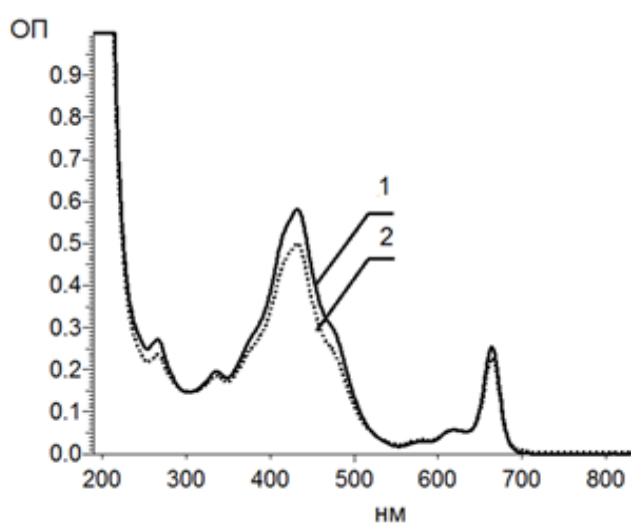


Рисунок 3.11. Спектры оптического поглощения этанольных растворов экстрактов из высушенной биомассы водорослей *C. Closterium* - 1, этанольных растворов экстрактов из сухой биомассы водорослей, облученной при дозе = 22 кГр - 2

Следует обратить внимание (рис. 3.11) на малые отличия и интенсивности характерных полос поглощения и структуры спектров экстрактов из облученных (доза ~ 22 кГр) и необлученных образцов *C. Closterium*. Полученные результаты показали высокую радиационную стабильность каротиноидов (~89%), что подтверждает возможность использования радиационной стерилизации при сохранении такого важного природного соединения (фукоксантина) в культивируемой морекультуре.

Проведенное сравнение изменений спектров ОП экстрактов после воздействия ионизирующего излучения на различные виды водорослей в сухом виде: макроводорослей *Jemo*, *Jenit* и микроводоросли *C. Closterium*, позволило зарегистрировать влияние природы водорослей, растворителей на экстракцию различных соединений из облученных сухих образцов водорослей. Эти данные

подтверждают необходимость проведения предварительного исследования радиационно-химических превращений БАС из конкретных видов водорослей для определения доз, допустимых для стерилизации сырья.

3.4. Моделирование окислительно-восстановительных реакций в растворах водно-органических экстрактов водорослей за счет изменения условий облучения: аэробных, анаэробных и в присутствии закиси азота

3.4.1. Изменения спектров оптического поглощения водно-этанольных экстрактов водорослей *Jenit*-М

Спектры оптического поглощения *исходных* 50% водно-этанольных экстрактов М-II(*Jenit*) и *после облучения* в присутствии кислорода воздуха (а), в анаэробных условиях после насыщения Ar (б) и после насыщения N₂O (в), представлены на рис. 3.12. На вставках в увеличенном масштабе - полосы поглощения хлорофиллов (V). Изменения спектральных характеристик отдельных компонентов экстрактов в результате радиолитических превращений: уменьшение (-) или повышение (+) исходной ОП, представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6. Спектральные характеристики оптического поглощения *водно-спиртовых* экстрактов М-II при разных условиях облучения

М-II (<i>Jenit</i>) λ , нм/ОП											
O ₂				Ar				N ₂ O			
D, кГр	I ~420	IV ~610	V ~670	D, кГр	I ~420	IV ~610	V ~670	D, кГр	I ~420	IV ~620	V ~670
0	2,02	0,39	0,76	0	2,02	0,39	0,76	0	2,02	0,39	0,76
0,28	2,01	0,31	0,61	0,28	1,93	0,28	0,51	0,28	1,90	0,36	0,54
0,56	2,01	0,29	0,60	0,56	1,93	0,27	0,41	0,56	1,70	0,24	0,30
0,84	2,02	0,26	0,55	0,84	-	-	-	0,84	-	-	-
1,1	1,90	0,30	0,57	1,1	1,50	0,24	0,26	1,1	1,60	0,23	0,27
G, %	6.0	23	25	G, %	25	38	65	G, %	20,7	41	64

ОП - оптическая плотность; G, % выход радиационно-химического разложения или повышения содержания пигмента(+)

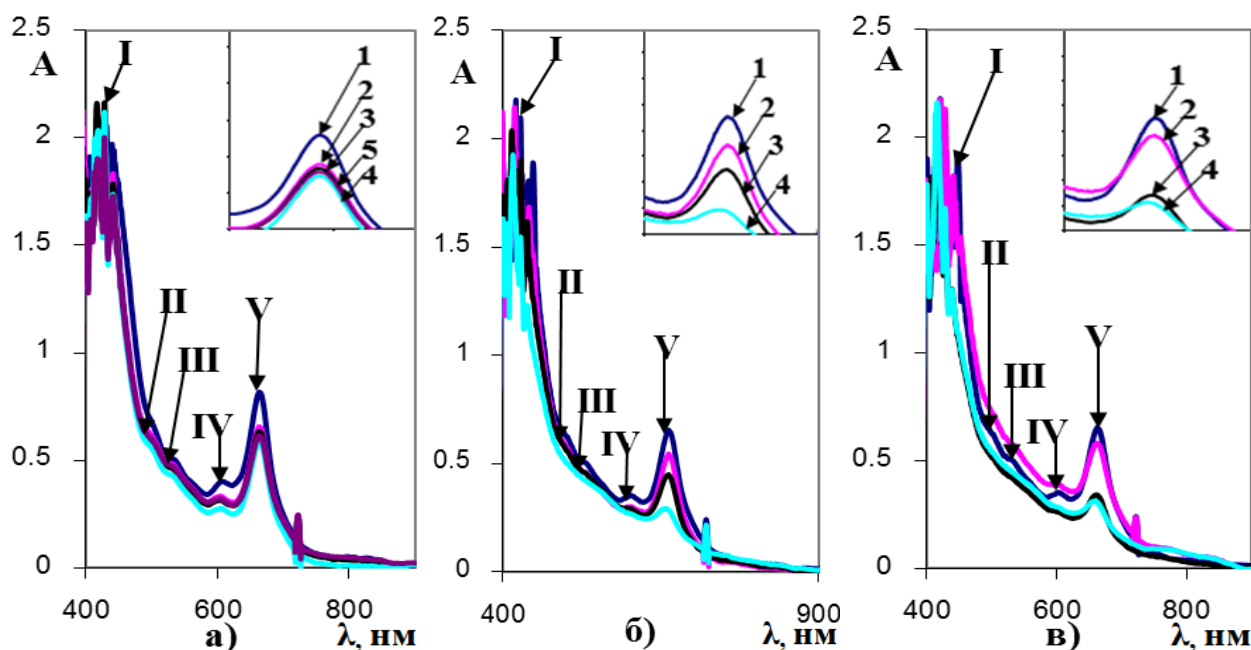


Рисунок 3.12. Спектры оптического поглощения 50 % водно-этанольных экстрактов в присутствии кислорода М-II (*Jenit*), -а); насыщенных Ar -б) и насыщенных N_2O -в):

На вставках фрагменты спектров: исходные образцы - 1, облученные при дозе, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; для рис. -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5

При насыщении водно-спиртовых растворов М-II (*Jenit*) (Ar) аргоном, в отсутствие кислорода (рис. 3.12 -б), зарегистрировано существенное изменение радиационного выхода БАС, особенно снижение хлорофиллов. В присутствии O_2 (рис. 3.12 -а) происходит реакция взаимодействия молекул кислорода с промежуточными продуктами радиолиза БАВ, приводящая к частичной регенерации исходных соединений. Особенно этим свойством обладают каротиноиды [48]. С целью изменения условий облучения и увеличения концентрации окислительных частиц радиолиза, в основном радикалов OH, растворы экстрактов перед облучением насыщали N_2O в течение 40 мин. В присутствии N_2O (рис. 3.12 -в) за счет реакции дополнительного образования радикалов OH (реакция 12), обладающих высоким окислительным потенциалом, при некоторых дозах облучения наблюдается *некоторое* повышение оптической плотности, отвечающее за образование

дополнительных продуктов радиолитического окисления. Важно отметить, что величина эффекта повышения выхода продуктов окисления за счет присутствия N_2O в облучаемых образцах зависит от вида водорослей и природы растворителя.

3.4.2. Изменения спектров поглощения водно-этанольных экстрактов водорослей *Jeto* - D

Спектры оптического поглощения исходных 50 % водно-этанольных экстрактов D-II(*Jeto*) и после облучения в присутствии кислорода воздуха (а), в анаэробных условиях после насыщения Ar (б) и после насыщения N_2O (в), представлены на рис. 3.13. На вставках в увеличенном масштабе - полосы поглощения хлорофиллов (V). Изменения спектральных характеристик отдельных компонентов экстрактов в результате радиолитических превращений: уменьшение или повышение (+) исходной ОП, представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-этанольных экстрактов D-II при разных условиях облучения

D-II (<i>Jeto</i>) λ , нм/ОП											
O_2				Ar				N_2O			
D, кГр	I ~420	IV ~620	V ~660	D, кГр	I ~420	IV ~620	V ~660	D, кГр	I ~420	I ~620	V ~670
0	1,83	0,15	0,45	0	1,83	0,15	0,45	0	1,83	0,15	0,45
0,28	1,70	0,21	0,44	0,28	1,45	0,15	0,29	0,28	1,42	0,33	0,50
0,56	1,70	0,21	0,44	0,56	1,40	0,17	0,28	0,56	1,18	0,14	0,16
0,84	1,52	0,17	0,37	0,84	-	-	-	0,84	-	-	-
1,1	1,60	0,21	0,40	1,1	1,20	0,15	0,25	1,1	1,20	0,18	0,19
G, %	12,5	+ 40	11	G, %	34	0	44	G, %	34	+20	+57

*ОП - оптическая плотность; G, %- радиационный выход превращения пигментов

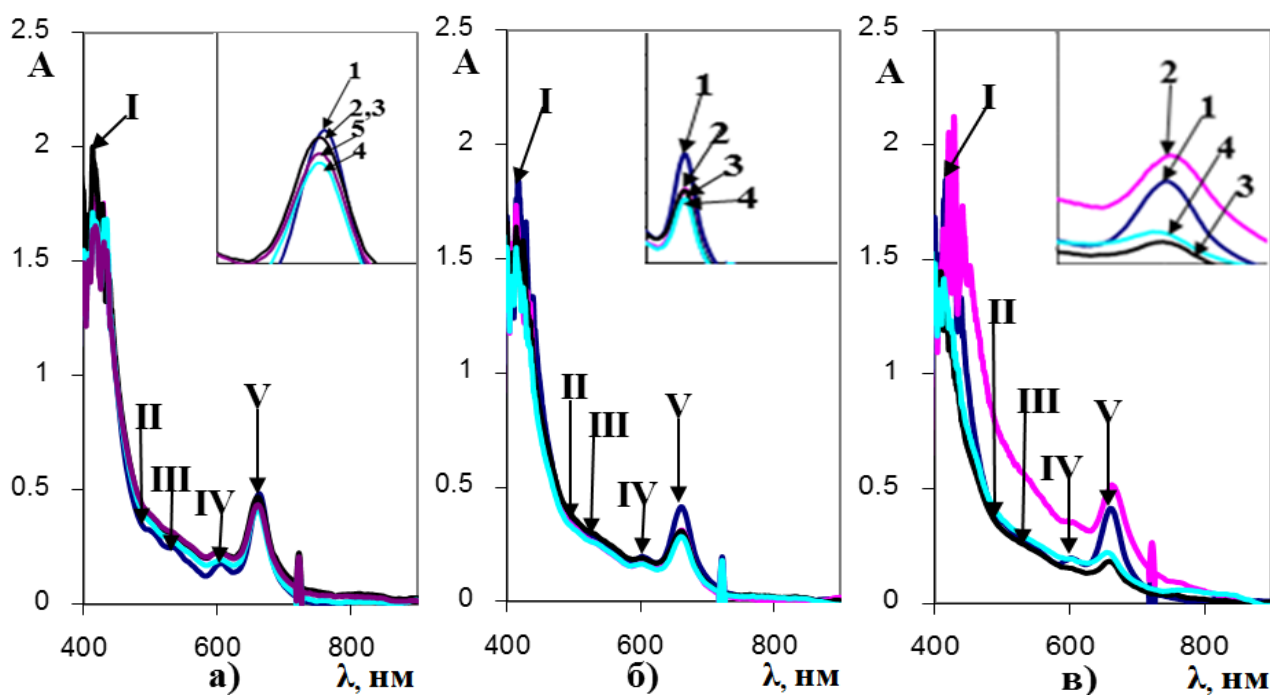


Рисунок 3.13. Спектры оптического поглощения 50% водно - этанольных экстрактов в присутствии кислорода D-II (*Jemo*), -а); насыщенных Ar -б) и насыщенных N_2O -в):

На вставках фрагменты спектров: исходные образцы - 1, облученные при дозе, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; для рис. -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5

При насыщении водно-спиртовых растворов D-II (*Jemo*) (Ar) аргонем, в отсутствие кислорода воздуха (рис. 3.13 -б), содержание биологически активных соединений меняется больше, чем в присутствии O_2 (рис. 3.13 -а). Как известно, в аэробных условиях реакции взаимодействия молекул кислорода с промежуточными продуктами радиолиза БАВ могут приводить к некоторой регенерации исходных соединений. В присутствии N_2O (рис. 3.13 -в) при дозе 0,28 кГр наблюдается значительное возрастание интенсивности оптического поглощения почти во всем диапазоне спектра, что можно объяснить образованием продуктов окисления за счет дополнительно образующихся радикалов OH в этих условиях. Так, более значительное повышение выхода продуктов окисления представлено для водно-спиртовых растворов D-II по сравнению с раствором M-II в главе 3.4.1.

3.5. Изменения спектров оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей после облучения при разных условиях

3.5.1. Спектры оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей *Jenit-M*

Спектры оптического поглощения *исходных* 50 % водно-ацетоновых экстрактов М-II (*Jenit*) и *после облучения* в присутствии кислорода воздуха (**а**), в анаэробных условиях после насыщения Ar (**б**) и после насыщения N₂O (**в**), представлены на рис. 3.14. На вставках в увеличенном масштабе - полосы поглощения хлорофиллов(V).

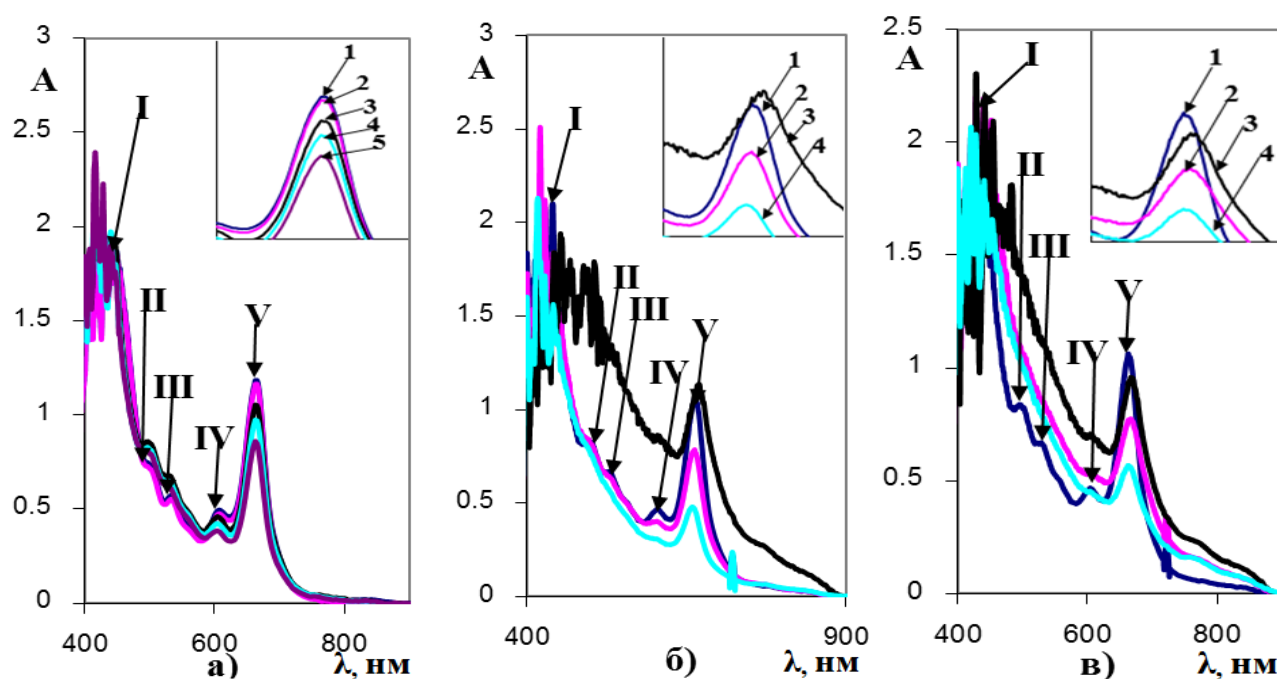


Рисунок 3.14. Спектры оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов в присутствии кислорода М-II (*Jenit*), -**а**); насыщенных Ar -**б**) и насыщенных N₂O -**в**):

На вставках: исходные образцы - **1**, облучение при дозе, кГр: 0,28 - **2**, 0,56 - **3**, 1,1 - **4**; для рис. -**а**) 0,84 - **4**, 1,1 - **5**

Спектральные характеристики отдельных компонентов экстрактов представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8. Спектральные характеристики оптического поглощения *водно-ацетоновых* экстрактов М-II при разных условиях облучения

М-II (<i>Jenit</i>) λ , нм/ОП											
O ₂				Ar				N ₂ O			
D,кГр	I ~420	IV ~620	V ~660	D,кГр	I ~420	IV ~620	V ~660	D,кГр	I ~420	IV ~620	V ~660
0	1,95	0,47	1,13	0	1,95	0,47	1,13	0	1,95	0,47	1,13
0,28	1,94	0,46	1,12	0,28	1,60	0,37	0,72	0,28	1,73	0,50	0,76
0,56	1,87	0,41	1,01	0,56	1,55	0,80	1,12	0,56	1,82	0,66	0,94
0,84	1,75	0,38	0,90	0,84	-	-	-	0,84	-	-	-
1,1	1,85	0,36	0,79	1,1	1,39	0,28	0,44	1,1	1,65	0,42	0,55
G,%	5,1	23	30	G,%	28,7	+40	61	G,%	15,3	10,6	51,3

ОП - оптическая плотность; G, %- радиационный выход превращения пигментов

При насыщении водно-ацетоновых растворов М-II (*Jenit*) (Ar) аргоном, в отличие от водно-спиртовых растворов, облучение при дозе 0,56 кГр в отсутствие O₂ (рис. 3.14 -б), приводит к увеличению содержания продуктов радиолиза. Облучение М-II в водно-ацетоновых растворах в присутствии O₂ (рис. 3.14 -а) приводит к уменьшению содержания БАС, но *без регенерации*. В присутствии N₂O (рис. 3.14 -в) наблюдается увеличение интенсивности полос поглощения за счет образования новых продуктов окисления с большими коэффициентами экстинкции, чем исходные молекулы компонентов растворов экстрактов М-II.

3.5.2. Спектры оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей *Jemo-D*

Спектры оптического поглощения *исходных* 50 % водно-ацетоновых экстрактов D-II(*Jemo*) и *после облучения* в присутствии кислорода воздуха (а), в анаэробных условиях после насыщения Ar (б) и после насыщения N₂O (в), представлены на рис. 3.15. На вставках в увеличенном масштабе - полосы

поглощения хлорофиллов(V). Спектральные характеристики отдельных компонентов экстрактов представлены в таблице 3.9.

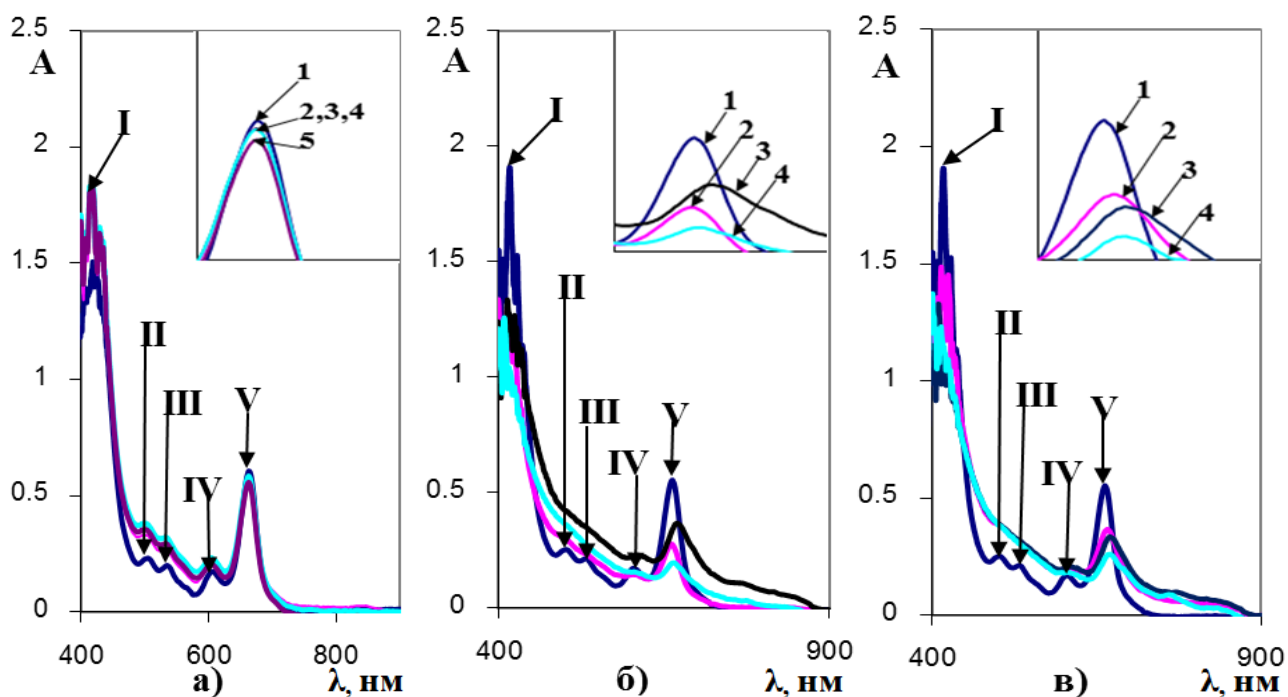


Рисунок 3.15. Спектры оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов D-II (*Jemo*) в присутствии кислорода, -а); Ar -б) и N₂O -в):

На вставках: исходные образцы - 1, облучение при дозе, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; для рис. -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5

Таблица 3.9. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов D-II при разных условиях облучения

D-II (<i>Jemo</i>) λ, нм/ОП											
O ₂				Ar				N ₂ O			
D, кГр	I ~420	IV ~620	V ~660	D, кГр	I ~420	IV ~620	V ~660	D, кГр	I ~421	IV ~630	V ~670
0	1,53	0,15	0,56	0	1,53	0,15	0,56	0	1,53	0,15	0,56
0,28	1,76	0,17	0,55	0,28	1,17	0,13	0,25	0,28	1,28	0,19	0,37
0,56	1,76	0,17	0,55	0,56	1,18	0,22	0,35	0,56	1,28	0,20	0,35
0,84	1,76	0,17	0,55	0,84	-	-	-	0,84	-	-	-
1,1	1,76	0,16	0,53	1,1	0,92	0,14	0,18	1,1	1,20	0,17	0,23
G, %	+15	+6,6	5,3	G, %	39,8	6,6	67	G, %	21,5	-13	58,9

*ОП - оптическая плотность; G, % - радиационный выход превращения пигментов

При насыщении водно-ацетоновых растворов D-II (*Jemo*) (**Ar**) аргоном (рис. 3.15 -б), наблюдается сильное уменьшение ОП, соответственно происходит разрушение пигментов за счет восстановительных реакций. В присутствии O₂ (рис. 3.15 -а) биологически активные соединения меняются не значительно, возможно за счет реакций с некоторой регенерацией пигментов. Анализ полученных результатов показал, что в водно-ацетоновых растворах *Jemo* в присутствии N₂O (рис. 3.15 -в) при воздействии ионизирующего излучения происходят сложные редокс - реакции с участием биологически активных соединений. При некоторых дозах облучения, некоторые реакции из них имеют *колебательный* характер, что выражается в характере зависимости ОП полос поглощения от дозы облучения. Такие же сложные зависимости ОП от дозы наблюдаются после облучения водно-ацетоновых растворов *Jemo*, насыщенных аргоном. По сравнению с водно-ацетоновыми растворами M-II в присутствии закиси азота в водно-ацетоновых растворах D-II наблюдаются меньшие изменения спектров.

3.5.3. Влияние облучения на спектры водно-этанольных и водно-ацетоновых экстрактов водорослей *Cylindrotheca closterium*

Спектры оптического поглощения *исходных* 50 % водно-этанольных экстрактов микроводорослей *Cylindrothe caclosterium* и *после облучения* в присутствии кислорода воздуха (**а**), в анаэробных условиях после насыщения Ar (**б**) и после насыщения N₂O (**в**), представлены на рис. 3.16. На вставках в увеличенном масштабе - полосы поглощения хлорофилла (V). Изменения спектральных характеристик отдельных компонентов экстрактов в результате радиолитических превращений представлены в таблице 3.10.

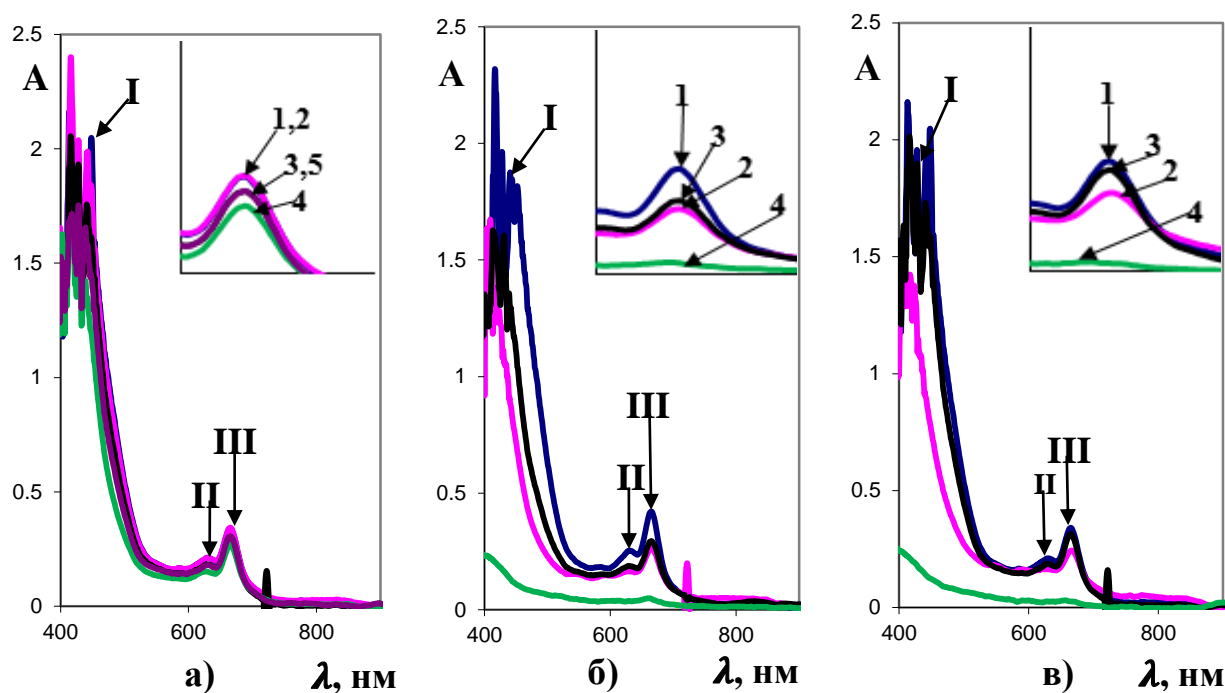


Рисунок 3.16. Спектры оптического поглощения 50% водно-спиртовых экстрактов в присутствии кислорода *Cyndrotheca closterium*, -а); насыщенных Ar -б) и насыщенных N₂O -в).

На вставках: спектры исходных образцов - 1, облученных при дозе, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; для рис. -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5

Таблица 3.10. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-спиртовых экстрактов микроводорослей *Cyndrotheca closterium* при разных условиях облучения

<i>Cyndrotheca closterium</i> λ, нм/ОП											
O ₂				Ar				N ₂ O			
D, кГр	I ~427	II ~623	III ~661	D, кГр	I ~427	II ~623	III ~661	D, кГр	I ~427	II ~623	III ~661
0	1,95	0,22	0,32	0	1,95	0,22	0,32	0	1,95	0,22	0,32
0,28	1,96	0,22	0,32	0,28	1,34	0,16	0,26	0,28	1,35	0,16	0,23
0,56	1,87	0,17	0,26	0,56	1,47	0,18	0,29	0,56	1,90	0,18	0,29
0,84	1,84	0,14	0,23	0,84	-	-	-	0,84	-	-	-
1,1	1,86	0,17	0,26	1,1	0,18	0,03	0,04	1,1	0,18	0,02	0,02
G, %	4,6	23	19	G, %	90	86	87	G, %	90	90	93

*ОП - оптическая плотность; G, % - радиационный выход превращения пигментов

При насыщении водно-спиртовых растворов микроводорослей *Cylindrotheca closterium* (Ar) аргоном (рис. 3.16 -б), закисью азота - N_2O наблюдается интенсивное снижение оптической плотности за счет радиолитического разложения пигментов, выход разложения G которых достигает ~ 90 %. Эти данные говорят о высокой радиационной чувствительности пигментов из микроводорослей *Cylindrotheca closterium*. С другой стороны, в присутствии O_2 (рис. 3.16 -а) содержание биологически активных соединений каротиноидной фракции при облучении меняются незначительно. Обнаружена высокая радиационная стабильность и хлорофиллов при облучении водно-спиртовых растворов этих водорослей. В присутствии N_2O (рис. 3.16 -в) в водно-спиртовых растворах *Cylindrotheca closterium* при облучении происходит почти полное разрушение всех пигментов.

Спектры оптического поглощения *исходных* 50% водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca closterium* и *после облучения* в присутствии кислорода воздуха (а), в анаэробных условиях после насыщения Ar (б) и после насыщения N_2O (в), представлены на рис. 3.17. На вставках в увеличенном масштабе - полосы поглощения хлорофиллов(V). Изменения спектральных характеристик отдельных компонентов экстрактов в результате радиолитических превращений: уменьшение или повышение (+) ОП, представлены в таблице 3.11.

При изменении условий облучения водно-ацетоновых растворов микроводорослей *Cylindrotheca closterium* за счет предварительного насыщения образцов разными газами (Ar) аргоном (рис. 3.17 -б), закисью азота N_2O (рис. 3.17 -в), в присутствии кислорода воздуха (рис. 3.17 -а) удается моделировать сложные окислительно-восстановительные реакции в этих модельных биологических системах.

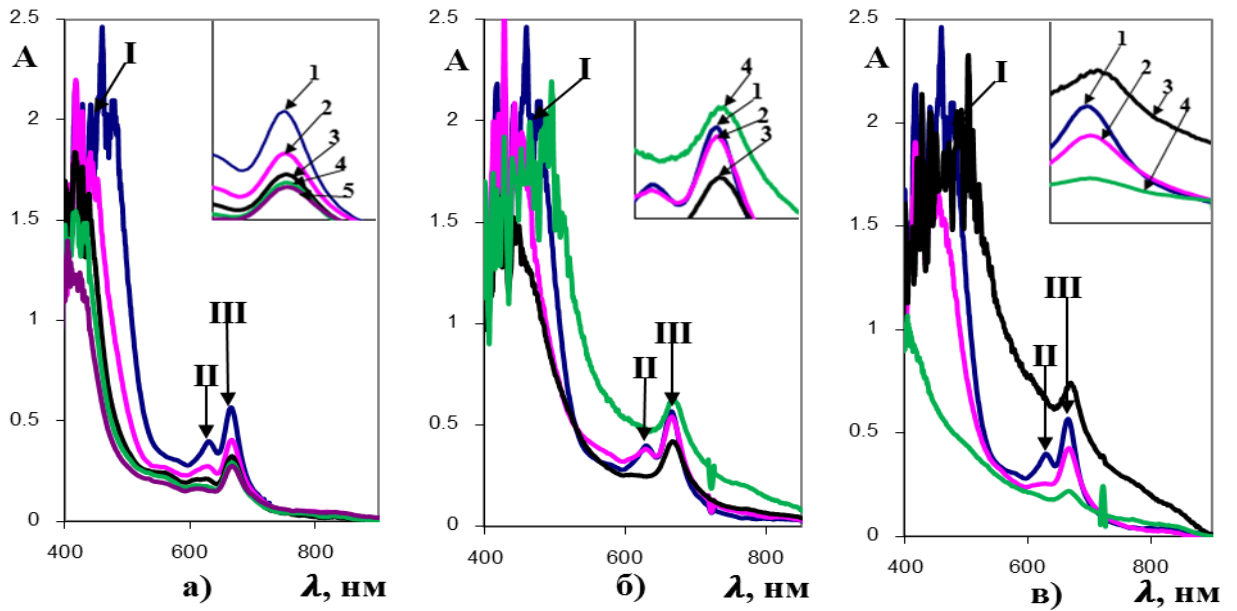


Рисунок 3.17 Спектры оптического поглощения 50% водно-ацетоновых экстрактов в присутствии кислорода *Cyldrotheca closterium*, -а); насыщенных Ar -б) и насыщенных N₂O -в): На вставках: исходные образцы - 1, облучение при дозе, кГр: 0,28 - 2, 0,56 - 3, 1,1 - 4; для рис. -а) 0,84 - 4, 1,1 - 5.

Таблица 3.11. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов *C.closterium* при разных условиях облучения

<i>Cyldrotheca closterium</i> λ, нм/ОП											
O ₂				Ar				N ₂ O			
D, кГр	I ~456	II ~632	III ~667	D, кГр	I ~456	II ~632	III ~667	D, кГр	I ~456	II ~632	III ~667
0	2,28	0,39	0,55	0	2,28	0,39	0,55	0	2,28	0,39	0,55
0,28	1,97	0,27	0,39	0,28	2,06	0,37	0,52	0,28	1,69	0,25	0,41
0,56	1,60	0,20	0,30	0,56	1,44	0,25	0,41	0,56	1,90	0,67	0,73
0,84	1,48	0,17	0,29	0,84	-	-	-	0,84	-	-	-
1,1	1,14	0,15	0,26	1,1	2,04	0,47	0,62	1,1	0,83	0,18	0,21
G, %	50	61	52	G, %	89	+ 20	+ 12	G, %	63	53	61

*ОП - оптическая плотность; G, % - радиационный выход превращения пигментов

Изменение спектров ОП образцов водорослей в ацетовых растворах в зависимости от малых доз облучения, до 1,1 кГр, позволяет сделать вывод о высокой акцепторной активности и хлорофиллов, и каротиноидов по отношению к промежуточным частицам радиолиза. Следовательно, эти

природные соединения в водно-ацетоновых средах можно предлагать в качестве активных радиопротекторов для защиты материалов, поверхностей конструкционных материалов, устройств.

Спектральные характеристики оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca closterium* при разных условиях облучения, представленные в таблице 3.11, показывают, что облучение этих экстрактов даже в присутствии кислорода воздуха приводит к существенному изменению содержания пигментов. В водно-ацетоновых образцах водорослей для некоторых компонент после облучения и в атмосфере аргона, и при насыщении N_2O можно обнаружить некоторые аномальные изменения ОП при увеличении дозы облучения. Вероятно, в этих условиях протекают более сложные радиолитические превращения водорослей.

Таким образом, представленные результаты превращений компонентов *каротиноидной* и *хлорофилловых фракций* в растворах, насыщенных разными газами при радиационно-химическом моделировании различных окс-редокс процессов в этих системах позволяют исследовать механизм антиокислительной и радиопротекторной активности важных биологически активных соединений в культивируемых морских водорослях.

Важно, что на основании данных, полученных методом импульсного радиолиза [38], можно сделать вывод о том, что в аэробных условиях молекулы пигментов водорослей, исследуемых в этой работе, также активно взаимодействуют с различными реакционными частицами радиолиза растворителей. Особенность механизма антиокислительной активности в аэробных условиях заключается в том, что пигменты водорослей не выступают в реакциях в виде «жертвы», а в виде катализаторов с высокой степенью регенерации.

3.6. Анализ спектральных характеристик различных растворов экстрактов водорослей в "пост радиационный период"

3.6.1. Изменение спектров поглощения водно-спиртовых экстрактов водорослей

При изучении изменений ОП водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов водорослей при хранении облученных образцов при $T_{\text{комн.}}$ (втемноте) было зарегистрировано не только разрушение пигментов в пострadiационный период, но и регенерация. Спектры оптического поглощения водно-спиртовых экстрактов *Jenit* М-II и *Jemo* D-II, насыщенных Ar (ПРЭ-5 дней), представлены на рис. 3.18 -а) и -б). Спектральные характеристики отдельных компонентов экстрактов представлены в табл. 3.12.

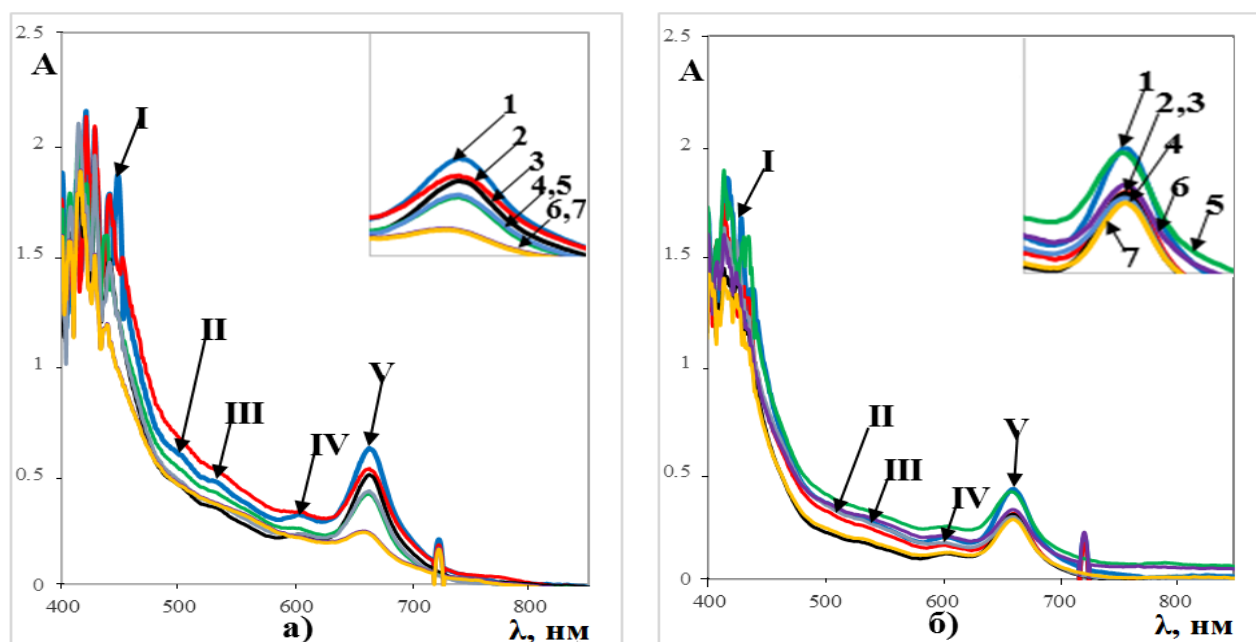


Рисунок 3.18. Спектры оптического поглощения 50% водно-спиртовых экстрактов, насыщенных Ar (ПРЭ-5 дней), М-II, -а); D-II, -б): исходные экстракты - 1, после облучения, D, кГр: 0,28 - 2, (ПРЭ - 3); 0,56 - 4, (ПРЭ - 5); 1,1 - 6, (ПРЭ - 7)

Важно отметить, что при облучении в деаэрированной системе наблюдается уменьшение оптической плотности полос пигментов при выбранных длинах волн, но при хранении в темноте *в присутствии кислорода*

воздуха за время 5 суток зарегистрировано увеличение оптической плотности *Chl* фракции в D-II (рис. 3.18 - б). Через 5 дней ОП образца D-II, облученного при дозе 0,56 кГр, увеличилась на ~ 21 %, что может свидетельствовать о дополнительном разрушении пигментов.

Таблица 3.12. Спектральные характеристики ОП *водно-спиртовых* экстрактов М-II и D-II (насыщение Ar) при разных дозах облучения, ПРЭ через 5 дней

λ , нм/ОП							
D, кГр	I ~420	IV ~614	V ~669	D, кГр	I ~419	IV ~616	V ~667
М-II 0	2,02	0,39	0,76	D-II 0	1,83	0,15	0,45
0,28	1,93	0,28	0,51	0,28	1,45	0,15	0,29
ПРЭ 5 дней	1,80	0,21	0,47	ПРЭ 5 дней	1,45	0,15	0,29
0,56	1,93	0,27	0,41	0,56	1,40	0,17	0,28
ПРЭ 5 дней	1,93	0,27	0,41	ПРЭ 5 дней	1,70	0,23	0,40
1,1	1,50	0,24	0,26	1,1	1,20	0,15	0,25
ПРЭ 5 дней	1,50	0,24	0,26	ПРЭ 5 дней	1,10	0,11	0,23

*ОП - оптическая плотность; *ПРЭ - пострадиационный эффект

Спектры оптического поглощения 50 % водно-спиртовых экстрактов, облученных в присутствии кислорода, **М-II** и **D-II**, и ПРЭ через 5 дней, представлены на рис. 3.19 -а) и -б). Спектральные характеристики отдельных компонентов экстрактов приведены в табл. 3.13.

По сравнению с данными, представленными на рис. 3.18, облучение экстрактов в присутствии кислорода приводит к меньшему изменению оптической плотности и деструкции пигментов (рис. 3.19). Важно отметить, что при облучении в аэробных условиях наблюдается некоторое уменьшение оптической плотности полос поглощения пигментов при выбранных длинах волн, но при хранении в темноте через 5 суток зарегистрировано увеличение оптической плотности *Chl* фракции в М-II после облучения при дозе 0,56 кГр

(рис. 3.19 -а), что, может свидетельствовать о вкладе реакции регенерации пигмента в пострадиационный период.

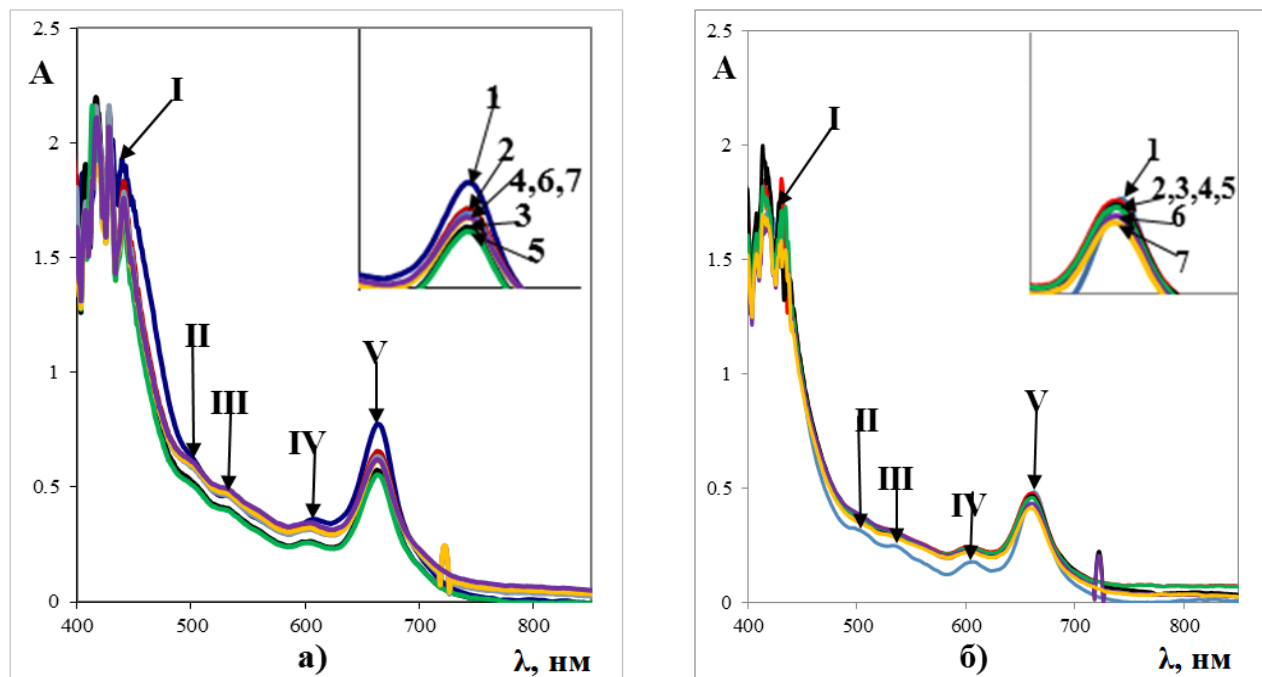


Рисунок 3.19. Спектры оптического поглощения 50%водно-спиртовых экстрактов, в присутствии кислорода (ПРЭ-5 дней), **М-II, -а); D-II, -б)**: исходные экстракты - **1**, после облучения, D, κГр: 0,28 - **2**, (ПРЭ - **3**); 0,56 - **4**, (ПРЭ - **5**); 1,1 - **6**, (ПРЭ - **7**)

Таблица 3.13. Спектральные характеристики оптического поглощения *водно-спиртовых* М-II и D-II, облученных в присутствии O₂, и ПРЭ через 5 дней

λ, нм/ОП							
D, κГр	I ~420	IV ~614	V ~669	D, κГр	I ~419	IV ~616	V ~667
М-II				D-II			
0	2,02	0,39	0,76	0	1,83	0,15	0,45
0,28	2,00	0,31	0,62	0,28	1,70	0,21	0,44
ПРЭ 5 дней	2,00	0,25	0,60	ПРЭ 5 дней	1,70	0,21	0,44
0,56	2,00	0,29	0,61	0,56	1,70	0,21	0,44
ПРЭ 5 дней	2,00	0,25	0,59	ПРЭ 5 дней	1,70	0,21	0,44
1,1	2,00	0,29	0,61	1,1	1,65	0,21	0,42
ПРЭ 5 дней	2,00	0,29	0,61	ПРЭ 5 дней	1,60	0,20	0,40

*ОП - оптическая плотность; *ПРЭ - пострадиационный эффект

Спектры оптического поглощения 50 % водно-спиртовых экстрактов М-II и D-II, насыщенных N_2O , через 5 дней после облучения при разных дозах представлены на рис. 3.20 -а) и -б). Данные по изменению оптической плотности отдельных компонентов экстрактов представлены в таблице 3.14.

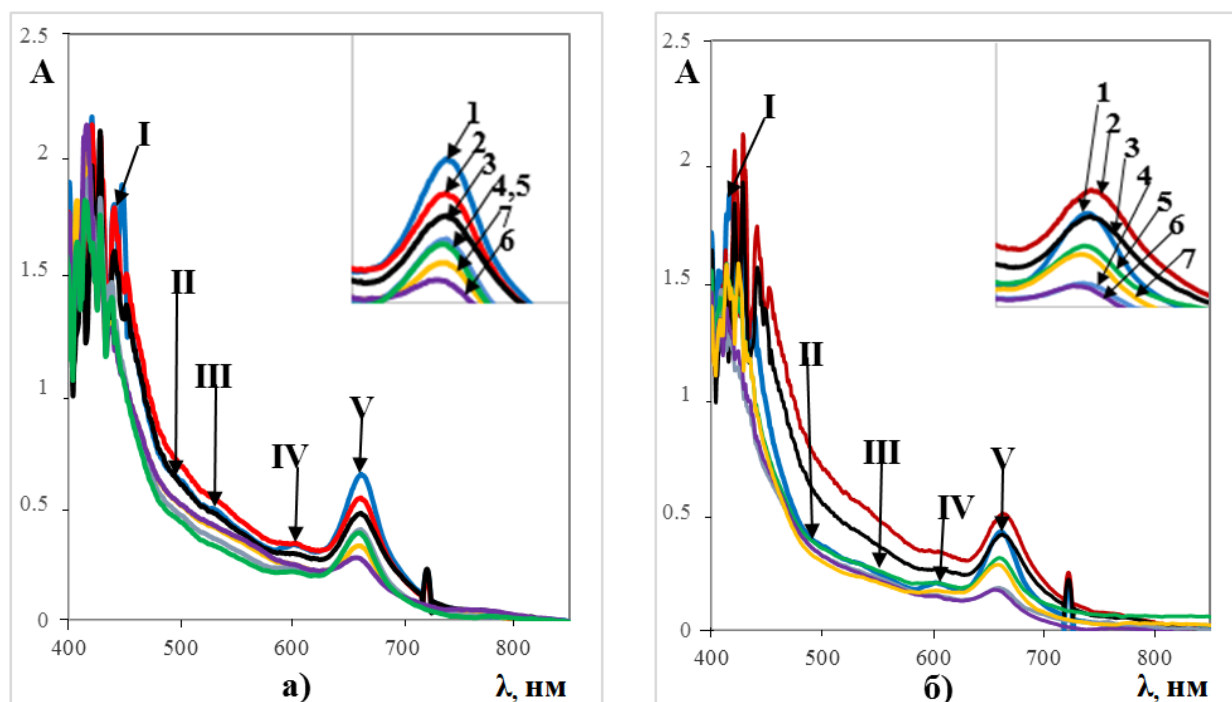


Рисунок 3.20. Спектры оптического поглощения 50% водно-спиртовых экстрактов, насыщенных N_2O (ПРЭ-5 дней), М-II, -а); D-II, -б): исходные экстракты - 1, после облучения, D, кГр: 0,28 - 2, (ПРЭ - 3); 0,56 - 4, (ПРЭ - 5); 1,1 - 6, (ПРЭ - 7)

При анализе спектров ОП видно, что в водно-спиртовых экстрактах в присутствии N_2O наблюдается ПРЭ *Chl* фракции в М-II и D-II только после облучения при дозе D=1,1 кГр (рис. 3.20 -а) и -б).

Таблица 3.14. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-спиртовых М-II и D-II (насыщение N₂O) при разных дозах облучения и ПРЭ через 5 дней

$\lambda, \text{нм/ОП}$							
D, кГр	I ~420	IV ~614	V ~669	D, кГр	I ~419	IV ~616	V ~667
М-II 0	2,02	0,37	0,76	D-II 0	1,83	0,15	0,45
0,28	1,90	0,36	0,54	0,28	1,90	0,33	0,50
ПРЭ 5 дней	1,55	0,31	0,44	ПРЭ 5 дней	1,84	0,24	0,44
0,56	1,70	0,20	0,38	0,56	1,17	0,14	0,16
ПРЭ 5 дней	1,70	0,20	0,38	ПРЭ 5 дней	1,19	0,15	0,27
1,1	1,60	0,23	0,27	1,1	1,18	0,12	0,15
ПРЭ 5 дней	1,75	0,21	0,33	ПРЭ 5 дней	1,19	0,13	0,25

*ОП - оптическая плотность; *ПРЭ - пострадиационный эффект

3.6.2. Изменение спектров поглощения водно-ацетоновых экстрактов водорослей в "пост радиационный период"

Спектры оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов водорослей **М-II** и **D-II**, насыщенных **Ar**, после облучения (ПРЭ-5 дней), представлены на рис. 3.21 -а) и -б). Спектральные характеристики отдельных компонентов экстрактов представлены в таблице 3.15.

При анализе спектров ОП видно, что в водно-ацетоновых экстрактах при насыщении **Ar** наблюдается ПРЭ *Chl* фракции в **М-II** и **D-II** после облучения образцов при дозе $D=1,1$ кГр (рис. 3.21 -а) и -б).

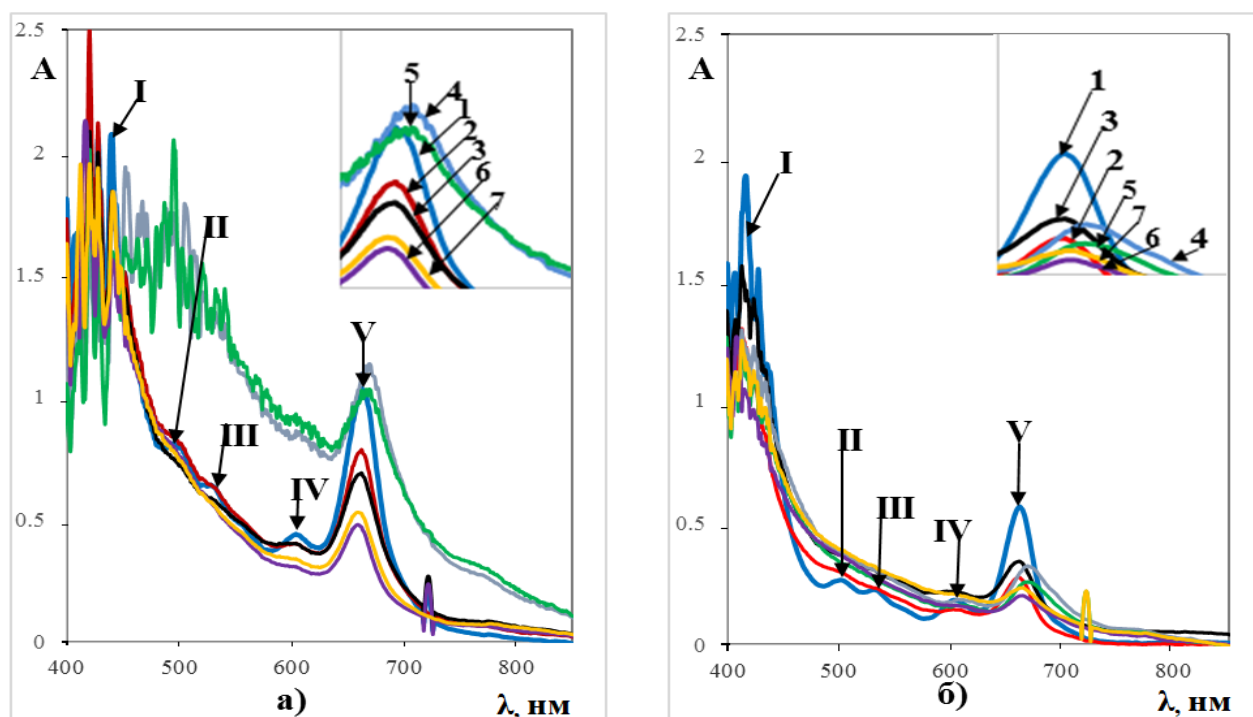


Рисунок 3.21. Спектры оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов, насыщенных Ar (ПРЭ -5 дней), **М-II**, -а); **Д-II**, -б): исходные экстракты - 1, после облучения, D, кГр: 0,28 - 2, (ПРЭ - 3); 0,56 - 4, (ПРЭ - 5); 1,1 - 6, (ПРЭ - 7)

Таблица 3.15. Спектральные характеристики оптического поглощения *водно-ацетоновых* М-II и Д-II (насыщение Ar) при разных дозах облучения и ПРЭ через 5 дней

λ , нм/ОП							
D, кГр	I	IV	V	D, кГр	I	IV	V
	~421	~616	~668		~421	~614	~667
М-II				Д-II			
0	1,95	0,47	1,13	0	1,53	0,15	0,56
0,28	1,60	0,37	0,72	0,28	1,17	0,13	0,25
ПРЭ 5 дней	1,59	0,37	0,67	ПРЭ 5 дней	1,43	0,20	0,36
0,56	1,55	0,80	1,15	0,56	1,18	0,22	0,35
ПРЭ 5 дней	1,54	0,82	1,13	ПРЭ 5 дней	1,11	0,19	0,24
1,1	1,39	0,32	0,44	1,1	0,92	0,14	0,18
ПРЭ 5 дней	1,39	0,34	0,46	ПРЭ 5 дней	1,12	0,15	0,22

*ОП - оптическая плотность; *ПРЭ - пострадиационный эффект

Спектры оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов в присутствии кислорода **М-II** и **Д-II** в присутствии O_2 (ПРЭ-5 дней), представлены на рис. 3.22. -а) и -б), спектральные характеристики отдельных компонентов экстрактов - в таблице 3.16.

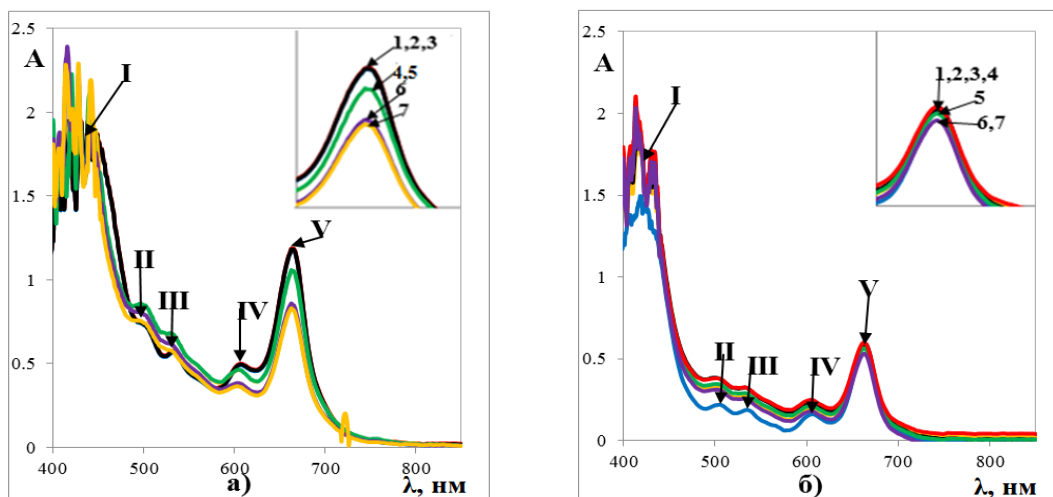


Рисунок 3.22. Спектры оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов, в присутствии кислорода (ПРЭ-5 дней), **М-II**, -а); **Д-II**, -б): исходные экстракты - 1, после облучения, D, кГр: 0,28 - 2, (ПРЭ - 3); 0,56 - 4, (ПРЭ - 5); 1,1 - 6, (ПРЭ - 7)

Таблица 3.16. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-ацетоновых М-II и Д-II, облученных в присутствии O_2 , и через 5 дней

λ , нм/ОП							
D, кГр	I	IV	V	D, кГр	I	IV	V
	~421	~616	~668		~421	~614	~667
М-II				Д-II			
0	1,95	0,47	1,13	0	1,53	0,15	0,56
0,28	1,94	0,46	1,12	0,28	1,76	0,24	0,55
ПРЭ 5 дней	1,94	0,46	1,12	ПРЭ 5 дней	1,76	0,23	0,55
0,56	1,87	0,41	1,01	0,56	1,76	0,23	0,55
ПРЭ 5 дней	1,87	0,41	1,01	ПРЭ 5 дней	1,76	0,23	0,54
1,1	1,85	0,36	0,79	1,1	1,76	0,16	0,53
ПРЭ 5 дней	1,85	0,35	0,78	ПРЭ 5 дней	1,76	0,16	0,53

*ОП - оптическая плотность; *ПРЭ - пострadiационный эффект

При радиолитизе водно-ацетоновых экстрактов в присутствии кислорода воздуха (рис. 3.22 -а) содержание пигментов каротиноидной фракции в М-П почти не меняется, а *Chl* фракции – снижается. В облученных образцах D-П (рис. 3.22 -б) оптическая плотность каротиноидной фракции выше, чем в исходных образцах, а оптическая плотность *Chl* фракции до дозы 1,1 кГр – не меняется.

Спектров оптического поглощения водно-ацетоновых экстрактов М-П и D-П насыщение N_2O (ПРЭ-5 дней), 50 % представлены на рис. 3.23 -а) и -б). Спектральные характеристики отдельных компонентов экстрактов представлены в таблице 3.17.

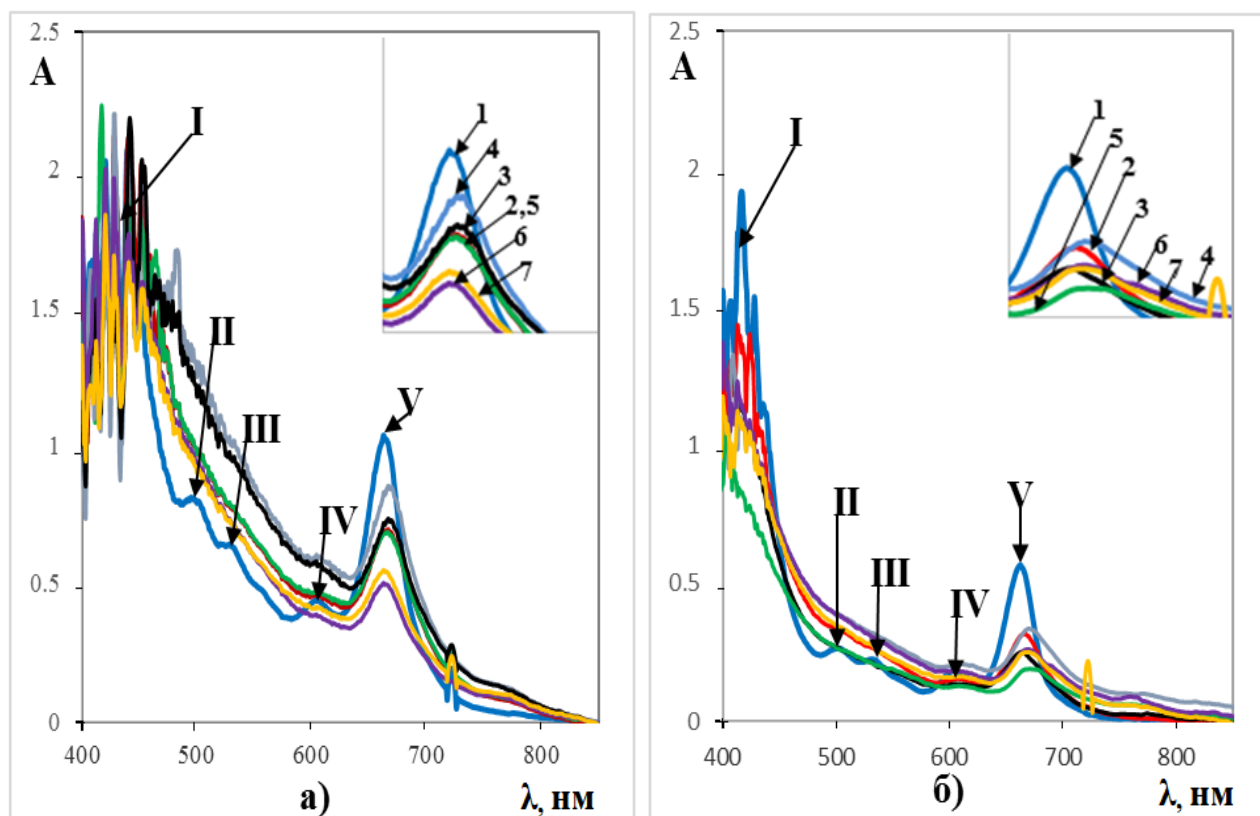


Рисунок 3.23. Спектры оптического поглощения 50% водно-ацетоновых экстрактов, насыщенных N_2O (ПРЭ-5 дней), М-П,-а); D-П, -б): исходные экстракты - 1, после облучения, D, кГр: 0,28 - 2, (ПРЭ - 3); 0,56 - 4, (ПРЭ - 5); 1,1 - 6, (ПРЭ - 7)

Таблица 3.17. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-ацетоновых растворов М-II и D-II, насыщенных N₂O, при разных дозах облучения

λ , нм/ОП							
D, кГр	I	IV	V	D, кГр	I	IV	V
	~421	~616	~668		~421	~614	~667
М-II	1,95	0,47	1,13	D-II	1,53	0,15	0,56
0				0			
0,28	1,94	0,46	0,69	0,28	1,28	0,13	0,37
ПРЭ 5 дней	1,94	0,55	0,70	ПРЭ 5 дней	1,17	0,12	0,33
0,56	1,87	0,58	0,85	0,56	1,28	0,20	0,38
ПРЭ 5 дней	1,94	0,47	0,68	ПРЭ 5 дней	0,83	0,11	0,18
1,1	1,85	0,36	0,48	1,1	1,20	0,16	0,34
ПРЭ 5 дней	1,84	0,38	0,53	ПРЭ 5 дней	1,20	0,13	0,33

*ОП - оптическая плотность; *ПРЭ - пострадиационный эффект

Особенностью радиационно-химических реакций в водно-ацетоновых экстрактах М-II и D-II, насыщенных N₂O (рис. 3.23), является то, что многие компоненты этих растворов принимают участие в сложных окислительных процессах. Так, кроме реакций разложения пигментов, что регистрируется по уменьшению оптической плотности облучаемых образцов, обнаружено увеличение интенсивности полос поглощения в видимой области спектра (500÷650 нм), вероятно, за счет дополнительного образования новых продуктов окисления, более стабильных, чем исходные соединения.

Более ярко формирование новых продуктов представлено на спектрах облученных образцов для пигментов хлорофилловой фракции (для D-II), поскольку вместо поглощения хлорофилла - а наблюдается появление новых полос поглощения с батохромным сдвигом ($\Delta\lambda \sim 10\div 15$ нм).

Глава IV. Исследование физико-химических свойств компонентов из бурых водорослей, выделенных методом тонкослойной хроматографии

4.1. Сравнение спектров оптического поглощения выделенных компонентов из водорослей *Jenit-M*, *Jemo-D* и *Cylindrotheca Closterium*

В институте биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН-г. Севастополь была проведена впервые тонкослойная хроматография экстрактов двух видов водорослей (*Jenit-M* и *Jemo-D*). По результатам этих исследований было сделано заключение о содержании в этих образцах водорослей активных каротиноидов. Для идентификации выделенных каротиноидов и подтверждения наличия фукоксантина были проведены спектрофотометрические исследования. Спектры оптического поглощения спиртовых растворов выделенных фракций водорослей *Jenit* и *Jemo* с ТСХ-пластинок, представлены на рис. 4.1.

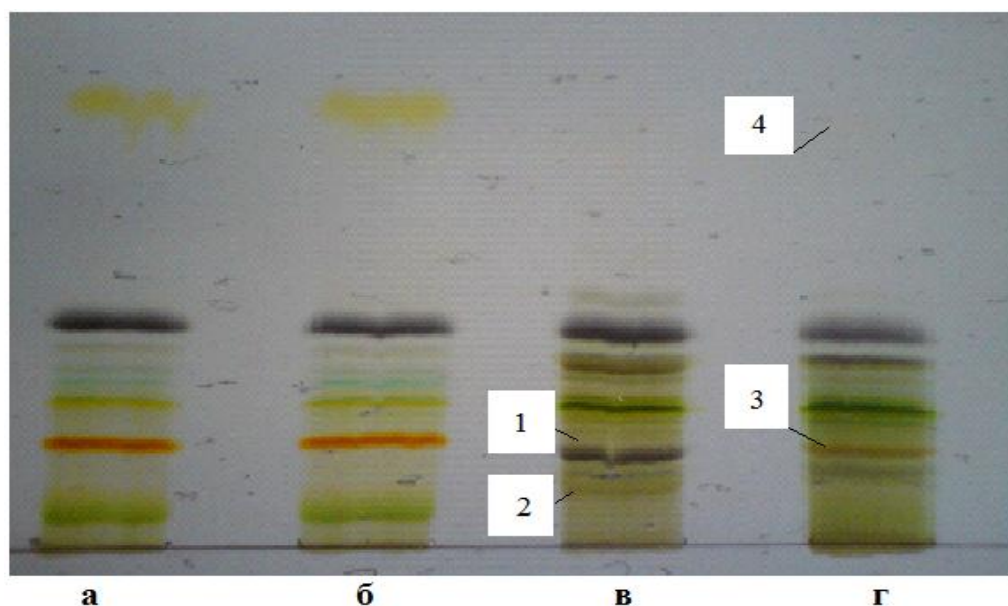


Рисунок 4.1. ТСХ- изображения: *Cylindrotheca Closterium* (Черноморская) -а, *Cylindrotheca Closterium* (Средиземноморская) -б, *Jenit* (M) -в, *Jemo* (D) -г

Спектры оптического поглощения спиртовых растворов из выделенных фракций с ТСХ-пластинок водорослей - *Jenit* и - *Jemo* (рис. 4.2 -а), представлены на (рис. 4.2 -б).

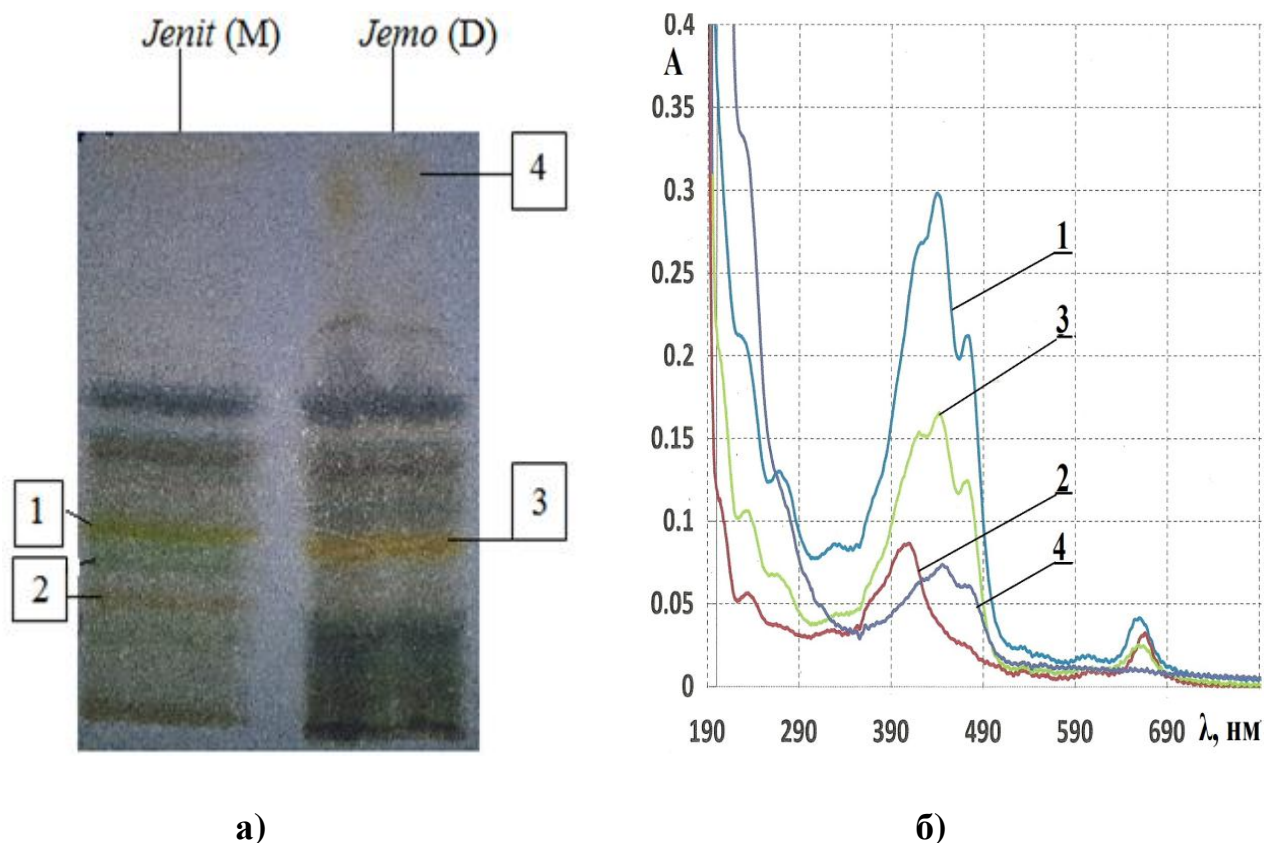


Рисунок 4.2. Спектры оптического поглощения спиртовых растворов выделенных фракций с ТСХ-пластинок водорослей *-Jenit (M)* и *-Jemo (D)* -а), спектры оптического поглощения спиртовых растворов фракций (1, 2, 3, 4) -б)

Спектры ОП растворов фракций полос 1 и 3, представленные на рис. 4.2 - а) и -б), по положению и структуре полос оптического поглощения имеют полное сходство со спектрами фукоксантина. Для подтверждения присутствия в водорослях *Jenit (M)* и *Jemo (D)* фукоксантина были измерены спектры люминесценции фракций *Jenit 1)* и *Jemo 3)* при $\lambda_{\text{возб.}} = 400$ нм, которые представлены на рис. 4.3 -а и -б. Узкие интенсивные полосы оптического поглощения действительно совпадают по положению ($\lambda_{\text{макс.}} \sim 660$ нм) с полосой люминесценции фукоксантина из бурых водорослей *Cystoseira* ($\lambda_{\text{макс.}} \sim 650$ нм).

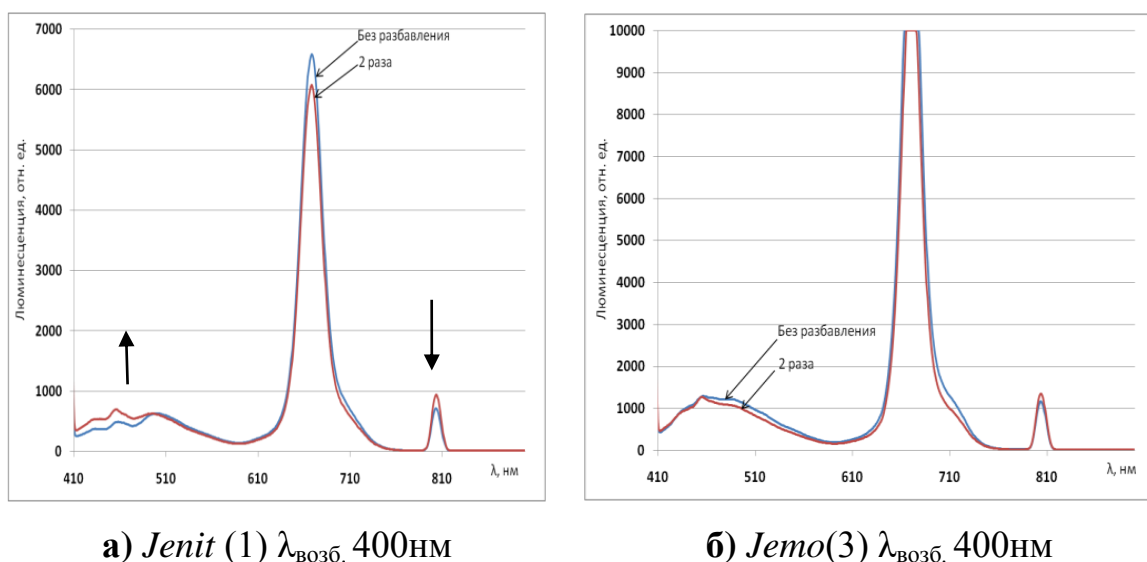


Рисунок 4.3. Спектры люминесценции при $\lambda_{\text{возб.}}$ 400 нм: *Jenit*(1) -**а**) и *Jemo*(3) -**б**)
Спектры ОП поглощения фракций *Jenit* (1) и *Jemo* (3) представлены на рис. 4.2.

Для сравнения на рис. 4.4 представлены спектры оптического поглощения -**А**) и люминесценции -**Б**) спиртовых растворов фукоксантина, выделенного методом ТСХ из бурых водорослей *Cystoseira*. Концентрация Фк = 0.05 мг/мл.

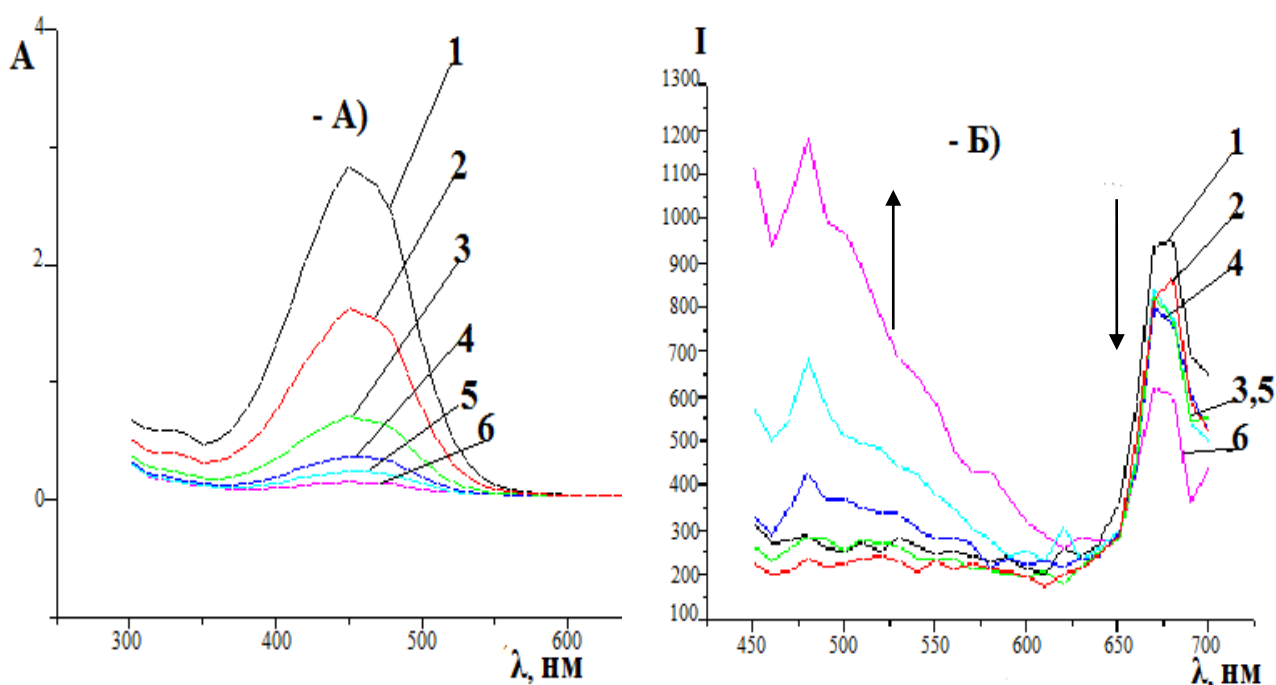


Рисунок 4.4. Спектры оптического поглощения -**А**), люминесценции -**Б**) спиртового раствора 0.05 мг/мл фукоксантина - **1** и при разных разбавлениях: 1:2 - **2**, 1:4 - **3**, 1:8 - **4**, 1:16 - **5**, 1:32 - **6**. $\lambda_{\text{возб.}}$ = 400 нм

На основании представленных оптических характеристик выделенных каротиноидных фракций методом ТСХ из бурых макроводорослей *Jenit* и *Jemo* (рис. 4.3 -а и -б) и результатов сравнения их с характеристиками растворов монокристаллического Фк из бурых водорослей *Cystoseira* (рис. 4.4 - А и -Б) можно сделать вывод, что и спектры ОП этих фракций, и спектры люминесценции совпадают с оптическими характеристиками каротиноида-фукоксантина. Таким образом, культивируемые бурые водоросли (*Мьянма*) *Jenit* и *Jemo* являются источниками ценных культур водорослей, содержащих биологически активные соединения - каротиноиды с антиокислительными свойствами и радиопротекторной активностью [32-34].

Полоса поглощения 4 ($\lambda_{\text{макс.}} 450$ нм, рис. 4.2 -б), соответствующая ТСХ-фракции 4 водорослей *Jemo* (Рис. 4.2 -а), как и поглощение Фк лежит в той же области спектра, но меньшей интенсивности. При этом, следует обратить внимание на интенсивную полосу поглощения ТСХ фракции 4 в УФ-области, которой нет у фукоксантина. Дополнительно проведенные измерения люминесценции этой фракции также подтвердили вывод о том, что эта фракция принадлежит «неидентифицированному» пигменту.

Все оптические и антиокислительные свойства бурых водорослей (*Мьянма*) сравнивались со свойствами монокристаллического каротиноида фукоксантина, который содержится в культивируемых микроводорослях *Cylindrotheca Closterium*. Образцы монокристаллического Фк были любезно предоставлены М.В. Нехорошевым (НИИБЮМ).

4.2. Оптические свойства и радиационная стабильность каротиноида фукоксантина, выделенного из морской диатомеи *Cylindrotheca Closterium*

4.2.1. Стабильность каротиноида фукоксантина при хранении микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* в сухом виде

Известно, что фукоксантин разрушается в сухой биомассе при хранении микроводорослей за счет взаимодействия с кислородом. Поэтому нужно

учитывать время хранения сухой биомассы от момента высушивания до экспериментальных работ по радиационному облучению. На рис. 4.5 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° С в темноте, при этом скорость разрушения фукоксантина была постоянной и составила 0,05 мг/сут [69].

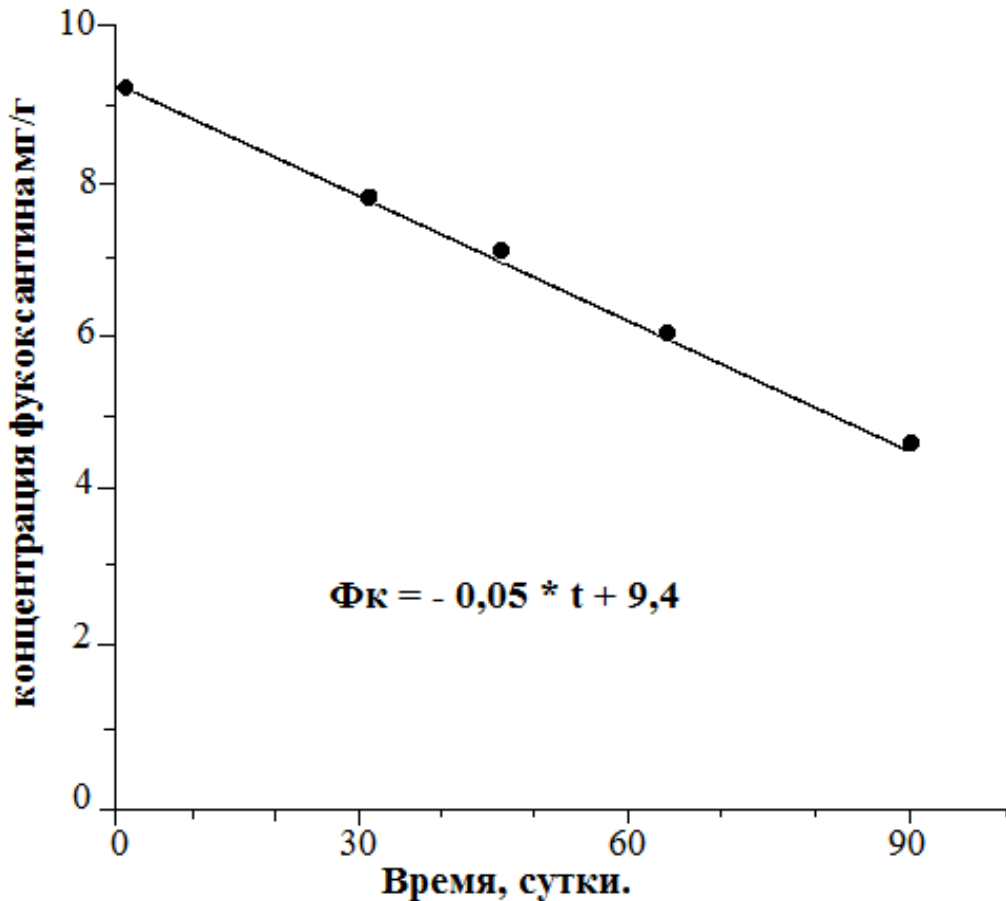


Рисунок 4.5. Динамика разрушения фукоксантина в биомассе *C. closterium* при хранении в воздушно-сухой атмосфере в темноте при температуре 20 – 23°С. Скорость разрушения 0,05 мг/сут (Фк – фукоксантин; t – время, сутки.)

Как показано на рисунке, функция разрушения фукоксантина была линейной. 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). Установлено, что при хранении сухой биомассы в темноте при комнатной температуре за три месяца потеря Фк составила ~ 50 %.

4.2.2. Спектрофотометрия водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca Closterium*, облученных в аэробных условиях

Изменения спектров оптического поглощения водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей (в присутствии кислорода воздуха) в результате воздействия гамма-облучения представлены на рис 4.6 -а и -б. Спектральные характеристики (I-II) относятся к полосам поглощения компонентов экстрактов, включая фракцию каротиноидов ($\lambda \sim 400-550$ нм) и хлорофиллов ($\lambda \sim 640-670$ нм).

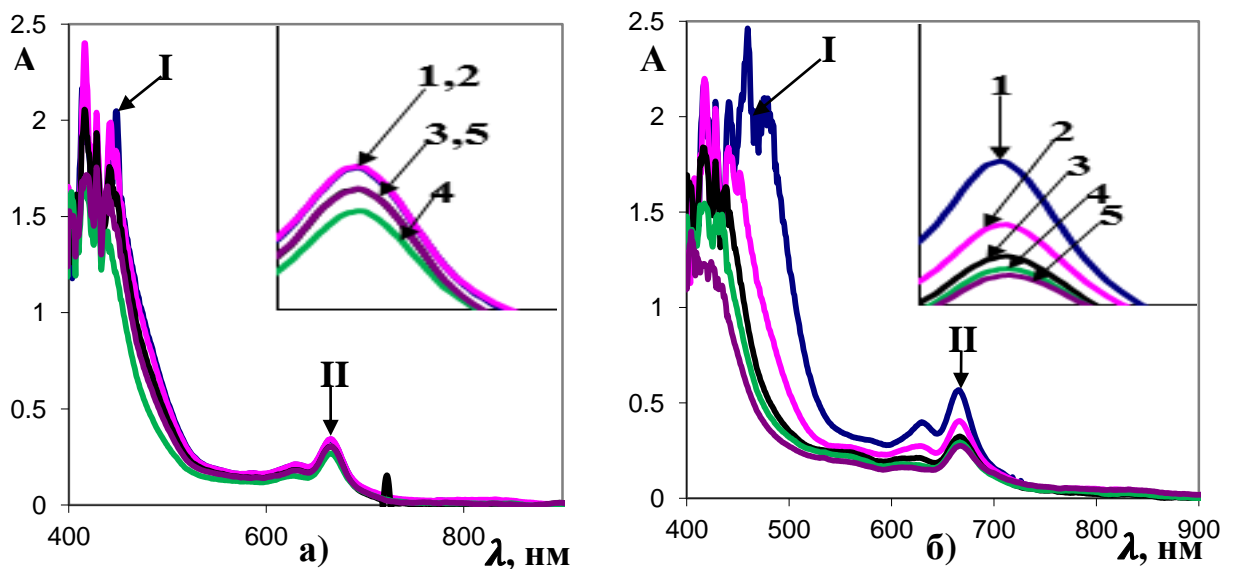


Рисунок 4.6. Спектры оптического поглощения водно-спиртовых -а) и водно-ацетоновых -б) экстрактов *Cylindrotheca closterium* в присутствии O_2 :

1 - исходные образцы, **2 - 5** - после облучения при дозе (D), кГр: **2** - 0,28, **3** - 0,56, **4** - 0,84, **5** - 1,1 кГр

Из рис. 4.6 -а и -б видно, что происходит исчезновение фукоксантина ($\lambda = 460$ нм) и проявляются полосы поглощения продуктов, имеющих полосы поглощения со смещением λ_{\max} в ультрафиолетовую область ($\lambda \sim 420$ нм). Анализ изменений оптической плотности облученных растворов (рис. 4.6) в зависимости от дозы облучения показал, что радиационная стабильность водно-спиртовых экстрактов выше водно-ацетоновых. Следует обратить внимание на

увеличение ОП каротиноидной фракции ($\lambda=440$ нм) при $D=1,1$ кГр до 1,75, по сравнению 1,42 при $D=0,84$ кГр. Такой колебательный характер изменения ОП при импульсном радиоллизе наблюдался при облучении растворов антиокислительной и радиопротекторов [38, 79].

Спектральные характеристики каротиноидных и хлорофилловых фракций экстрактов водорослей, зарегистрированных через (1-4) часа после облучения представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Спектральные характеристики оптического поглощения *водно-спиртовых* и *водно-ацетоновых* экстрактов водорослей *Cylindrotheca closterium* (в присутствии O_2) при разных дозах облучения

<i>Cylindrotheca closterium</i> λ , нм/ОП					
Образец, доза, кГр	I		Образец, доза, кГр	I	
	~ 440	~ 630		~ 460	~ 665
водно-спиртовой экстракт, 0	2,30	0,32	водно-ацетоновый экстракт, 0	2,41	0,54
0,28	2,00	0,32	0,28	1,99	0,40
0,56	1,75	0,28	0,56	1,76	0,31
0,84	~1,42	0,25	0,84	1,50	0,27
1,1	~1,75	0,28	1,1	1,34	0,26

*ОП - оптическая плотность

На рис. 4.7 -а и -б представлены изменения спектров оптического поглощения экстрактов после облучения через 5 дней, ПРЭ. Результаты изменения спектральных характеристик - в таблице 4.2. Представленные данные по изменению спектральных характеристик *водно-спиртовых* экстрактов при хранении облученных образцов при $T_{\text{комн.}}$ (в присутствии O_2) позволили зарегистрировать пострадиационный эффект - разрушение пигментов в облученных образцах в зависимости от времени хранения. Изменения в пострадиационный период в *водно-ацетоновых* экстрактах *Cylindrotheca closterium* носят более сложный характер.

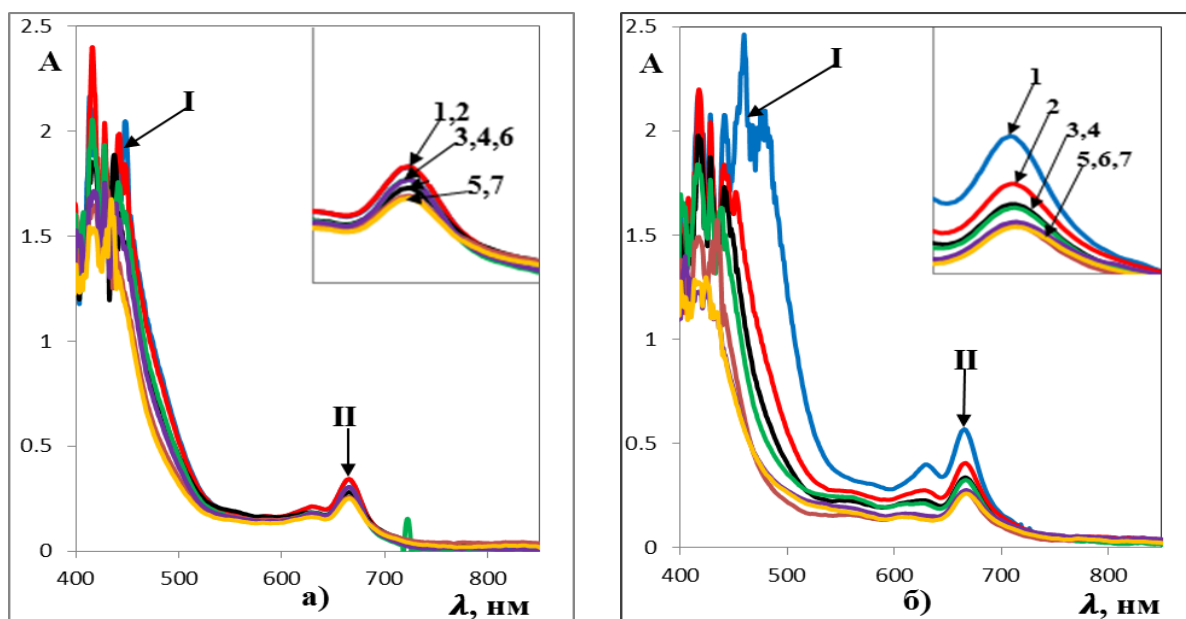


Рисунок 4.7. Спектры оптического поглощения 50 % водно-спиртовых -а) и водно-ацетоновых -б) экстрактов *Cyndrotheca closterium* в присутствии O_2 (ПРЭ 5 дней): исходные образцы - 1, после облучения D, кГр: 0,28 - 2 (ПРЭ - 3); 0,56 - 4, (ПРЭ - 5); 1,1 - 6, (ПРЭ - 7)

Таблица 4.2. Спектральные характеристики оптического поглощения водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов *Cyndrotheca closterium*, облученных в присутствии O_2 и ПРЭ через 5 дней

<i>Cyndrotheca closterium</i> λ, нм/ОП					
Доза, кГр	I ~ 440	II ~ 630	Доза, кГр	I ~ 460	II ~ 665
водно-спиртовой экстракт, 0	2,30	0,32	водно-ацетоновый экстракт, 0	2,41	0,54
0,28	2,00	0,32	0,28	1,99	0,40
ПРЭ	1,84	0,27	ПРЭ	1,73	0,31
0,56	1,75	0,27	0,56	1,70	0,31
ПРЭ	1,71	0,24	ПРЭ	1,54	0,26
1,1	1,63	0,27	1,1	1,34	0,26
ПРЭ	1,60	0,24	ПРЭ	1,33	0,26

* ПРЭ - пострadiационный эффект

4.2.3. Спектрофотометрия водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca Closterium*, облученных в присутствии Ar и N₂O

Для изменения условий окислительно-восстановительных реакций и подавления окислительных процессов радиолит водно-спиртовых и водно-ацетоновых растворов проводили в анаэробных условиях. Результаты радиационно-химических превращений водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов в аэробных условиях *ранее* были представлены на рис. 4.6 и в таблице 4.1.

Изменения спектральных характеристик оптического поглощения экстрактов микроводорослей, насыщенных Ar, после гамма-облучения представлены на рис. 4.8 -а и -б и в таблице 4.3.

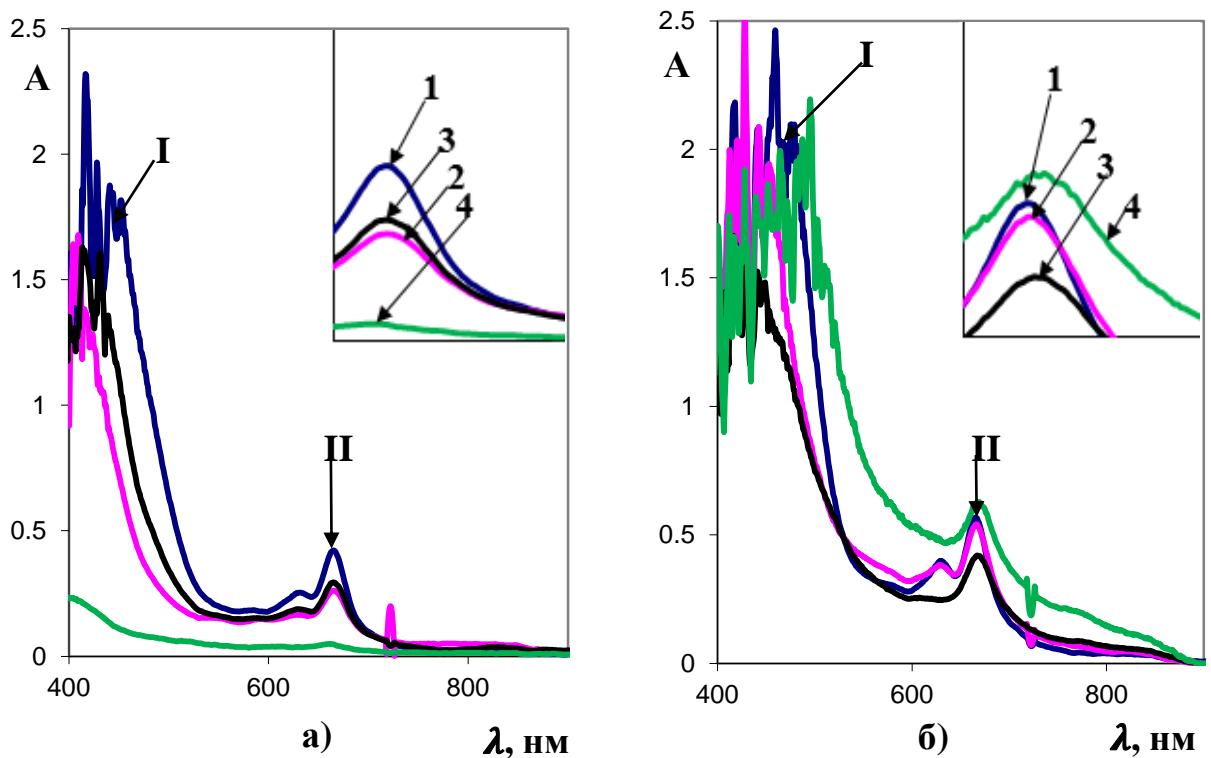


Рисунок 4.8. Спектры оптического поглощения водно-спиртовых -а) и водно-ацетоновых -б) экстрактов *Cylindrotheca closterium* (насыщение Ar):

1 - исходные образцы, после облучения D, кГр: 2 - 0,28, 3 - 0,56, 4 - 1,1 кГр

Таблица 4.3. Спектральные характеристики оптического поглощения *водно-спиртовых* и *водно-ацетоновых* экстрактов *Cylindrotheca closterium* (насыщение Ar) при разных дозах

<i>Cylindrotheca closterium</i> λ , нм/ОП					
Доза, кГр водно-спиртовой экстракт	I ~ 440	II ~ 630	Доза, кГр водно-ацетоновый экстракт	I ~ 460	II ~ 665
0	2,30	0,32	0	2,41	0,54
0,28	1,41	0,25	0,28	2,06	0,52
0,56	1,59	0,28	0,56	1,52	0,42
1,10	0, 22	0,05	1,10	2,19	0,62

*ОП - оптическая плотность

На основании представленных данных (рис. 4.8 - а и - б) можно сделать вывод о том, что в *водно-спиртовых* деаэрированных экстрактах (насыщенных Ar) при дозе > 0,56 кГр наблюдается почти полное *разрушение* пигментов. В *водно-ацетоновых* экстрактах происходят сложные процессы *образования* новых продуктов радиолиза с появлением дополнительных полос оптического поглощения. При дозе 1,1 кГр обнаружено аномальное увеличение оптической плотности (возможно за счет более высокого коэффициента экстинкции образующихся продуктов радиационного восстановления), что требует дальнейших экспериментальных исследований для идентификации продуктов радиолиза.

С целью изменения условий облучения, увеличения концентрации окислительных частиц радиолиза, в основном за счет радикалов ОН, растворы экстрактов перед облучением насыщали N₂O в течение 40 мин. Спектральные характеристики оптического поглощения экстрактов микроводорослей *Cylindrotheca closterium*, насыщенных N₂O исходных концентратов и после гамма-облучения, представлены на рис. 4.9 -а и -б в таблице 4.4.

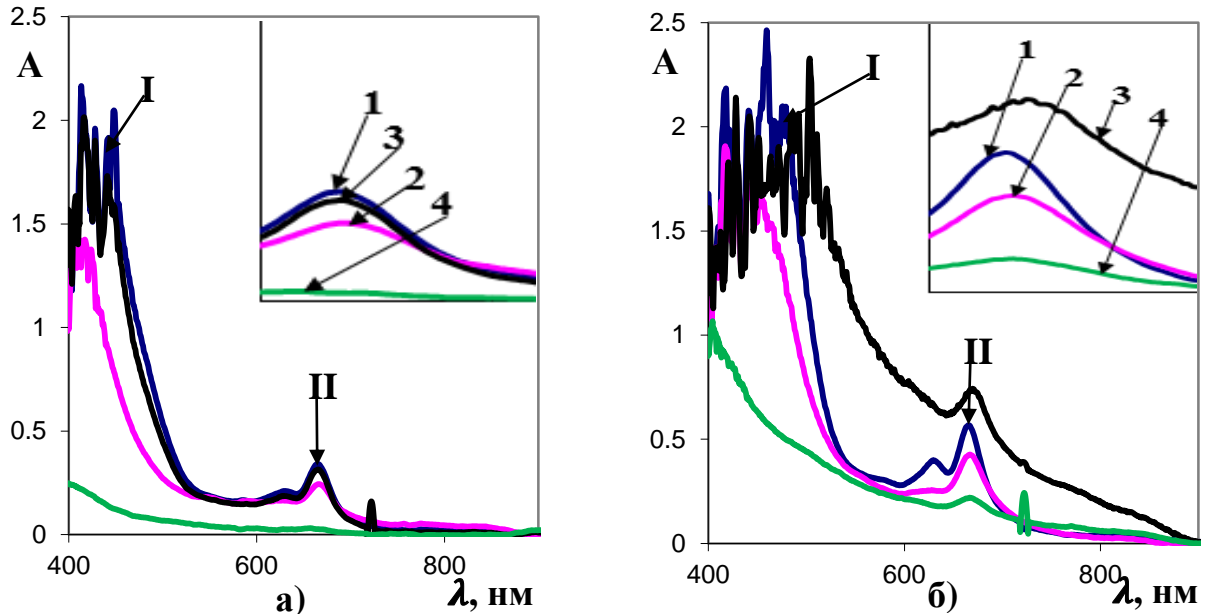


Рисунок 4.9. Спектры оптического поглощения водно-спиртовых -а) и водно-ацетоновых -б) экстрактов *Cylandrotheca closterium* (насыщение N_2O):

1 - исходные образцы, после облучения D, кГр: 2 - 0,28, 3 - 0,56, 4 - 1,1 кГр

Таблица 4.4. Спектральные характеристики ОП водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов *Cylandrotheca closterium* в присутствии N_2O при разных дозах облучения

<i>Cylandrotheca closterium</i> λ, нм/ОП					
Доза, кГр водно-спиртовой экстракт	I ~ 440	II ~ 630	Доза, кГр водно-спиртовой экстракт	I ~ 460	II ~ 665
0	2,30	0,32	0	2,41	0,54
0,28	1,40	0,23	0,28	1,70	0,42
0,56	1,89	0,31	0,56	2,31	0,72
1,10	0,19	0,02	1,1	1,00	0,20

*ОП - оптическая плотность

При анализе спектров (рис. 4.9, таблица 4.4) видно, что в водно-спиртовых экстрактах в присутствии N_2O наблюдается полное разрушение хлорофиллов, а в водно-ацетоновых экстрактах при дозе облучения (0,28 кГр)

регистрируется уменьшение ОП при $\lambda = 665$ нм, при дозе (0,56 кГр) наблюдается увеличение, а при дозе 1,1 кГр - почти деструкция.

Спектральные характеристики оптического поглощения облученных экстрактов микроводорослей, насыщенных N_2O , через 5 дней хранения, ПРЭ представлены на рис.4.10.

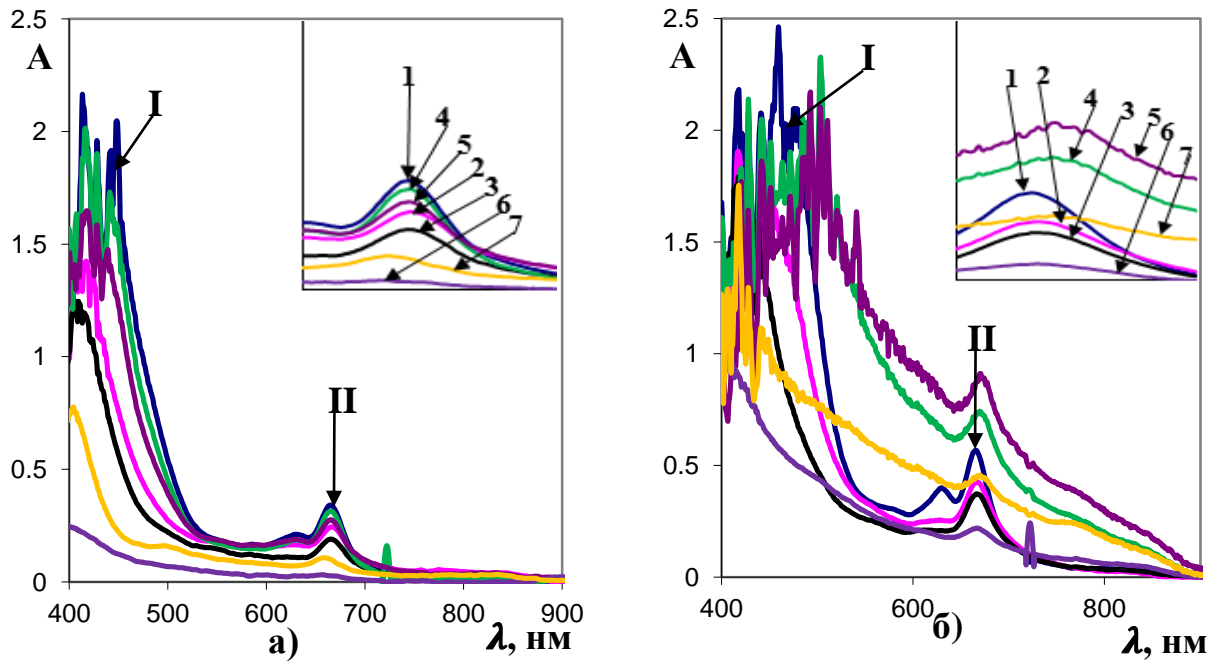


Рисунок 4.10. Спектры оптического поглощения водно-спиртовых -а) и водно-ацетоновых -б) экстрактов *Cyndrotheca closterium* (насыщение N_2O , ПРЭ 5 дней): исходные образцы - 1, после облучения D, кГр: 0,28 - 2 (ПРЭ - 3); 0,56 - 4, (ПРЭ - 5); 1,1 - 6, (ПРЭ - 7)

При измерении спектров ОП образцов после облучения в присутствии O_2 зарегистрировано увеличение интенсивности некоторых полос поглощения за счет регенерации исходных молекул. Так, в водно-спиртовых растворах экстрактов *Cyndrotheca closterium* наблюдается регенерация фукоксантина после облучения при дозе 0,28 кГр и 1,1 кГр (ПРЭ). В водно-ацетоновых экстрактах - в пострадиационный период происходят более сложные процессы превращения продуктов радиолиза биологически активных соединений, включая каротиноиды и хлорофиллы (рис. 4.10). Как представлено, зависимость радиационно-химических превращений водно-спиртовых

растворов фукоксантина (*Cylindrotheca closterium*) от дозы облучения имеет сложный характер, иногда колебательный, особенно при малых дозах [69].

На основании анализа представленных изменений спектральных характеристик облученных водно-спиртовых и водно-ацетоновых экстрактов *Cylindrotheca closterium* трудно выделить результаты, которые относятся к радиолитическим превращениям фукоксантина, поскольку спектры ОП в диапазоне ($\lambda \sim 400-550$ нм) представляют суперпозицию полос поглощения и каротиноидных, и хлорофилловых фракций. Поэтому было уделено особое внимание исследованию радиолиза растворов чистого фукоксантина, выделенного методом ТСХ из диатомеи *Cylindrotheca closterium*.

Как было показано ранее (гл. III - 3.3.2), при изучении радиационной стабильности образцов микроводоросли *Cylindrotheca closterium* после облучения в сухом виде, в её спиртовых экстрактах сохраняется ~ 89 % фукоксантина.

4.2.4 Сравнение радиационной стабильности хлорофилловых фракций в ацетоновых экстрактах водорослей *Laminaria Japonica*

Спектры оптического поглощения 100% ацетоновых экстрактов (СФ-2000) (M-I *Jenit* и D-I *Jemo*), измеренные сразу после γ -облучения и через несколько часов (ПРЭ), представлены на рис. 4.11 -а и -б. Спектральные характеристики (I-V) относятся к полосам поглощения отдельных компонент экстрактов, включая каротиноидную фракцию полосы (I) в интервале длин волн $\lambda \sim 380 \div 450$ нм и хлорофилловую (V) – $\lambda \sim 630 \div 700$ нм. В этой серии экспериментов и облучение образцов, и измерение их спектров оптического поглощения проводилось в присутствии кислорода воздуха.

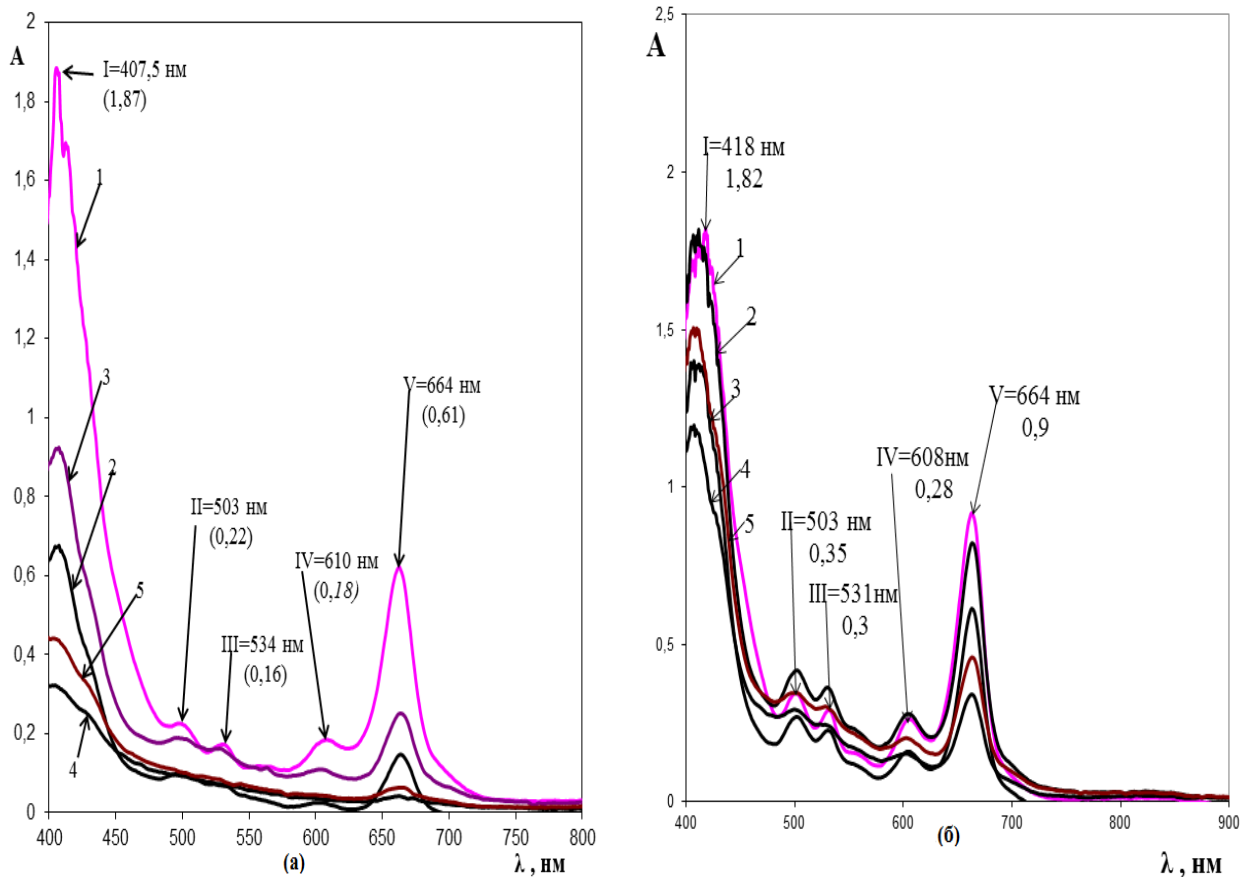


Рисунок 4.11. Спектры оптического поглощения 100% ацетоновых экстрактов М-I (*Jenit*) - а), D-I (*Jemo*) - б): **1** - исходные образцы, после облучения D, кГр: **2** - 0,65, **3** – (ПРЭ – 2 часа); **4** - 1,3 кГр, **5** – (ПРЭ – 4 часа)

Сравнение оптических характеристик спектров М-I и D-I (рис. 4.11) после облучения при разных дозах позволяет сделать вывод о более высокой радиационной чувствительности биологических компонентов в экстрактах водорослей *Jenit*-М-I. Так в образце *Jenit*-М-I оптическая плотность, соответствующая хлорофиллам, (0.6) при дозе 0,65 кГр уменьшается (до 0.1), в то время, как в образце *Jemo* –D-I интенсивность снижается только на ~ 30 % (от 0.9 до 0.6).

Спектры оптического поглощения исходных 50% водно-ацетоновых экстрактов (М-II *Jenit* и D-II *Jemo*) в аэробных условиях и их изменения после радиолитиза представлены на рис. 4.12 -а и -б.

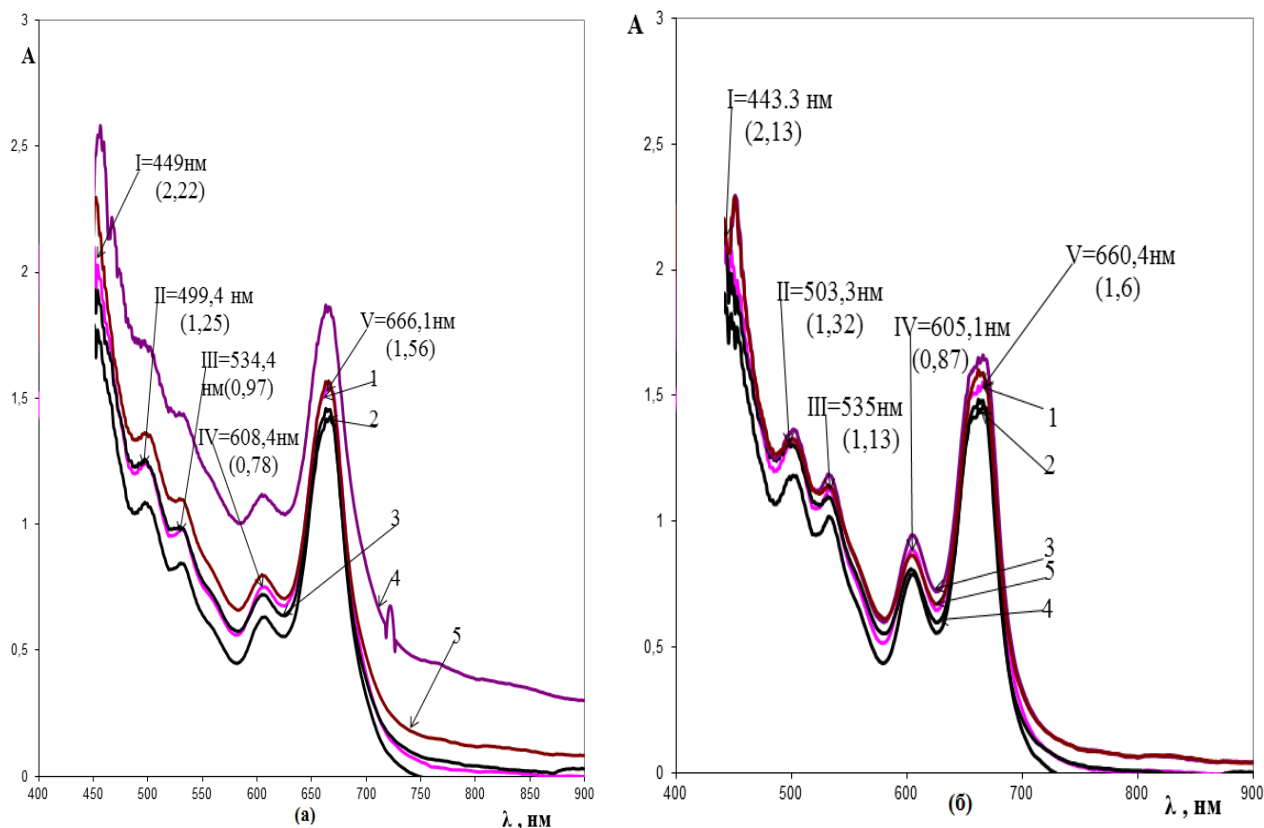


Рисунок 4.12. Спектры оптического поглощения 50% водно-ацетоновых экстрактов М-II (*Jenit*), -а); D-II (*Jemo*), -б): 1 - исходные образцы, после облучения D, кГр: 2 - 0,65, 3 – (ПРЭ – 2 часа); 4 - 1,3 кГр, 5 – (ПРЭ – 4 часа)

Как можно видеть, интенсивность характерных полос оптического поглощения 50 % водно-ацетоновых экстрактов D-II (*Jemo*) после радиационно-химического воздействия при всех использованных дозах изменяется незначительно, по сравнению с изменением спектров экстрактов М-II (*Jenit*).

4.2.5. Спектрофотометрические исследования водно-спиртовых растворов фукоксантина

Спектры оптического поглощения 50 % водно-спиртовых растворов монокристаллического фукоксантина и этих растворов, разбавленных в 3 и 6 раз, представлены на рис. 4.13. Спектральные характеристики полос оптического поглощения водно-спиртовых экстрактов фукоксантина (Фк) представлены в таблице 4.5.

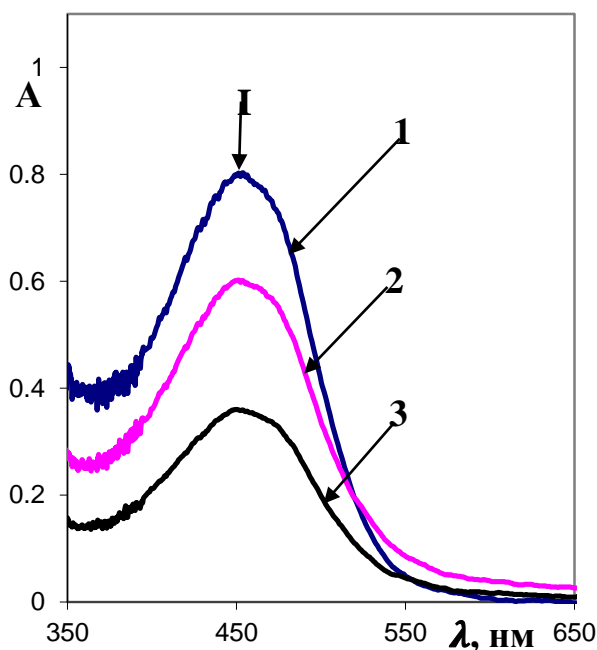


Рисунок 4.13. Влияние разбавления 50 % водно-спиртовых растворов **Фк** на интенсивность оптического поглощения: исходный образец - **1**, при разбавлении в 3 раза - **2**, при разбавлении в 6 раз - **3**

Таблица 4.5. Спектральные характеристики оптического поглощения **50 % водно-спиртовых** экстрактов **Фк** при разбавлении водно-спиртовым раствором

Фукоксантин λ , нм/ОП		
50 % водно-спиртовый раствор Фк	Экспериментальные данные	Расчётные значения
Исходный раствор	452 нм/ 0,8	
Разбавление в 3 раза	452 нм/ 0,6	0,27
Разбавление в 6 раз	452 нм/ 0,34	0,13

Анализ полученных результатов (табл. 4.5) позволяет сделать вывод о том, что при дополнительном разбавлении 50 % водным раствором спирта изменения ОП растворов экстрактов не соответствуют коэффициентам разбавления, что указывает на присутствие агрегированных состояний **Фк** или его комплексов с другими молекулами даже в разбавленных растворах.

4.2.6. Радиационная стабильность водно-спиртового раствора фукоксантина при разных условиях γ -облучения

Использование метода спектрофотометрии позволило зарегистрировать различные окислительно–восстановительные превращения фукоксантина, выделенного методом ТСХ из *C. Closterium*, при воздействии излучения на водно-спиртовые растворы фукоксантина, насыщенные различными газами. Изменения спектров оптического поглощения растворов фукоксантина, облученных при дозах 0,28 кГр и 0,56 кГр в присутствии *кислорода воздуха* представлены на рис. 4.14 -а), насыщенных Ar -б) в присутствии N₂O -в). Насыщение растворов газами проводилось в течение ~ 40 минут при комнатной температуре.

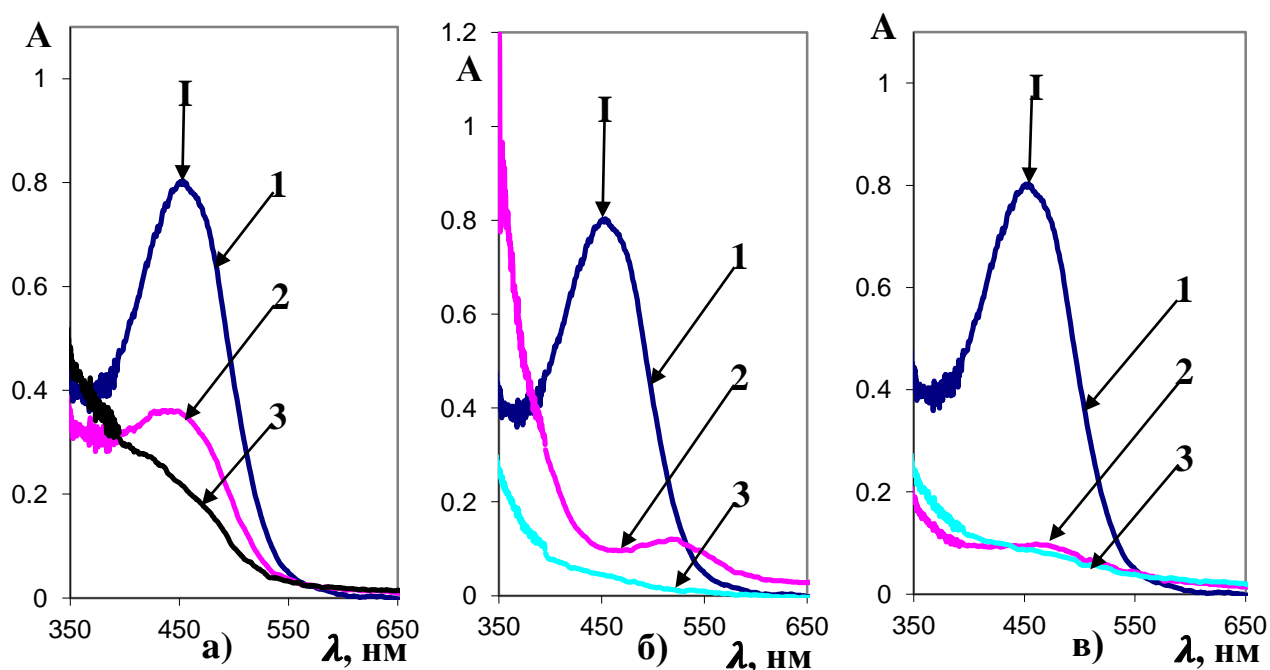


Рисунок 4.14. Спектры оптического поглощения **50%** спиртового экстракта **Фк** в присутствии кислорода воздуха -а), при насыщении Ar -б) и в присутствии N₂O -в): исходные образцы - 1, после облучения D, кГр: 0,28 - 2, 0,56 -3

Спектральные характеристики оптического поглощения **50 %** водно-спиртовых экстрактов фукоксантина (*Cylindrotheca closterium*) при разных условиях облучения представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6. Спектральные характеристики ОП водно-спиртовых растворов фукоксантина в зависимости от дозы облучения и природы насыщающего газа

Доза, кГр	Изменение ОП при $\lambda(I) = 452$ нм		
	O₂	Ar	N₂O
0	0,8	0,8	0,8
0,28	0,35 (56 %)	0,10 (88 %)	0,08 (90 %)
0,56	0,22 (73 %)	0,04 (95 %)	0,08 (90 %)

* Изменение ОП, % представлены в скобках

При облучении **50 %** водно-спиртовых насыщенных **Ar** экстрактов фукоксантина, выделенного в виде индивидуального соединения (рис. 4.14 -б) наблюдается радиолитическое разрушение пигмента. В присутствии **O₂** (рис. 4.14 -а) при облучении водно-спиртовых экстрактов фукоксантина его содержание меняется значительно меньше, чем в образцах экстрактов облученных в анаэробных условиях (сравнение рис. 3.16 -а и рис. 4.14 -а). Возможно, снижение радиационного разрушения фукоксантина в растворах экстрактов связано с некоторой стабилизацией молекул каротиноида в ассоциатах с другими природными соединениями.

На основании результатов анализа характера изменения спектров оптического поглощения (рис. 4.14) можно сделать вывод о том, что зависимость радиационной стабильности водно-спиртовых растворов фукоксантина (*Cylindrotheca closterium*) от дозы облучения имеет сложный характер, особенно при малых дозах радиации. Установлено, что радиационная стабильность фукоксантина (*Cylindrotheca closterium*) в аэробных условиях выше, чем анаэробных за счет регенерации пигмента, экспериментально наблюдаемой в пострadiационный период. Этот же эффект ранее обнаружен при изучении редокс превращений методом импульсного радиолитического макрофита *Cystoseira* [32, 34] и методом стационарного радиолитического макроводорослей *Jemo* и *Jenit* (гл. III).

4.3. Сравнение стабильности водорослей в зависимости от времени хранения в сухом виде

4.3.1. Изменение оптических свойств экстрактов водорослей *Jenit*-М и *Jemo*-D в зависимости от времени хранения образцов в сухом виде

Изменение оптических свойств 100 % этанольных и 50 % водно-этанольных экстрактов водорослей М и D в зависимости от хранения сырья в сухом виде в течение 3 лет представлено на рис. 4.15 -а) и -б) (для 100 %) и на рис. 4.16 - а) и - б) (для 50 % экстрактов), соответственно. Такие же результаты для ацетоновых экстрактов, долго хранившихся водорослей, представлены на рис. 4.17 -а) и -б) (для 100 %) и на рис. 4.17 -в) и -г) (для 50 %), соответственно.

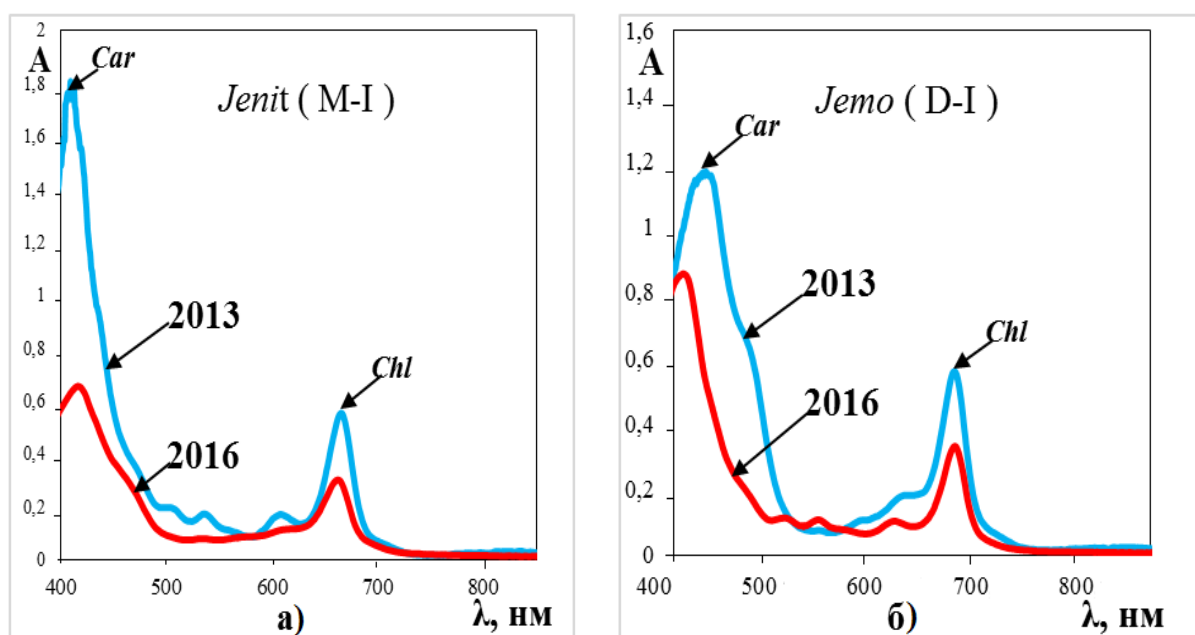


Рисунок 4.15. Спектры оптического поглощения 100 % этанольных экстрактов исходных образцов М-I, -а), D-I, -б): -2013 г. и -2016 г – даты экстракции.

Различие спектров оптического поглощения 50 % водно-спиртовых экстрактов макро водорослей *Jenit* (M) и *Jemo* (D) (СФ-2000) из водорослей разного срока хранения представлены на рис. 4.16 -а), -б). Изменение оптической плотности спиртовых и водно-спиртовых экстрактов отдельных компонентов представлены в таблице 4.7.

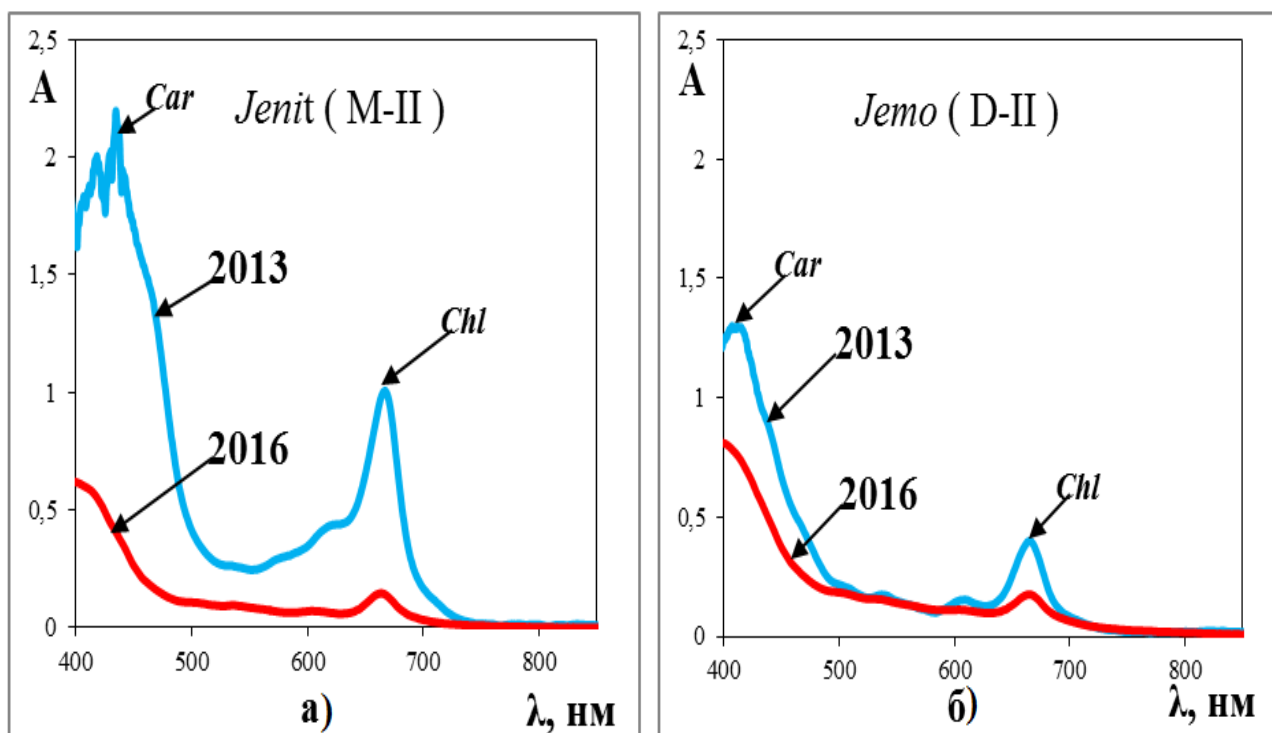


Рисунок 4.16. Спектры оптического поглощения 50 % водно-этанольных экстрактов образцов М-II, -а), D-II, -б): -2013 г и -2016 г

Таблица 4.7. Изменение ОП полос оптического поглощения спиртовых и водно-спиртовых экстрактов *Jenit* (M) и *Jemo* (D) в зависимости от времени хранения водорослей

Исходный образец	λ , нм/ОП							
	<i>Jenit</i> (M)				<i>Jemo</i> (D)			
	M-I (100 %)		M-II (50 %)		D-I (100 %)		D-II (50 %)	
	<i>Car</i> , ~ 420	<i>Chl</i> , ~665	<i>Car</i> , ~420	<i>Chl</i> , ~665	<i>Car</i> , ~415	<i>Chl</i> , ~660	<i>Car</i> , ~400	<i>Chl</i> , ~670
2013	1,70	0,50	1,90	0,90	1,10	0,49	1,20	0,37
2016	0,60	0,25	0,50	0,13	0,80	0,26	0,80	0,16
Снижение, %	65	50	74	86	27	47	33	57

Оценка относительных изменений интенсивности поглощения каротиноидной и хлорофилловой фракции сделана на основании определения оптической плотности (ОП) каротиноидной при $\lambda \sim 420-440$ нм и (ОП) при $\lambda \sim 665-675$ нм хлорофилловой фракции (по формуле):

$$\Delta A = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \% \quad (27),$$

где, $\Delta A_{(Chl)}$, $\Delta A_{(Car)}$, соответственно относительные изменения интенсивности поглощения каротиноидной и хлорофилловой фракций,

A_0 - исходные значения ОП соответствующих полос оптического поглощения фракций,

A_t - значение оптической плотности через время t хранения образцов.

На основании сравнения приведенных результатов (рис. 4.16 -а и -б) по выходу экстрактов из образцов водорослей *Jenit* и *Jemo* после длительного хранения в сухом виде можно сделать вывод о том, что большей стабильностью обладают макроводоросли *Jemo* (D), выделенных в спиртовые экстракты.

Изменение оптической плотности 100 % ацетоновых экстрактов макроводорослей *Jenit* (M) и *Jemo* (D) после длительного хранения сырья представлены на рис. 4.17- а), -б) и 50 % водно-ацетоновых экстрактов - на рис. 4.17 -в), -г).

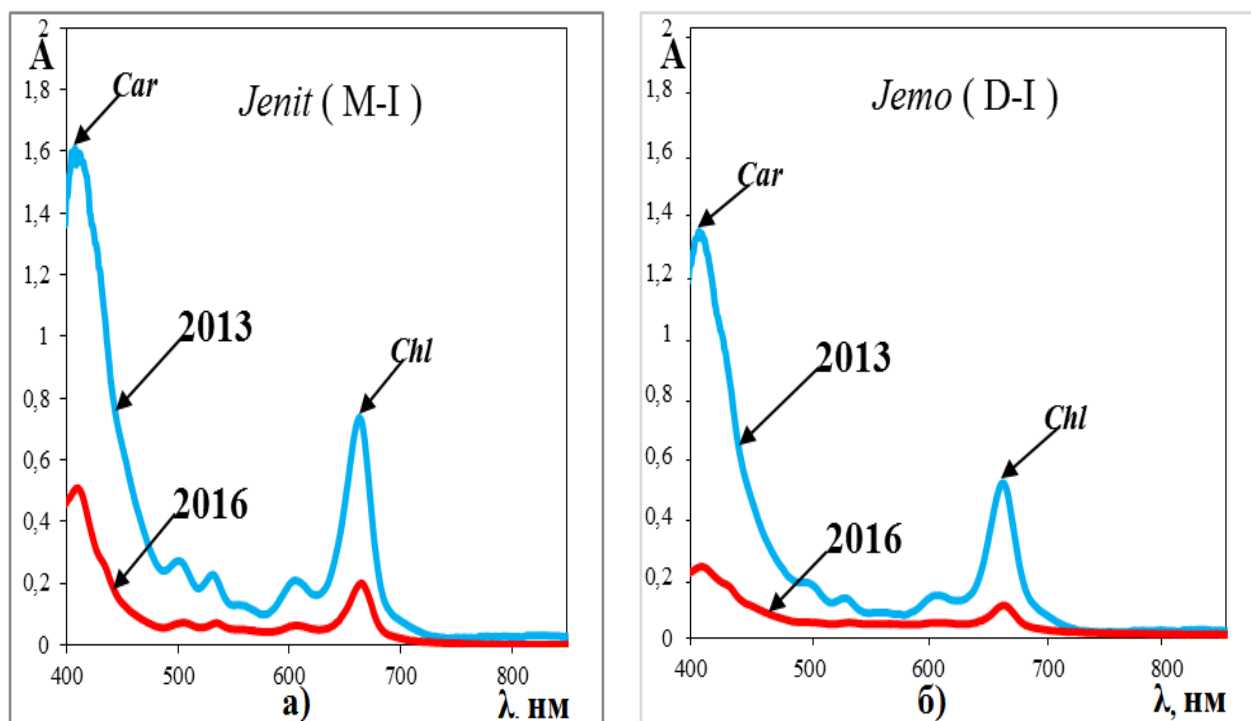


Рисунок 4.17. Изменение спектров оптического поглощения после длительного хранения в сухой биомассе (в течение 2013 г. – 2016 г.) **100 %** ацетоновых экстрактов образцов *Jenit* M-I, -а), *Jemo* D-I, -б)

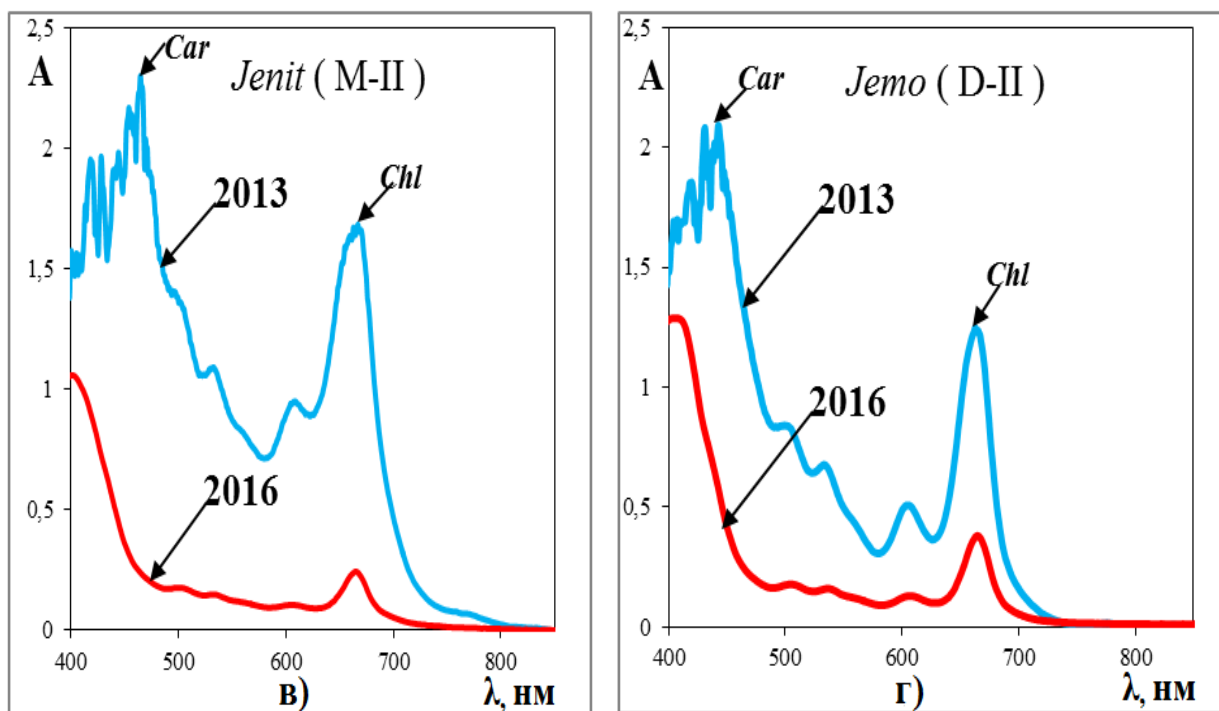


Рисунок 4.17. (продолжение) Изменение спектров оптического поглощения после длительного хранения в сухой биомассе (в течение 2013 г. – 2016 г.) 50 % водно-ацетоновых экстрактов *Jenit* М-II, -в), *Jemo* D-II, -г)

Изменение оптической плотности ацетоновых и водно-ацетоновых экстрактов в зависимости от времени хранения сырья представлены в табл. 4.8.

Таблица 4.8. Изменение оптической плотности поглощения ацетоновых и водно-ацетоновых растворов макроводорослей *Jenit* (M) и *Jemo* (D)

		$\lambda, \text{nm}/\text{ОП}$							
Исходный образец	<i>Jenit</i> (M)				<i>Jemo</i> (D)				
	M-I (100 %)		M-II (50 %)		D-I (100 %)		D-II (50 %)		
	<i>Car</i>	<i>Chl</i>	<i>Car</i>	<i>Chl</i>	<i>Car</i>	<i>Chl</i>	<i>Car</i>	<i>Chl</i>	
2013	~420	~660	~420	~670	~420	~660	~440	~670	
	1,60	0,66	2,20	1,70	1,30	0,44	1,90	1,19	
2016	0,45	0,13	1,00	0,19	0,19	0,07	0,80	0,34	
Снижение выхода экстрактов, %	71	80	54	88	84	84	60	71	

На основании сравнения приведенных данных (рис. 4.17 -а и -б) и в таблице (4.8) можно сделать вывод, что после длительного хранения образцов водорослей *Jenit* и *Jemo* в виде сухой биомассы *меньше сохраняются* хлорофиллы, которые экстрагируются в ацетоновые и водно-ацетоновые растворы из водорослей *Jenit* (М). В водорослях *Jemo* (D) хуже сохраняются те каротиноиды и хлорофиллы, которые экстрагируются ацетоновые экстракты.

Таким образом, длительное хранение высушенного сырья водорослей в течение длительного времени без специальных изменений условий хранения приводит к резкому снижению содержания всех пигментов и других ценных природных веществ. После этого заключения становится важным решение проблемы сохранения сырья водорослей за счёт стерилизации. При использовании радиационной стерилизации необходимо выяснение возможных изменений состава биологически важных компонент в экстрактах различных морекультур в пострадиационный период.

В заключение следует подчеркнуть, что *за последнее время* еще больше возрос интерес к поиску и выделению природных соединений из водорослей и других видов морекультуры. Важным вопросом современной биотехнологии остается радиационный метод стерилизации, поскольку можно сохранить не только сырье водорослей, но и важные в них активные компоненты. Многие сейчас активно используются для создания современных препаратов [87-91], противораковых препаратов [86, 88, 92-94], фоточувствительных нанокмполитов на базе фотосинтетических пигментов - каротиноидов, хлорофиллов, фикоэритринов. Структурные особенности этих соединений позволяют применять их в качестве органических полупроводников [87], фотосенсибилизаторов, ФС с заданными свойствами и полифункциональной активностью [48, 88, 93].

Для дальнейшего повышения результативности методов лечения онкологических больных с тяжелыми сопутствующими патологиями необходим поиск новых высокоэффективных фотосенсибилизаторов, ФС и изучения их фотоактивности *in vitro in vivo*. Повышенное внимание привлекают

ФС природного происхождения, которые метаболизируются и легко выводятся из организмов, или возвращаются в исходном нетоксичном состоянии, что существенно снижает побочные явления фотодинамической терапии, ФДТ. Из ФС хлоринового ряда в радиационной фототерапии стали успешно применять препараты «Фотодитазин» и «Радахлорин», которые являются производными хлорофилла *a* [88, 93]. В настоящее время большое внимание учеными мира уделяется светочувствительным пигментам из бурых водорослей для изготовления солнечных элементов [95]. Только использование физико-химических методов анализа и изучения фотоэлектрических свойств позволяет оценить функциональные особенности пигментов из природных источников.

Таким образом, пигменты хлорофилловой, каротиноидной фракций и другие активные соединения из бурых водорослей являются основой при создании не только ценных фармпрепаратов с антиокислительной и радиопротекторной активностью, но и светочувствительных фотосенсибилизаторов с заданными физико-химическими свойствами и функциональной активностью.

Выводы

1. Методом спектрофотометрии показано, что эффективность экстракции активных соединений каротиноидной и хлорофилловой фракций из макроводорослей *Laminaria Japonica Jenit, Jemo* и микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* зависит от вида и природы водорослей, состава растворителей и от времени хранения в виде сухой биомассы, при этом хлорофилл в *Cylindrotheca Closterium* сохраняется лучше, чем в макроводорослях *Laminaria Japonica Jenit* и *Jemo*.
2. На основании спектрофотометрических исследований влияния разбавления экстрактов морских водорослей на оптические характеристики растворов экстрактов сделан вывод, что часть каротиноидов за счет межмолекулярных взаимодействий находится в агрегированном состоянии. В результате химических реакций в концентрированных растворах агрегаты могут разрушаться, что приведет к увеличению содержания индивидуальных молекул каротиноидов.
3. Методом спектрофотометрии показано, что соединения, извлекаемые в спиртовые экстракты из микроводорослей *Cylindrotheca Closterium* и макроводорослей *Laminaria Japonica*, имеют высокую устойчивость к ионизирующему излучению дозой до 20 кГр.
4. Для объяснения механизма редокс реакций каротиноидов и хлорофиллов в экстрактах водорослей использованы результаты радиационно-химического моделирования реакций пигментов в зависимости от природы насыщающего газа (He, O₂, N₂O) в растворах с участием промежуточных частиц с разными редокс потенциалами.
5. Установлено, что в экстрактах водорослей, насыщенных окисью азота, при радиолизе усиливаются окислительные процессы с дополнительным образованием радикалов OH с высоким окислительным потенциалом. Водно-спиртовые и водно-ацетоновые экстракты каротиноидов в присутствии O₂

более устойчивы к облучению, ввиду присутствия каротиноидов в виде оксокомплексов с частичным переносом заряда, чем экстракты, насыщенные гелием или закисью азота.

6. Показано, что зависимость деструкции хлорофилловой фракции водорослей *Jemo-D* в водно-ацетоновых растворах, насыщенных гелием или закисью азота, имеет сложный колебательный характер при дозах < 0.3 кГр.
7. Впервые методом тонкослойной хроматографии из экстрактов макроводорослей водорослей *Jenit* и *Jemo* (Мьянма) выделен каротиноид, который по спектрам оптического поглощения и результатам люминесцентного анализа соответствует фукоксантину.
8. Обнаружено, что в водно-спиртовом растворе монокристаллический фукоксантин, выделенный методом тонкослойной хроматографии из микроводорослей *Cylindrotheca Closterium*, обладает меньшей радиационной стабильностью, чем фракция фукоксантина ($\lambda=450-540$ нм) из водно-спиртового экстракта водорослей.

Список использованной литературы

1. Кизеветгер И.В., Грюнер В.С., Евтушенко В.А. Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений. - М.: Пищ. промышленность, 1967. - 416 с.
2. Облучинская Е.Д. Технологии лекарственных и лечебно-профилактических средств из бурых водорослей. – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2005. - 164 с.
3. Борисочкина Л.И., Кутузова Н.А. Производство пищевой продукции из морской капусты. Экспрес–информация ЦНТИИТЭИРХ. - 1987. -Вып.1. - С. 1-13. Сер. Обработка рыбы и морепродуктов.
4. Khairy Hanan. M., El-Sheikh Mohamed A. Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. Saudi Journal of Biological Sciences, Volume 22, Issue 5, September 2015, Pages 623-630.
5. Кадникова И.А., Аминина Н.М., Рогов А.М. Ферментативная обработка морских водорослей - перспективный способ получения кормовых добавок для марикультуры. В сборнике: Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием. Под редакцией Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. 2014. С. 415-416.
6. Суховеева М.В., Шмелькова Л.П. Новые виды сырья и перспективы их использования водорослевой промышленностью. Промысловые водоросли и их использование. - М.: ВНИРО, 1981. С. 39-44.
7. Возжинская В.Б., Камнев А.Н. Экологобиологические основы культивирования и использование морских донных водорослей. - М.: Наука, 1994.-202 с.
8. Беседнова Н.Н. Морские гидробионты - потенциальные источники лекарств. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014; Т. 57. № 3. С. 4-10.

9. Хотимченко Ю.С. Биологически активные вещества из морских гидробионтов - источник новых фармацевтических субстанций и лекарств // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 2. С. 5-9.
10. Black W.A.P. The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British Laminariceae and Fucaceae // J. Sci. Food and Agr.; 1954. V.5. N 9. P. 445.
11. Chen X., Xing R., Yu H., Liu S., Li P. A new extraction method of fucoidan from the soaked water of brown seaweed (*Laminaria japonica*) // Desalination and Water Treatment. 2012. V. 40. N 1- 6. P. 204-208.
12. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. - М.: Мир, 1986. 34 с.
13. Vieira Flávia. A., Guilherme Ricardo J.R., Neves Márcia C., Abreu Helena, Rodrigues Eva R.O., Maraschin Marcelo, Coutinho João A.P., Ventura Sónia P.M. Single-step extraction of carotenoids from brown macroalgae using non-ionic surfactants // Separation and Purification Technology, Volume 172, 1 January 2017, Pages 268-276.
14. Нехорошев М.В., Рябушко В.И., Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г. Культивируемые водоросли коммерческий источник антиоксидантов // Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15. № 1. С.74.
15. Жуков Б. Симпозиум МАГАТЭ по лучевой стерилизации медицинских продуктов // Атомная энергия. 1967. Т. 23. Вып. 6. С. 584-585.
16. Пикаев А.К. Экологические применения радиационной технологии // Химия высоких энергий. 1994. Т. 28. № 1. С. 5-16.
17. Ревина А.А., Цыба И.А., Нехорошев М.В., Парамонова Л.И. Радиационно-химические превращения альгиновой кислоты альгината натрия // Радиационная биология и радиоэкология. 1996. Т.36. Вып. 3. С. 380- 386.
18. Барашков Г.К. Сравнительная биохимия водорослей. - М.: Пищевая промышленность, 1972. 355 с.

19. Кизеветтер И. В., Суховеева М.В., Шмелькова Л.П. Промысловые морские водоросли и травы дальневосточных морей. - М.: Легкая и пищевая промышленность. 1981. -113 с.
20. Корзун В.П., Сагло В.И., Парац А.Н., Дервяго И.Б., Воронова Ю.Г. Возможности использования продуктов моря для профилактики накопления в организме радионуклидов цезия и стронция// Тезисы докладов совещания «Научно- технические проблемы марикультуры в стране».- Владивосток: ТИНРО, 1989. С. 200-201.
21. Haug A., Smidsrod O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions with Ca^{++} and Sr^{++} // Acta Chem. Scand. 1970. V. 24. N 3. P. 843-854.
22. Каротиноиды в онкологии. Материалы Симпозиума Онкологического центра РАМН. М.: 1992. 154 с.
23. Сиренко Л.А., Паршикова Т.В. Каротиноиды гидробионтов // Экология моря. 2005. С. 63-67.
24. Корнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука, 1988. 241 с.
25. Нехорошев М.В., Ревина А.А., Апрышко Г.Н., Черноморские организмы - источник потенциальных противоопухолевых препаратов// Российский биотерапевтический журнал. 2004. Т.2. С.27.
26. Riccioni G. Marine carotenoids and oxidative stress // Mar. Drugs. 2012. V. 10. P. 116-118.
27. Рябушко В.И., Мусатенко Л.И., Войтенко Л.В., Попова Е.В., Нехорошев М.В. Функциональная роль фукоксантина и фитогормонов из морских бурых водорослей // Algologia. 2014, Т.24. № 1. С. 20-32.
28. Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Кушнерова Т.В., Хотимченко Ю.С., Кондратьева Е.В., Другова Л.А. Экстракт из бурой водоросли *Laminaria japonica* – перспективный стресс-протекторный препарат // Биология моря. 2010. Т. 36. № 3. С. 215-220.

29. Riccioni G., D'Orazio N. Franceschelli S. et al. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers // *Mar. Drugs*. 2011. V. 9. P. 1166-1175.
30. Peng J., Yuan J., Wu C. et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and ion activities relevant to human health // *Mar. Drugs*. - 2011. V. 9. P. 1806-1828.
31. Ревина А.А., Нехорошев М.В., Ларионов О.Г., Суворова О.В. Радиационно-химическое моделирование реакций с участием биологически активных каротиноидов из водорослей *Cystoseira Barbata* и из мидий *Mytilus Galloprovincialis*// Тезисы IV Баховской конференции по радиационной химии в рамках конференции «Физико-химические основы новейших технологий XXI века» 1-3 июня 2005 г. Москва. С. 105.
32. Парамонова Л.И., Ревина А.А., Лизунков А.Ф., Милованов В.К. Взаимодействие каротиноидов с супероксид анион-радикалом в связи с их стабилизирующим действием при крио консервации // Доклады ВАСХНИЛ. 1989.Т. 11.С. 30-32.
33. Revina A.A, Role of reversible oxygen complexes of copper-containing enzymes in charge-transfer reaction // III Int. Conference on Protein Stabilization «Biocatalyst Stability». Toulouse. 2002. P. 23-28.
34. Прохорова Л.И., Ревина А.А. Роль лабильных комплексов с кислородом в антиоксидантной активности каротиноидов // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40. № 2. С. 156.
35. Vieira Flávia A., Guilherme Ricardo J.R., Neves Márcia C., Rego Andreia, Abreu Maria H., Coutinho João A.P., Ventura Sónia P.M. Recovery of carotenoids from brown seaweeds using aqueous solutions of surface-active ionic liquids and anionic surfactants // *Separation and Purification Technology*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 6 May 2017.
36. Жесткова Т.П., Полковников В.К., Непомнящий О.Н., Пикаев А.К. Импульсный фотолиз этилового спирта // Журнал прикладной спектроскопии. 1979. Т.30. Вып. 4. С. 745.

37. Бучаченко Л.П., Покровская М.Ю. Комплексы молекулярного кислорода с п-электронными органическими молекулами // Ж.Ф.Х. 1967. LXI. Вып. 6. С. 1569.
38. Ревина А.А. Радиационно-химическое моделирование быстро протекающих процессов с участием промежуточных кислородсодержащих реакционных центров в различных системах. Дисс. д.х.н. 1995. Москва, ИХФ РАН.
39. Бах А. О роли перекисей в процессах медленного окисления // Журн. Рус. физ.-хим. о-ва. 1897. Ч. Химия Т. 29. № 6. С. 373-398.
40. Engler C., Wild W. Uber die Sogenannte "Activirung" des Sauerstoffs und uber Super oxyd bildung // Ber. 1897. Jr. 30. Bd. 2. S.1669-1681.
41. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В., Мейчик Н.Р., Носов А.М., Полесская О.Г., Харитонашвили Е.В., Чуб В.В. // Физиология растений /Ред. И.П. Ермакова. М.: Изд-во «Академия». 2007. 640 с.
42. Kraan S. 6 - Pigments and minor compounds in algae // in Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals, Oxford Cambridge Philadelphia New Delhi, WPL. 2013, P. 205-251.
43. Хлорофиллы - их состав, структура и свойства, [электронный ресурс:] <http://biofile.ru/bio/19385.html>, (дата обращения: 07.05.2016).
44. Стаднийчук И.Н., Фикобилипротеины. Биологическая химия (Итоги науки и техники. ВИНТИ АН СССР) - М.: 1990. 40. 196 с.
45. Кочубей С.М. Организация фотосинтетического аппарата высших растений / С.М. Кочубей. – Киев: Изд-во «Альтерпрес», 2001. - 205 с.
46. Прохорова Л. И., Ревина А. А, Щитков К. Г. Влияние фукоксантина на токсический эффект платидиама //Российский биотерапевтический журнал, 2004. Т.3 . № 2. С. 29-30.
47. Нехорошев М. В., Ревина А. А., Апрышко Г. Н. Черноморские организмы - источник потенциальных противоопухолевых препаратов Российский биотерапевтический журнал, 2004. Т.3 . № 2. С. 27.

48. Лобанов А.В. Магниевые комплексы тетрапирролов: молекулярная агрегация, координационные и фотохимические свойства // Тезисы VI межд. конф. по физической химии краун-соединений, порфиринов и фталоцианинов. 2016. Туапсе. С. 34.
49. Ефимов А.А., Белова Т.П., Ефимова М.В. Обоснование использования синезеленых водорослей для выделения хлорофилла и фикобилипротеинов как пищевых красителей и биологически активных веществ // Научный журнал "Фундаментальные исследования" РАЕН, №11, 2007 год, www.raen.ru
50. Долматова М.Ю., Пантелеева А.П. Исследование некоторых ионно-обменных свойств альгиновой кислоты и ее взаимодействие с двух- и трехвалентными катионами // Радиохимия. 1968. Вып. 10. №3. С. 15-19.
51. Евтушенко В.А., Назарьева Е.В. К вопросу о химической природе альгиновой кислоты // Тез. докладов «Радиационная и химическая экология гидробионтов. - Киев: Наук. думка, 1972. - С. 85-90.
52. Пантелеева А.П. Некоторые закономерности взаимодействия альгиновой кислоты с катионами металлов // Радиационная и химическая экология гидробионтов. - Киев: Наук. думка, 1972. - С. 112-115.
53. Haug A., Larsen B., Smidsrod O. Studies on the sequence of uronic acid // ActaChem. Scand. 1967. Vol. 21. N. 3. P. 691-704.
54. Haug A., Larsen B., Smidsrod O. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis // Acta Chem. Scand. 1967. V. 21. N. 3. P. 697-704.
55. Подкорытова А.В., Аминина Н.М., Левачёв М.М., Мирошниченко В.А. Функциональные свойства альгинатов и их использование в лечебно-профилактическом питании // Вопросы питания. 1998. № 3. С. 26.
56. Haug A. Composition and properties of alginates // Report No 30. Oslo: Norwegian Inst. Of Seaweed Res. 1964. - 123 p.
57. Корзун В.И., Сагло В.И., Карачев И.И., Воронова Ю.Г., Подкорытова А.В. Возможности использования продукции марикультуры в

- профилактике внутреннего облучения // Проблемы радиационной медицины.- Киев: 1992. С. 120-124.
58. Patra JK, Das G, Baek KH. Chemical Composition and Antioxidant and Antibacterial Activities of an Essential Oil Extracted from an Edible Seaweed, *Laminaria japonica* // *Molecules*. 2015 Jul 2. 20 (7): 12093-113.doi: 10.3390 / molecules 2007 12093.
59. Rees D.A. The carrageenans system of polysaccharides. 1. The relation between the κ - and λ -components // *J. Chem. Soc.* - 1963. - Vol. 1. - P. 1821-1832.
60. Craigie J.S. Cell wall // In: Cole K.M. and Sheath R.G. (eds.), *Biology of the red algae*, Cambridge: Cambridge University Press. 1990. P. 221-257.
61. Усов А.И. Проблемы и достижения в структурном анализе сульфатированных полисахаридов красных водорослей // *Химия растительного сырья*. - 2001. - № 2. - С. 7-20.
62. Lahaye M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry // *J. Appl. Phycol.* 2001. V. 13. P. 173-184.
63. Chiovitti A., Basic A., Craik D.J., Munro S.L., Kraft G.T., Liao M.L., Falshaw R., Furneaux R.H. A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sacronemafiliforme* // *Carbohydr. Res.* 1998. V. 314. P. 229-243.
64. Knutsen S.H. Isolation and analysis of red algal galactans: Dr. Sci. Thesis. University of Tronheim, Norway, 1992. -96 p.
65. Гурылева О.Н., Аминина Н.М., Пак Х. И. Исследование химического состава бурых водорослей *SARGASSUM FULVELLUM* и *SARGASSUM-MIYABE* и их сульфатированных полисахаридов. // *Известия ТИНРО*. 2006. Т. 147. С. 338-342.
66. Усов А.И., Клочкова Н.Г. Бурые водоросли Камчатки как источник маннита // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. № 11. С. 1236-1241.
67. Сисулин И.С., Ширяева Е.С., Фельдман В.И. Радикалы в облученном D-манните структура конформации и возможности использования в

- дозиметрии // VI Российская конференция (с приглашением специалистов из СНГ) «Актуальные проблемы химии высоких энергий». Москва, 2015. С. 330-334. ООО Издательская группа- «Граница». 361 с.
68. Chen Kewei, Ríos José Julián, Pérez-Gálvez Antonio, Roca María. Comprehensive chlorophyll composition in the main edible seaweeds // Food Chemistry, Volume 228, 1 August 2017, Pages 625-633.
69. Ревина А. А., Геворгиз Р. Г., Лозинина С. С., Железнова С. Н., Тхан Тайк, Павлов Ю. С., Нехорошев М. В., Рябушко В. И. Оптические свойства и радиационная стабильность экстрактов морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimannet Lewin // Журнал Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 2. С. 173-182.
70. Parjikolaei Behnaz Razi, Kloster Laila, Bruhn Annette, Rasmussen Michael Bo, Frette Xavier C., Christensen Knud V. Effect of Light Quality and Nitrogen Availability on the Biomass Production and Pigment Content of *Palmaria palmata* (Rhodophyta) // Journal Chemical Engineering Transactions. 2013. Vol. 32, Pp. 967-972.
71. Zhu Zhenzhou, Wu Quian, Di Xiaohui, Li Shuyi, Barba Francisco. J. Koubaa Mohamed, Roohinejad Shahin, Xiong Xingao, He Jingren. Multistage recovery process of seaweed pigments: investigation of ultrasound assisted extraction and ultrafiltration performances // Food and Bioproducts Processing, In Press, Accepted Manuscript, Available online 28 April 2017.
72. Kawachi M., Noël M. H. Sterilization and sterile technique / Andersen R. A. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, 2005. P. 65-82.
73. Пикаев А. К. Современная радиационная химия. Радиолит газы и жидкостей. М.: Наука, 1986. 440 с.
74. Н. А. Бах. Окисление органических соединений под воздействием ионизирующего излучения. // Сб. работ по радиационной химии. М.: Изд-во АН СССР, 1955. С. 155.

75. Эмануэль Н. М. Механизм действия антиоксидантов. Современные представления. // Нефтехимия, 1982. Т. 42. Вып. 3. С. 435.
76. Эмануэль Н.М. Кинетические признаки цепного механизма процессов жидкофазного окисления. – В кн .: Проблемы химической кинетики // Под ред. Кондратьева В.Н. М.: наука. 1979. С. 118-138.
77. *Revina A. A., Amiragova M. I., Volod'ko V.V., Vannikov A.V.* Kinetics and Mechanism of Superoxide Radical Reactions with some Biologically important Compounds in Aqueous Solutions. Pulse Radiolysis // *J. Radiat. Phys. Chem.* 1989. V. 34. N. 4. P. 653-665.
78. *Sergeev A.G., Pavlov A.R., Revina A.A., Yaropolov A.I.* The Mechanism of Interaction of Ceruloplasmin with Superoxide Radicals// *Int. J. Biochem.* 1993. V. 25. N. 11. P. 1549.
79. Ладыгин Б.Я., Сараева В.В., Ревина А.А., Зими́на Г.М. Вклад радиационно-химических исследований в общую теорию жидкофазного окисления органических соединений // *Российский химический журнал.* 1996. Т. XL. № 6. С. 78-89.
80. Пикаев А.К. Дозиметрия в радиационной химии. М.: Наука. 1975. 312 с.
81. Škrovánková Soňa. Seaweed Vitamins as Nutraceuticals // *Advances in Food and Nutrition Research*, 2011. V. 64. Pages 357-369.
82. Бах А.Н. Современное состояние учения о процессах медленного окисления и активации кислорода // *Успехи химии.* 1934. Т. 3. С. 177.
83. Павлов Ю.С., Ревина А.А., Кузнецов М.А., Суворова О.В., Сурма А.М., Лагов П.Б., Быковченко Т.В., Завьялов М.А., Филлипович В.П., Доброхотов В.В., Павлов В.А. Непомнящий О.Н. Промышленные электронно лучевые технологии, реализованные на ускорителе УЭЛВ-10-20-С-70-2 // VI Российская конференция (с приглашением специалистов стран СНГ) «Актуальные проблемы химии высоких энергий» г. Москва. 20-22 октября 2015 г. -368 с., (С.268-278).

84. М. Отто. Современные методы аналитической химии. (Перевод с нем. под ред. Гармаша А.В). 2003 г. Издательство: «Техносфера» Т.1. 407с.
85. Бородина А. В., Ладыгина Л. В. Влияние условий культивирования *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM BOHL.(BACILLARIOPHYTA)* на накопление каротиноидов // Альгология. 2013. Т. 23. № 2. С. 138-149.
86. Grin M.A., Bregadze V.I., Shtil A.A, Anti-Cancer Agents // Med.Chem.- 2008. N. 8. P. 683-97.
87. Pandey R.K., Chitgupi U., Lakhminarayanan V.J. Porphyrins Phthlocyanines. - 2012. - 16 – P. 1055-8.
88. Брусов С. С., Ефременко А. В., Лебедева В. С., Шепелина Е. Ю., Полномарев Ф. В., Феофанов Ф. В., Миронов А. Ф., Грин М. А. Влияние положительного заряда в структуре фотосенсибилизаторов хлоринового ряда на фотоиндуцированную противоопухолевую активность// Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 4, № 4. С. 87-92.
89. Kalu Kapuge Asanka Sanjeewa, Eun-A Kim, Kwang-Tae Son, You-Jin Jeon. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, V. 162. 2016. P. 100-105.
90. Kazuo Miyashita, Nana Mikami, Masashi Hosokawa. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review in Advances in Food and Nutrition Research, 2011.V. 64. Pages 357-369.
91. Takaichi S. Carotenoids in algae: Distributions, biosynthesis and functions // Mar. Drugs. 2011. № 9, P. 1101 – 1108.
92. Kotake-Nara E., Kushiro M., Zhang H. et al. Carotenoids effect proliferation of human prostate cancer cells // J. Nutr. 2001. № 131. P. 3303 – 3306.
93. Каплан М.А., Капинус Ю.С., Романко Е.В., Ярославцева - Исаева Е.В. Фотодитазин эффективный фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал, 2004. Т. 3 .№ 2. С. 51.
94. Геворгиз Р.Г, Железнова С.Н., Нехорошев М.В., Бобко Н.И., Зозуля Ю.В., Уваров И.П. Промышленная технология получения фукоксантина-

морского противоопухолевого каротиноида // Программа XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием им. А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» г. Москва 16-17 марта 2017 г. С. 14.

95. Calogero Giuseppe, Citro Ilaria, Marco Gaetano Di, Minicante Simona Armeli, Morabito Marina, Genovese Giuseppa. Brown seaweed pigment as a dye source for photoelectrochemical solar cells // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. Vol. 117. P. 702-706.

Список сокращений

Фк, Fc, - фукоксантин

Car - каротиноид

Chl - Хлорофилл

C. Closterium - Cylindrotheca Closterium

ПРЭ - пост радиационный эффект

ОП - оптическая плотность

БАВ - биологически активные вещества

БАС - Биологически активные соединения

ПАВ - поверхностно - активное вещество

БАД - биологическая активная добавка

ЭПР - электронный парамагнитный резонанс

ФДТ - фотодинамическая терапия

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ФС - фотосенсибилизатор

vitro - эксперимент вне живых организмов

vivo - эксперимент на живом организме

СОД - супероксиддисмутаза

Приложение 1

Морские бурые водоросли в природе и основные направления их использования

Ламинария японская – это один из видов водорослей рода бурых водорослей семейства ламинариевых. Произрастает ламинария в дальневосточных и северных морях. По видам ламинария подразделяется: на ламинарию сахаристая (*Laminaria saccharina*), ламинарию японская (*Laminaria japonica*) и ламинарию пальчато-рассеченная (*Laminaria digita*) [1, 2, 3]. *Ламинария* представляет собой водоросль бурого цвета с длиной стеблей от трёх до пяти метров. От этого «стебля» отходят менее длинные «листья» - слоевища, длина их до семидесяти сантиметров. Именно эти слоевища и используют в лекарственных целях. При этом берут только большие слоевища, которые растут уже не менее двух лет. Сушат ламинарию на солнце. *Ламинария* (*Laminaria japonica*) ее пластина усеченная, удлиненная (длина от 2 м до 6 м, иногда до 12 м, а ширина от 10 см до 35 см), расположенная несколько косо на стволе. Орган прикрепления - ризоиды. По продольной оси пластины проходит широкая и толстая срединная полоса, занимающая половину ширины и ограниченная по краям двумя продольными складками. Молодые слоевища часто имеют два ряда выпуклостей и вмятин на месте продольных складок. Слизистые каналы в пластине расположены между сердцевинной и кромкой, часто в два ряда, особенно в срединной полосе. Сердцевина в пластине уже, чем у других видов. У молодых слоевищ ствол цилиндрический, у немолодых - уплощенный или желобчатый. Пластина плавно переходит в ствол, в котором всегда имеются слизистые каналы. Слоевища ламинарии японской растут два года. На южной границе распространения они однолетние. *Ламинария японская* считается самым ценным промысловым видом среди бурых водорослей. Она обладает наилучшими вкусовыми качествами. Ее пластина толще и менее жесткая, чем у

других видов рода *ламинария*. Наибольшую пищевую ценность имеет утолщенная средняя полоса слоевищ второго года. Первые слоевища считаются непромысловыми, хотя они и достигают крупных размеров: пластина у них узкая, тонкая и содержит меньше питательных веществ. *Ламинарию японскую* используют для приготовления первых, вторых и третьих блюд, а также в виде добавок в разнообразные кондитерские изделия. Слоевища или их части, непригодные для пищевого использования, идут в химическую переработку для получения альгинатов, маннита, иода и других важных соединений. *Ламинария японская* растет в местах с постоянным движением воды, она встречается на глубине ~ 25 м, реже ~ 35 м. Промысловые заросли находятся в основном на глубине 4÷10 м. Этот вид водорослей распространен в северной половине Японского моря, от побережья Северной Кореи и северной части острова Хонсю до 50 ° с. ш., а также у южного и юго-восточного берега Сахалина и у южных Курильских островов. Заросли у некоторых островов Малой Курильской гряды дают наибольшую биомассу до 140 кг/м². В 20-х годах нашего столетия зачатки *ламинарии японской* были случайно завезены в Желтое море к побережьям Ляодунского и Шаньдунского полуостровов. В КНР были разработаны методы ее искусственного разведения, и сейчас ее культивируют вдоль побережья вплоть до Кантона. В естественных условиях запасы *ламинарии японской* подвержены сильным колебаниям. Это отражается на объеме заготовок. Большой урон зарослям наносят сильные штормы, поэтому ученые издавна пытались увеличить искусственные площади под ламинарией японской или найти возможность их культивирования [4, 5].

К бурым водорослям относится Черноморская *Cystoseira*. В Черном море произрастают два вида *цистозир* (*Cystoseirabarbata*(Stackh.) C. Agardh и *C. CriniteDuby*), относящиеся к ряду *Fucales*, семейству *Sargassaceae*. *Цистозира* - самая крупная водоросль в Черном море, средняя длина ее слоевища составляет 60÷70 см. Она образует в прибрежье обширные заросли преимущественно на глубине 0,5÷10 м на твердых скалистых и каменистых грунтах со средней биомассой 3 кг/м². Средняя продолжительность жизни цистозир составляет

8÷10 лет, но она может достигать возраста 15 лет и более. В Черном море произрастают 2 вида бурых водорослей цистозеры: *Cystoseira barbata* (Stackh.) и *Cystoseira Agardh*. Цистозера - самая крупная водоросль, средняя длина ее слоевищ составляет 60-70 см.

В хроматофорах *черноморской* бурой водоросли *Cystoseira* содержится большое количество разных каротиноидов. Среди них пигмент *фукоксантин* ($C_{40}H_{56}O_6$), который обладает самой высокой биологической активностью. Содержание фукоксантина в морских водорослях колеблется в зависимости от сезона и стадии развития растений. Экспериментальные данные показали, что в апреле и мае его содержание в водорослях максимально. В результате научных исследований оптических свойств и биологической активности фукоксантина установлены его антиоксидантные, антираковые, противоопухолевые, антидиабетические и другие свойства [6, 7]. Фукоксантин часто используют в косметологии, применяют для отбеливания и улучшения состояния кожи.

Наиболее известным и важным свойством каротиноидов является их *антиоксидантная* протекторная активность. Фукоксантин обладает сильным антиокислительным свойством и в кислородных условиях, и в отсутствие кислорода. Другие каротиноиды (ликопин, астаксантин, зеаксантин и др.) практически не проявляют антиоксидантную активность в аэробных условиях. В то время, как большинство тканей живых организмов при физиологических условиях содержат молекулярный кислород. Кроме того, типичные антиоксиданты обычно являются донорами протона (аскорбиновая кислота, α -токеферол, глутатион), а фукоксантин - донором электрона, что отвечает за его антирадикальную активность. Комбинация этих отличительных свойств редко встречается среди природных пищевых компонентов. Показано, что свободные радикалы и оксидантный стресс ответственны за патогенез онкологических заболеваний [8-11]. Таким образом, каротиноиды, благодаря их антиокислительным свойствам, являются эффективными противораковыми молекулами.

В настоящее время проводятся эксперименты по уточнению возможной защитной роли фукоксантина при сердечно-сосудистых заболеваниях. Этот каротиноид значительно уменьшает повреждения нервных клеток при гипоксии и реоксигенации, возможно, благодаря его антиоксидантной активности, оказывает благоприятное воздействие при цереброваскулярных заболеваниях и проявляет активность против ишемического некроза нейронов при гипертонии. Установлено также, фукоксантин обладает сильным и безопасным антипролиферативным действием на эпителиальные клетки капсулы хрусталика глаза и может применяться при лечении катаракты [12]. По сравнению с рядом других каротиноидов, фукоксантин имеет самую низкую константу тушения синглетного кислорода, $^1\text{O}_2$, но при этом самую высокую константу реакции ингибирования супероксид анион - радикалов, отвечающих за развитие катаракты, особенно у детей [13, 14]. Предполагается, что фукоксантин обладает противораковой активностью, усиливая апоптоз и останавливая пролиферацию раковых клеток. Считают, что этот пигмент принимает участие в регуляции клеточного цикла [15]. Фукоксантин особенно активен при лечении в случае рака кожи, предстательной железы, толстой кишки и лейкемии, индуцируя апоптоз раковых клеток различного генезиса [16]. Хотя противоопухолевый эффект фукоксантина уже описан во многих работах, точные механизмы его действия ещё не выяснены. Поэтому во многих странах мира учёные продолжают активно исследовать противоопухолевые свойства и механизм антиоксидантной активности не только фукоксантина, но и его комплексов с разными активными компонентами водорослей и других морских организмов [17, 18].

Влияние фукоксантина на снижение массы тела. Увеличение количества тучных людей в XX веке признано международной проблемой. Эта проблема может быть второй после курения самой важной, но предотвратимой причиной смерти. Чрезмерное накопление жира в теле и в белой жировой ткани вызывает у людей ожирение и нарушение выделения цитокинов из жировой ткани, что

приводит к увеличению риска многих заболеваний, например, таких, как диабет типа II, гиперлипидемия, гипертония и сердечно - сосудистые патологии [19].

В результате исследований *in vivo* была показана антидиабетическая активность фукоксантина на группемышей. Фукоксантин заметно уменьшал уровень глюкозы в крови и инсулина плазмы, так же как и потребление воды у диабетических тучных мышей [20]. Высказано предположение, что этот каротиноид улучшает устойчивость к инсулину, а у больных диабетом уменьшает уровень глюкозы в крови.

Комбинирование фукоксантина, выделенного из бурых водорослей, с маслом или липидами увеличивает его усвояемость в организме человека и может быть использовано для создания лекарственных препаратов. Дальнейшая разработка эффективных технологий выделения фукоксантина из водорослей необходима для исследования биологических свойств каротиноида и проведения клинических испытаний препаратов, созданных на его основе. В Черном море имеется достаточное количество доступного сырья (учитывая штормовые выбросы), бурых водорослей рода *Cystoseira*, которые являются перспективным сырьем для получения биологически активных веществ, в том числе фукоксантина, фитогормонов и полифенольных соединений.

В бурых водорослях обнаружены практически все известные *фитогормоны* высших растений, такие как ауксины, цитокинины, салицилаты и олигосахариды. Растительные гормоны - это низкомолекулярные органические вещества, вырабатываемые растениями в исключительно малых концентрациях и влияющие на многие физиологические процессы, такие как рост, развитие и ответ на абиотические и биотические стрессы. Фитогормоны морских водорослей исследованы значительно меньше, чем у высших наземных растений, однако уже получены результаты, подтверждающие их полифункциональную активность. Ряд обнаруженных косвенных эффектов позволяют предположить, что именно эти активные фитогормоны возникли на наиболее ранних этапах эволюции [21].

Дальнейшая разработка эффективных методов и современных технологий выделения фукоксантина и других БАС из водорослей необходима для исследования их биологических и фотодинамических свойств, проведения клинических испытаний препаратов, созданных на их основе, и успешного внедрения в виде фармпрепаратов и биологически активных добавок, БАДов.

Приложение 2

Культивирование бурых морских водорослей

Водоросли – фотосинтезирующие организмы, ведущие свободный и симбиотический образ жизни. Распространенные по всему земному шару, в самых разнообразных местообитаниях, они играют огромную роль в жизни природы и человека. В связи с этим водоросли являются перспективными объектами для проведения междисциплинарных научных исследований в области физиологии, биохимии, биофизики, генетики, космической биологии. Водоросли используют для повышения продуктивности водоемов и плодородия почв, получения биологически активных веществ и различных пищевых и кормовых добавок. В последнее время проводятся исследования, направленные на изучение возможности использования водорослей для получения биотоплива и поглощения углекислого газа из атмосферы. В приложении 3 описана практическая ценность, биологическая активность соединений из морских бурых водорослей и важность использования фотоактивных соединений из пигментов водорослей в медицине, например, для фотодинамической терапии в онкологии. Широко обсуждаются вопросы, связанные с перспективным использованием БАС и активных светочувствительных пигментов из водорослей в нанoeлектронике и нанoфотонике. Поэтому встает очень серьезно вопрос о расширении производства различных ценных препаратов из морепродуктов за счет внедрения технически управляемых и контролируемых методов высокотехнологичного их культивирования.

Многие методы и рецепты основных питательных сред, которые используются в настоящее время, были предложены в конце XIX и начале XX веков. В книге «Современные методы выделения и культивирования водорослей» [22] излагаются этапы исторического развития методов выращивания водорослей. Рассматриваются вопросы, связанные с культивированием водорослей, с указанием разработанных методик

приготовления разнообразных питательных сред. Решаются проблемы, связанные с разработкой методов управления процессами выращивания водорослей и стерилизации питательных сред и водорослей.

Культивирование водорослей - автотрофных организмов, характеризуется наличием ряда особенностей. Основная особенность заключается в том, что для водорослей крайне важными факторами внешней среды являются свет, температура, содержание солей, минеральный режим и т.д. Водоросли за счёт фотосинтеза создают органические вещества (белки, жиры, углеводы, витамины) из углекислого газа и воды при воздействии солнечного света. Таким образом, изменением глубины и плотности посадки водорослей можно регулировать продуктивность процесса культивирования. Неудивительно, что промысел водорослей, возникнув как один из древнейших и примитивнейших видов сбора морекультур, к настоящему времени почти повсеместно в приморских странах достиг высокой интенсивности, что привело к деградации естественных ресурсов промысловых видов. Например, за период с 1960 по 1990 г. запасы ламинарии в Белом море снизились почти в два раза! В связи с прекращением промышленной добычи ламинарии ее запасы в последнем десятилетии XX в. несколько стабилизировались. При культивировании водорослей в настоящее время используют следующие подходы:

1. Экстенсивный способ получения посадочного материала и экстенсивное культивирование водорослей до момента сбора урожая применяются при культивировании ламинарии в двухгодичном цикле.

2. Интенсивный способ получения посадочного материала и экстенсивное культивирование водорослей до сбора урожая применяются при культивировании ламинарии в одногодичном цикле.

3. Сочетание интенсивного способа получения посадочного материала с интенсивным процессом культивирования до его окончания происходит при очистке сточных вод с помощью микроводорослей.

Культивирование водорослей имеет много преимуществ перед сбором их в естественных условиях:

- Происходит концентрирование водорослей в строго определенных районах, удобных для природопользователей.
- Ускорение роста растений ввиду применения специальных технологий: внесение удобрений, солей, подбор оптимальных параметров и.т.д.
- Облегчение заготовки водорослей.
- Сбор водорослей со специальных плантаций исключает опасность снижения природных запасов.

Морские плантации могут давать несколько урожаев в год, при этом не требуя затрат на пахоту, боронование и увлажнение. Технологии культивирования водорослей обычно сводятся к нескольким основным операциям: сбору спор, выращиванию рассады, получению товарной продукции и снятию урожая. Для каждого конкретного вида водорослей в эту схему могут вводиться те или иные дополнительные операции.

Продолжительность выращивания водорослей на плантациях колеблется от 4÷5 до 16÷18 месяцев в зависимости от культивируемого вида морекультуры, применяемых технологий и особенностей местного климата. Выращиваемые водоросли должны обладать тремя основными качествами:

1. Промысловой ценностью.
2. Быстрым ростом.
3. Высокой продуктивностью.

Среди культивируемых водных растений по объему первое место в мире занимают *бурые* водоросли (отдел Phaeophyta) [23, 24]. Бурые водоросли – это многоклеточные растения, толстая оболочка клеток которых состоит из внутреннего целлюлозного и наружного пектинового слоев. Пектиновый слой в основном состоит из альгиновой кислоты, ее солей и соединений с белковыми веществами. Альгиновая кислота является линейным гетерополисахаридом, состоящим из связанных остатков D- маниуронозой и L-гулууронозой кислот и известна только у бурых водорослей. Запасными питательными веществами

бурых водорослей в основном являются ламинарин и маннит (сахароспирт) и в незначительных количествах - жир. Растут бурые водоросли, прикрепленные к грунту или к другим водорослям. Важно, что плавающие формы водорослей не способны образовывать органы размножения. Их слоевище состоит из трех частей: примыкающей к субстрату пяты (на которой формируются органы прикрепления - ризоиды), черешка, который является многолетней частью слоевища и листовидной пластинки. Способы культивирования ламинарии представлены на рис. 1.

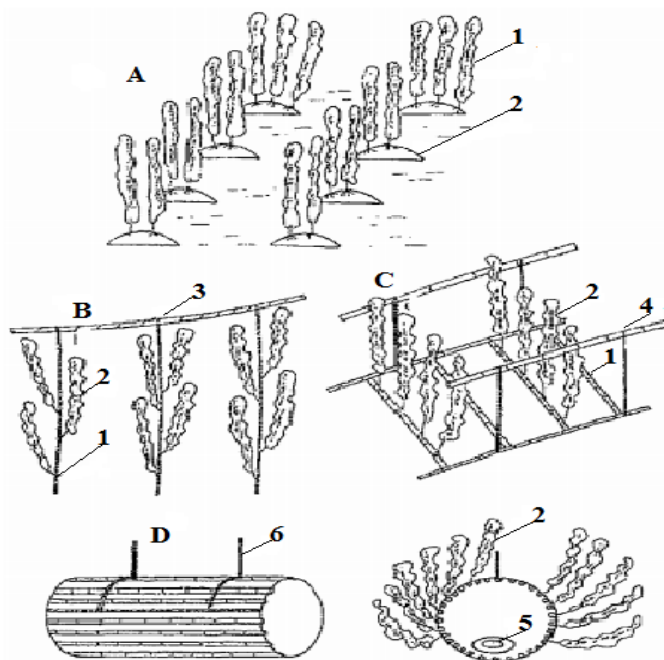


Рисунок. 1. Способы культивирования ламинарии: Донные культивирование (А): культивирование в толще воды (В, С, D) на вертикальных веревках (В), на бамбуковых рамах (С), на бамбуковых корзинах (D) соответственно.

1 - выростной субстрат, **2** - ламинария, **3** - несущий канат, **4** - бамбуковые опоры, **5** - горшок с удобрениями, **6** - подвесные канаты.

Возможность культивирования морской капусты в северных морях России была доказана еще в 1961 г. На базе Мурманского морского биологического института (ММБИ) Карельского филиала АН СССР, когда в Дальне-Зеленецкой губе Баренцева моря был вертикально установлен в воде квадратный стенд из сосновых бревен размером 2х2 м. Через 2 года всё

сооружение обросло морской капустой, вес которой в течение летнего сезона колебался от 140 до 600 кг.

В конце 70-х - начале 80-х гг. в истории культивирования ламинарии в Белом и Баренцевом морях начался новый этап, отмеченный серьезными теоретическими и практическими разработками завершившийся созданием и внедрением технологии аквакультуры ламинарии в полярных условиях. Этот успешный прорыв произошел благодаря деятельности лаборатории альгологии под руководством В.Н. Макарова сотрудника Мурманского морского биологического института. В 1983-1986 гг. альгологи из ММБИ с применением подобных [25] гидробиотехнических сооружений (ГБТС) получали в Баренцевом море 50-100 т сырой массы ламинарии с 1 га [26- 28]. Правда, на Севере России произрастает не *Laminaria japonica*, а *Laminaria. saccharina* - менее ценный в пищевом отношении вид морской капусты.

Ламинария японская - самый ценный вид среди бурых водорослей, обладающий наилучшими вкусовыми качествами. Распространен этот вид в Японском море. Заросли у некоторых островов Малой Курильской гряды дают наибольшую биомассу - 140 кг/м². Важное промысловое значение также имеют водоросли типа фукусовых (*Fucales*). Водоросли рода *Fucus* применяют в качестве источника альгинатов и других химических веществ, в качестве удобрений, как корм для скота, для производства кормовой муки и других целей. На берегах Белого моря фукус называют «морским горохом» за наличие на его слоевище воздухоносных пузырьков размером с горошину. На мелководье образуются значительные скопления зарослей фукуса, обнажающихся во время отлива. Род *Ascophyllum* вида *A. nodosum* распространен на берегах Азии, Европы, Северной Америки.

У бурых водорослей встречаются все формы размножения. Большинство бурых водорослей встречается в виде двух самостоятельных форм развития - спорофита и гаметофита, которые у разных видов бывают как сходного, так и различного размера и строения. Иными словами, существуют изоморфная и гетероморфная смены форм развития. При гетероморфной смене форм развития

одна из них бывает микроскопической, чаще всего это гаметофит. Так происходит, в частности, именно у ламинарии, где спорофит - крупный, многоклеточный, а гаметофит - невидим невооруженным глазом. Размножение осуществляется спорами.

Культивирование ламинарии сводится к двум основным типам выращивания: либо на грунте, либо в толще воды с применением разнообразных плавающих устройств [30]. Урожайность водорослевых плантаций резко возрастает при выращивании ламинарии в толще воды. Культивирование ламинарии в двухгодичном цикле первоначально было разработано в северных районах Японии. Наиболее удобны для размещения плантаций полузакрытые бухты, ограниченные далеко выступающими в море мысами. Они имеют хороший водообмен, что обеспечивает постоянный подток биогенов, и прикрывают плантации от волнения, что необходимо для проведения различных работ. Для выращивания морской капусты применяются гидробиотехнические сооружения двух типов:

Первичная обработка снятого урожая заключается в сушке, упаковке в тюки, заморозке, консервации и отправке потребителю.

Биотехнология культивирования ламинарии в одногодичном цикле состоит в:

- 1-получении ранних зооспор стимулированием созревания спороносной ткани,
- 2-выращивании рассады в цехе (а не в море, как при двухгодичном цикле),
- 3-выращивании товарной ламинарии на плантации.

Технологические приемы выращивания рассады ламинарии в одногодичном цикле в каждой стране различны, поскольку разработаны с учетом особенностей местных климатических и прочих условий. Вполярной марикультуре попытки выращивать ламинарию в одногодичном цикле означают интенсификацию одного из этапов, а именно - ускоренное выращивание жизнеспособной рассады в искусственных условиях.

Метод, разработанный в Японии, Китае и Корее, сводится в основном к тому, что зооспоры на слоевищах получают в более ранние сроки. Затем из

них форсированным методом в специальных цехах выращивается рассада с применением трофических, температурных и световых стимуляторов. Рассада вырастает к октябрю, что на 3-4 месяца раньше, чем в природе при двухгодичном культивировании. Товарная продукция, не уступающая по размеру и качественным характеристикам двухгодичной ламинарии, выращивается за 11-12 мес. В южных районах Японии весь цикл проводят за один год: стимулирование спор и осеменение субстратов - в сентябре - октябре; перенос в выростные бассейны - в ноябре - феврале; пересадка рассады в море - в марте - сентябре и уборка урожая - в сентябре - октябре. В северных районах Японии период выращивания ламинарии в море растянут, и весь цикл растягивается на 2 года. Морских хозяйств с полным циклом выращивания в Японии очень мало. Как правило, одни хозяева специализируются на получении рассады, а другие - покупают ее в питомниках и доращивают в море.

Одногодичный цикл начинается с отбора слоевищ, способных к раннему спороношению и стимулированию созревания спороносной ткани.

В январе на плантациях двухгодичного цикла производится подъем канатов со слоевищами с глубины 2 м на 1 м, в феврале - с 1 м на 0-0.5 м. Канаты поддерживаются в этом положении до июля. В марте с этих субстратов отбирают маточные слоевища. Путем анализа морфометрических признаков слоевищ (соотношения между длиной и шириной слоевищ, и длиной черешка) отбираются слоевища, предрасположенные к раннему спороношению. Эти слоевища растут на субстратах у поверхности, в слое воды, богатом биогенами, до конца июля. С середины мая до середины июня их подкармливают азот и фосфорсодержащими солями, на полчаса опуская субстрат в специальную емкость. Это необходимо, и репродуктивная зрелость наступает у водорослей при накоплении определенного запаса органических веществ. Затем слоевища затеняются световыми экранами для создания оптимального режима освещенности для спорообразования. Субстраты в море на 30-40 дней (до конца июля) помещают в специальные холщовые мешки.

Как мы видим, выращивание ламинарии в одногодичном цикле требует значительной интенсификации всего процесса. Это приводит к повышению затрат и росту себестоимости конечного продукта. Выращивание рассады можно проводить в цехе или на плантации.

При выращивании рассады в цехе предварительно производится подготовка субстратов - капроновых нитей, которые вымачиваются в морской воде, высушиваются и наматываются на рамки. Питательная смесь состоит из различных составных растворов, которые смешивают перед употреблением и добавляют в морскую воду в соотношении 1:100. Регулярно вносимый питательный раствор строго сбалансирован и подобран таким образом, что включает соли ряда металлов, не несущих трофических функций, но играющих роль мощных стимуляторов развития и роста гаметофита и спорофита. Вода в бассейне регулярно заменяется на $1/2$ - $1/3$ объема, с соблюдением температурного режима.

Адаптация рассады к условиям моря происходит при постепенном (в течение недели) повышении температуры воды в бассейне на $0,5^{\circ}\text{C}$ в сутки. Для уравнивания концентраций солей моря и бассейна вода в бассейне также постепенно заменяется на морскую. Затем нити с рассадой наматывают на более крупные рамы и на 7-10 дней выставляют в море.

К началу августа выращенные слоевища достигают средней биомассы 800 г, средней длины 400 см, ширины - 20 см, сухих веществ -15-20 %. Слоевища с верхних частей субстратов достигают наибольшей биомассы ~ до 1500 г в начале июля. В это время рекомендуется начинать уборку урожая.

Приложение 3

Физико-химические подходы при разработке методов интенсивного использования бурых морских водорослей

1. Биологически активные соединения из водорослей в промышленности

Одним из наиболее ценных продуктов из бурых водорослей является *альгиновая кислота* и ее соли (альгинаты). Согласно Международной цифровой системе кодификации пищевых добавок альгиновая кислота и ее соли имеют 5 номеров: альгиновая кислота-400; альгинат натрия-401; альгинат калия-402; альгинат аммония-403; альгинат кальция -404. Альгинаты обладают широким спектром технологических свойств (эмульсионными, пленкообразующими, желеформирующими и другими важными физико-химическими свойствами для промышленности) [31-34].

Применение альгинатов при производстве молочных продуктов, обусловлены их эмульгирующими свойствами. За последнее время выросло потребление альгинатов в производстве мороженого, йогуртов, так как они придают готовой продукции нежную консистенцию, равномерную структуру и увеличивают стабильность при хранении. Альгинаты широко используют в качестве добавок, повышающих водоудерживающую способность, эластичность и стабильность при хранении и тепловой обработке мясных и рыбных фаршей [35]. Одной из главных задач, стоящих перед исследователями в области разработки пищевых лечебно-профилактических продуктов, является придание им заданной формы и структуры в процессе производства [36].

Было установлено, что взаимодействие и соединение между полисахаридом и частицами мясного фарша осуществляется с применением солей альгината кальция за счет механизма желирования. Эффективность этого процесса зависит от соотношения полисахарида и кальциевой соли. Так, применение альгината и CaCO_3 в соотношении 0, 8:0, 144 в проведенных

экспериментах не оказывывало отрицательного влияния на органолептические показатели и пищевую ценность продуктов [37]. Одним из перспективных направлений применения альгинатов в производстве мясной продукции является создание съедобных растворимых пищевых оболочек на их основе. Введение альгината натрия в количестве 0,8-1,2 % к общей массе мясного сырья при изготовлении вареных колбас обеспечивает получение высококачественной продукции с заданным химическим составом, обладающей улучшенными структурно-механическими и биохимическими свойствами.

Альгинат натрия используют для получения искусственных продуктов. В таких продуктах альгинат натрия как структурообразователь незаменим, так как только альгинатные студни выдерживают тепловую обработку без разрушения структуры продуктов [38].

Результаты исследования возможности использования альгината кальция в производстве хлеба из пшеничной муки первого и высшего сорта, а также из смеси ржаной обдирной и пшеничной муки первого сорта показали, что применение этой пищевой добавки способно максимально проявить сорбирующие свойства альгиновой кислоты, а также позволяет повысить пищевую ценность хлеба [39]. Концентрация альгината около 2% соответствует концентрации лечебной профилактической дозы, поэтому данный продукт может быть рекомендован для диетического и лечебного питания [34, 40].

Использование альгинатов позволяет создавать новые пищевые продукты полифункционального назначения, например, тонизирующие, антистрессовые или диетические напитки. Разработан способ получения концентрата *растительного*, в состав которого входит альгинат натрия в количестве 0,1-0,2 г и экстракты из морской капусты. Установлено, что добавление концентрата в напиток или простую воду способствует укреплению защитных сил организма и очищению его от токсичных и других вредных веществ. Соль альгиновой кислоты применяют для производства овощных и

фруктовых напитков. Альгинаты как дополнительный компонент используют в производстве кондитерских изделий - мармеладов, пастилы для снижения расхода основных дорогих гелеобразователей: агара, желатина, фуцелана [41, 42].

Таким образом, альгинат натрия и ламинария являются одними из наиболее доступных и перспективных пищевых добавок, применяемых в пищевой промышленности и медицине. Использование ламинарии и альгинатов в пищевой промышленности позволит:

- расширить ассортимент производимой продукции общественного питания посредством включения биологически активных добавок в полуфабрикаты, продуктов переработки ламинарии фукоиданов, красителей;

- получить новые виды загустителей, стабилизаторов пищевых масс, которые могут быть заменителями крахмала и желатина;

- производить продукцию с лечебно-профилактическими свойствами;

- повысить здоровье людей, увеличить среднюю продолжительность жизни, а также повысить адаптационные возможности человека к тяжелым экологическим условиям существования большинства населения земли [34, 41].

2. Применение препаратов из водорослей в медицине

Медицинская ценность бурых водорослей известна давно. С высоким выходом выделяются многие фотосинтетические пигменты - каротиноиды, хлорофиллы, фикоэритрины, структурные особенности которых позволяют подтвердить наличие в них признаков органических полупроводников, которые легко определяются в композитах на их основе. Каротиноид фукоксантин из водорослей *Cystoseira* обладает высокой антиоксидантной, радиопротекторной и противоопухолевой активностью. Были синтезированы многие биологически активные соединения, которые содержатся в водорослях, некоторые пигменты, разработаны методы их идентификации, изучен метаболизм и некоторые биологические функции. Но вскоре выяснилось, что природные формы

пигментов отличаются от их синтетических аналогов составом изомеров, более высокой биологической активностью и безопасностью применения в виде фармпрепаратов.

В настоящее время доказана высокая эффективность профилактики и лечения многих заболеваний биологически активными добавками (БАД) из полисахаридов бурых водорослей, обладающих липидкорректирующими, противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами [43-45].

В народной медицине ламинария применяется при анемии, заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Порошок ламинарии принимается при малокровии, желудочных заболеваниях, а также из него готовят массу для согревающих компрессов. Ламинарию рекомендовано принимать людям, страдающим хроническими запорами, и широко применяют для предупреждения и лечения атеросклероза. В корейской народной медицине ламинария используется как противодизентерийное и мочегонное средство, часто назначается при сердечных и почечных отеках, циститах, пиелонефритах, отеках, обусловленных авитаминозом, при гипертензии, заболеваниях щитовидной железы. Морская капуста издавна считается не только лечебным, но и диетическим средством, поддерживающим бодрость и здоровье. Она нашла применение в различных профилактических и диетических программах для похудения. В Норвегии ванны с добавлением ламинарии используют для облегчения болей в суставах.

Ламинарию рекомендуется включать в пищевой рацион населения, проживающего на территории, загрязненной после аварии на Чернобыльской АЭС, для снижения содержания в организме стабильных радиоактивных изотопов ^{90}Sr и ^{137}Cs . В последнее время ламинария находит все более широкое применение в стоматологической практике. Экспериментально обоснована целесообразность применения сложных зубных паст с биологически активными компонентами ламинарии для восстановления и улучшения физико-химических и механических свойств зубной эмали, профилактики кариеса [46]. Зубные эликсиры с минерально-витаминным концентратом

ламинарии способствуют улучшению обменных процессов в ткани пародонта [47]. В медицине используется ламинария сахаристая (*Laminariasaccharina*), ламинария пальчаторассеченная (*Laminariadigitata*), ламинария японская (*Laminariajaponica*), ламинария Клоустона (*Laminariacloustoni*), ламинария узкая (*Laminariaangustata*).

Ламинарию применяют как антидотное средство при заболевании верхних дыхательных путей при работе с солями бария, радионуклидами. Действующим началом этого средства считают альгиновую кислоту, связывающую вредные соединения. Применяют ламинарию в виде ингаляции.

Результаты исследования онкологов показали, что *ламинарин*, содержащийся в морской капусте, существенно уменьшает количество митозов в клетках саркомы и тормозит ее развитие. При назначении морской капусты с лечебной и профилактической целью учитывается физиологическая потребность организма в йоде. В исследованиях по извлечению из ламинарии японской фукоидана были опробованы различные методы, в том числе с использованием различных экстрагентов. С учетом скорости экстрагирования и соотношения цена-качество, хитозан был выбран в качестве оптимального экстрагента фукоидана [48]. Фукоидан обладает широким спектром биологической активности: как антикоагулянт, имеет антитромботическое [49], противовоспалительное [50], и противоопухолевое действие [51].

Целью исследований было изучение влияния полисахаридов (LJPS) ламинарии японской на метаболизм липидов и лептина у мышей с гиперлипидемией, которым в течение четырех недель вводили различные дозы LJPS (75 мг / сут, 150 мг / сут, 300 мг / сут). В сыворотке крови у мышей определяли общий холестерин, триглицериды, свободные жирные кислоты и лептин. Полученные результаты свидетельствуют о том, что полисахариды ламинарии японской снижают уровень липидов в крови и улучшают резистентность к лептину [52].

Бурые водоросли - это источник йода и микроэлементов. Они используются также в медицине для создания заменителей крови, для

предотвращения свертывания крови, для выведения радиоактивных элементов из организма. В Европе и Америке йод из бурых водорослей добывают с XIX в. Сырьем для добычи йода в Европе служили ламинария и фукус, в Америке - саргассы. Россия организовала собственное производство йода во время первой мировой войны, вызвавшей повсеместно в Европе «йодный голод». В 1930-х гг. на Соловецких островах был усовершенствован способ обработки водорослей, разработан дешевый способ получения из них йода, намечены перспективы создания водорослевых ферм. В настоящее время в г. Архангельск функционирует комбинат, специалистами которого разработаны чрезвычайно эффективные и рентабельные технологии получения йода из водорослей.

Бурые водоросли являются единственным источником для получения альгинатов - солей альгиновой кислоты, отличающихся свойством поглощать воду в количестве, в 200-300 раз превышающем их вес. Эти соли могут быть растворимыми в воде (соли одновалентных металлов) или нерастворимыми (соли поливалентных металлов, кроме магния). Наиболее широко применяется альгинат натрия в промышленности. Он способен поглощать до 300 весовых единиц воды, поэтому его широко используют для стабилизации разнообразных растворов и суспензий, которые необходимы при производстве пластмасс, синтетических волокон и пластификаторов, лакокрасочных покрытий и стройматериалов, смазочных материалов для машин. Применение альгинатов повышает качество печатания книг. В фармацевтической и парфюмерной промышленности альгинаты применяют как связующие вещества при изготовлении таблеток и оболочек для пилюль, а также мазей и паст. На основе альгинатов делают растворимые хирургические нити. Альгинаты добавляют в зубные пасты, кремы, косметическое молочко, губные помады. Как источник альгинатов, бурые водоросли образуют ресурс сырья стратегического значения для медицины, пищевой промышленности.

Проблема управления радиочувствительностью и сохранением тканей при облучении обсуждается врачами и радиобиологами на протяжении многих лет [53]. С точки зрения современной радиобиологии радиомодификация

включает в себя два понятия – радиосенсибилизацию и радиопротекцию. Механизм действия зависит не от последовательности воздействий, а от степени воздействия на опухоль, что приводит, в конечном счете, к избирательному усилению противоопухолевого эффекта путем либо аддитивности, либо синергизма. Напротив, радиопротекторные свойства способствуют ослаблению лучевого повреждения здоровых тканей [54, 55]. Известно, что некоторые опухолевые клетки в фазе синтеза ДНК, резистентны к облучению, но проявляют чувствительность к цитостатику 5-фторурацилу. Это усиливает повреждающий эффект при сочетанном применении противоопухолевого препарата и ионизирующего излучения. Диски из стерильного геля «Когель-5 фтур» на основе альгината натрия помогают локализовать токсичные лекарства и, очень важно, извлекать продукты распада опухолевых тканей, что снижает опасность эндогенной интоксикации организма. Выбор альгината натрия для создания гелевых дисков в качестве биополимера связан с его радиопротекторными свойствами, которые усиливаются за счет введения БАВ с антирадикальной активностью (мексидол, экстракты прополиса).

Список литературы приложения 1

1. Промысловые водоросли СССР: Справочник // Под ред. Возжинской. М.: Пищевая промышленность, 1971. - С. 31-41.
2. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. - М.: Мир, 1986. 34 с.
3. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. Киев: Наук.думка. 1988. 256 с.
4. Промысловые водоросли СССР: Справочник // Под ред. Возжинской. М.: Пищевая промышленность, 1971. - С. 31-41.
5. Нехорошев М.В., Рябушко В.И., Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г. Культивируемые водоросли коммерческий источник антиоксидантов // Российский Биотерапевтический журнал, 2016. Т. 15. Т. 1. С.74.
6. В.И. Рябушко, Л.И. Мусатенко, Л.В. Войтенко, Е.В. Попова, М.В. Нехорошев. Функциональная роль фукоксантина и фитогормонов из морских бурых водорослей // *Algologia*. 2014, Т. 24. № 1. С. 20-32.
7. Корнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука, 1988. 241 с.
8. *Neo S.J., Jeon Y.J.* Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage // *J. Photochem. Photobiol.* - 2009. -95. -P. 101-107.
9. Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Спрыгин В.Г., Кушнерова Т.В., Хотимченко Ю.С., Кондратьева Е.В., Другова Л.А. Экстракт из бурой водоросли *Laminaria japonica* – перспективный стресс-протекторный препарат. *Биология моря*. 2010; Т. 36; № 3: 215-220.
10. Imbs T.I., Zvyagintseva T.N., Skriptsova A.V. Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods. *Journal of Applied Phycology*; 2014. DOI: 10.1007/s10811-014-0293-7.

11. Li X, Zhao H, Wang O, Liang H, Jiang X. Fucoidan protects ARPE-19 cells from oxidative stress via normalization of reactive oxygen species generation through the Ca^{2+} -dependent ERK signaling pathway. *Mol Med Rep*- 2015; 11(5):3746-52.doi: 10.3892/mmr.2015.3224. Epub 2015 Jan19.
12. Moreau D., Tamasoni C, Jacquot C. et al. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontellaaurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines // *Environ. Toxicol. Pharm.* 2006. Vol. 22. P. 97-103.
13. Riccioni G. Marine carotenoids and oxidative stress // *Mar. Drugs*. 2012. Vol. 10. P. 116-118.
14. Riccioni G., D'Orazio N. Franceschelli S. et al. Marine carotenoids and cardiovascular risk markers // *Mar. Drugs*. 2011. Vol. 9. P. 1166-1175.
15. Peng J., Yuan J., Wu C. et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health // *Mar. Drugs*. - 2011. Vol. 9. P. 1806-1828.
16. Nishino H., Murakoshi M, Tokuda H. et al. Cancer prevention by carotenoids // *Arch. Biochem and Biophys*. 2009. Vol. 483. P. 165-169.
17. Нехорошев М.В., Ревина А.А., Апрышко Г.Н., Черноморские организмы-источник потенциальных противоопухолевых препаратов// *Российский биотерапевтический журнал*. 2004. Т. 2. С. 27.
18. Ревина А.А., Нехорошев М.В., Ларионов О.Г., Суворова О.В. Радиационно-химическое моделирование реакций с участием биологически активных каротиноидов из водорослей *Cystoseira Barbata* и из мидий *Mytilus Galloprovincialis*. IV Баховская конференция по радиационной химии в рамках конференции «Физико-химические основы новейших технологий XXI века» 1-3 июня 2005 г. Москва. С. 105.
19. Abidov M., Ramazanov Z, Seifulla R. et al. The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet.Obes.Metab.* 2010. Vol. 12. N. 1. P. 72-81.

20. Park H.J., Lee M.K., Park Y.B. et al. Beneficial effects of *Undarispinnatifida* ethanol extract on diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice // *Food Chem. Toxicol.* 2011. V. 49. P. 727-733.
21. Тараховская Е.Р., Маслов Ю.И., Шишова М.Ф. Фитогормоны водорослей // *Физиология растений.* 2007. V. 54. N. 2. С. 1-9.

Список литературы приложения 2

22. Гайсина Л.А., Фазлутдинова А.И., Кабиров Р.Р. Современные методы выделения и культивирования водорослей // Учебное пособие - Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. - 152с.
23. Макаров В.Н. Современное состояние марикультуры водорослей // Промысловые и перспективные для использования водоросли и беспозвоночные Баренцева и Белого морей. Апатиты, 1998, с. 295-299.
24. Блинова Е.И., Макарова Г.Е. Культивирование морских водорослей за рубежом // *Обзор Инф.*, сер. «Марикультура». 1990, вып. 3, с. 1-57.
25. Стоценко А.А. Теоретические основы проектирования гидротехнических сооружений морских плантаций - Дисс. д.т.н. / Дальневосточный политехнический институт им. В.В. Куйбышева, Владивосток, 1990. С. 1 - 38.
26. Макаров В.Н. Инструкция по биотехнике культивирования ламинарии сахаристой в двухгодичном цикле в условиях Белого моря. Мурманск. 1982. - 60 с.
27. Блинова Е.И., Макаров В.Н. Инструкция по биотехнике культивирования ламинарии сахаристой в двухгодичном цикле в Баренцевом море. 1987. М.: - 34 с.
28. Петров Ю.Е. Отдел бурые водоросли (Phaeophyta) // *Жизнь растений*, Т. 3. М.: Просвещение. 1977. С. 143-191.
29. Liining K. Critical levels of light and temperature regulating the gametogenesis of three *Laminaria* species // *J. Phycol.* V. 16. 1980. P. 1-15.

30. Шошипа Е.В. Перспективы культивирования красных водорослей в северных морях России // Промысловые и перспективные для использования водоросли и беспозвоночные Баренцева и Белого морей. Апатиты. 1998. С. 300-305.

Список литературы приложения 3

31. Воронова Ю.Г. Современная технология производства продукции из водорослей [Текст] // Современная технология производства продукции из водорослей М.: Изд-во ВНИПКИЭИ и АСУРХ. 1996. вып. II (II). 40 с.
32. Воронцова О.С., Ибрагимова З.И., Ильинова С.А., Бутина Е.А. Майонез, содержащий альгинат натрия [Текст] // Междунар. Науч. Конф. «Рац. пути использ. вторич. ресурсов АПК», Краснодар. 23-26 сент. 1997. Тез.докл. Краснодар, 1997. с. 108-109.
33. Липатов И.Б. Разработка технологии и рецептур изделий из бисквитного и дрожжевого теста с использованием альгинатов и ламинарии // Дис. канд. техн. наук. СанктПетербург. 2004. 121с.
34. Mohamed Suhaila, Hashim Siti Nadia, Rahman Hafeedza Abdul. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy Comprehensive chlorophyll composition in the main edible seaweeds // Trends in Food Science & Technology. 2012. Vol. 23. № 2, P. 83-96.
35. Lin Kuo-Wei, Keeton Jimmy T. Textural and physicochemical properties of low-fat, precooked ground beef patties containing carrageenan and sodium alginate // J. Food Sci. 1998. V. 4. P. 571-574.
36. Вафина Л.Х. Обоснование комплексной технологии переработки бурых водорослей (Phaeophyta) при получении функциональных пищевых продуктов // Дис. канд. техн. наук. М. 2010. 290 с.
37. Загородная Г.И. Микробиологическое обоснование технологии продуктов молочнокислого брожения с добавками морских гидробионтов// Дис. канд. биол. наук. Владивосток. 1999. 162 с.

38. Способ производства пищевого продукта: Пат. 2113804 Россия, МПКМПК {6} А 23 L1/29 / Фадеева И.Д. Оpubл. 27.6.98, Бюл. № 18.
39. Лазарева Л.В., Пучкова Л.И., Суматохина С.В. Применение морепродуктов при производстве новых видов хлеба // Тез. докл. Междун. Семинар «Хлеб - 99». Москва, 23-26 ноября.1999. М.: 1999. с. 45-46.
40. Быканова Д.Н. Разработка технологии консервов из рыбы и нерыбных объектов с использованием пищевых добавок морского происхождения // Дис. канд. техн. наук. Владивосток. 2010. 155 с.
41. Талабаева С.В. Обоснование и разработка технологии полисахаридных гидрогелей из морских водорослей и пищевых продуктов на их основе // Дис. канд. техн. наук. Владивосток. 2006. 170 с.
42. Липатов И.Б. Разработка технологии и рецептур изделий из бисквитного и дрожжевого теста с использованием альгинатов и ламинарии // Дис. канд. техн. наук. Санкт Петербург. 2004. 121 с.
43. Аминина Н.М., Конева Е.Л., Бузолева Л.С., Подусенко В.В. Действие биогеля из морских водорослей на облигатную микрофлору кишечника // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2009. № 4-5. С. 20-23.
44. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Иммуно активные биополимеры из морских гидробионтов // Владивосток: Издательство ТИНРО-центра. 2007. 219 с.
45. Янькова В.И., Аминина Н.М., Банщикова И.С. Действие полисахаридов морского происхождения на содержание продуктов перекисидации липидов // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2005. № 1. С. 27-30.
46. Дрожжина В. А., Петрищев Н. Н., Федоров Ю. А. Повышение физиологической резистентности ткани пародонта у белых крыс под влиянием биологически активных веществ из ламинарии // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1995.-Т. 81. № 12. С. 126-133.
47. Дрожжина В. А., Федоров Ю. А., Блохин В. П., Соболева Т. Ю., Казакова О. В. Использование зубных эликсиров на основе природных

- биологически активных веществ в лечении и профилактике заболеваний пародонта // *Стоматология*. 1996, спец. выпуск. С. 52-53.
48. Rong Xing, Song Liu. Extraction and Separation of Fucoidan from *Laminaria japonica* with Chitosanas Extractan // *Bio Med Research International*. Volume 2013. Article ID 193689.
49. L. Chevolut, B. Mulloy, J. Ratiskol, A. Foucault, and S. Collic-Jouault, «A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae» // *Carbohydrate Research*. 2001. V. 330. N 4. P. 529-535.
50. A. O. Chizhov, A. Dell, H. R. Morris et al., «A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*» // *Carbohydrate Research*. 1999. V. 320. N 1-2. P. 108-119.
51. C. Zhuang, H. Itoh, T. Mizuno, and H. Ito, «Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *Umitoranoo (Sargassum thunbergii)* » // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1995. V. 59. N 4. P. 563-567.
52. Hui Xin, Jiawei Tian. *Laminaria japonica* polysaccharide reduces lipids and leptin levels in hyperlipidemic mice // *Basic Research Journal of Medicine and Clinical Sciences*. ISSN 2315-6864. 2013. V. 2(2). P. 27-31.
53. Валуева М.И., Хлыстова Т.С., Гусев И.В., Олтаржевская Н.Д. Лечебные гидрогелевые материалы различной степени структурирования на основе природных полимеров // *Известия ВУЗов. Технология легкой промышленности*. 2012. Т. 17. № 3. С. 59-61.
54. Корятова Л.И., Смокуренок В.П., Маслюкова Е.А. и др. Оценка эффективности комбинированного лечения больных раком прямой кишки, раком молочной железы с использованием материала стерильного гидрогелевого «Когель-5фтур» // *Российский биотерапевтический журнал*. 2015. Т. 14. № 4. С. 99-103.
55. Hupel Mélanie, Lecointre Camille, Meudec Anna, Poupart Nathalie, Gall Erwan Ar. Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia*

ramosissima// Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2011.
V. 401, N 1–2. 31. P. 36-47.

Благодарность

Руководителю д.х.н., проф. Ревиной А.А.

Зав. кафедрой Э.П. Магомедбекову

Тюпиной Е.А. за постоянную заботу и внимание

Фенину А.А., консультации по методике облучения образцов и за постоянную помощь.

Антроповой И.Г. консультации и советы

Фролову В. В, за постоянную помощь в работе

Всем сотрудникам кафедры ХВЭ и РЭ РХТУ им. Д.И. Менделеева.

к.х.н. Бусеву С. А, и другим сотрудникам (ИФХЭ им. А. Н. Фрумкина РАН)
(запись UV-VIS спектров поглощения и люминесценции (Hitachi)).