

**ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
АКТИВНОСТЬ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ ЭКСТРАКТОВ  
АРКТИЧЕСКОЙ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS VESICULOSUS***

<sup>1,2</sup>К. Г. Боголицын, <sup>1</sup>П. А. Каплицин\*, <sup>3</sup>Л. К. Добродеева,  
<sup>1</sup>А. С. Дружинина, <sup>1</sup>Д. В. Овчинников, <sup>1</sup>А. Э. Паршина, <sup>1</sup>Е. В. Шульгина

<sup>1</sup>Северный (Арктический) федеральный университет им. М. В. Ломоносова,  
Архангельск, Россия

<sup>2</sup>Институт экологических проблем Севера УрО РАН, Архангельск, Россия

<sup>3</sup>Институт физиологии природных адаптаций УрО РАН, Архангельск, Россия

\*platonkaplicin@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.11.2015 г.

Сверхкритическая (СК) флюидная экстракция использована при исследовании жирнокислотного состава арктических бурых водорослей. Предложен способ фракционирования СК экстракта, основанный на различиях растворимости компонентов (жирные кислоты, полифенолы). Исследован состав и биологическая активность полученных фракций.

К л ю ч е в ы е с л о в а: арктические бурые водоросли, сверхкритические флюиды, жирные кислоты, полифенолы, антиоксидантная активность.

**ВВЕДЕНИЕ**

Морские водоросли являются уникальным по составу возобновляемым растительным сырьем для получения целого ряда разнообразных веществ, обладающих широким спектром потребительских свойств.

Единственное место европейской части России, в котором ведется добыча и переработка арктических бурых водорослей в промышленных масштабах, — регион западного сегмента Арктики: Баренцево и Белое моря, акватории островных и прибрежных территорий. Значение (по своей технологической ценности и мощности зарослей) имеют представители рода ламинариевых (*Saccharina latissima*, *Laminaria digitata*) и фукусовых (*Fucus vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum*).

Одними из наиболее ценных компонентов морских водорослей являются жирные кислоты и полифенолы. Эти вещества обладают противомикробной [1], противоопухолевой [2, 3], противовоспалительной активностью [4].

Содержание липидов в бурых водорослях зависит от вида, географического положения, сезона, температуры, солености воды и интенсивности солнечного света. В среднем их содержание невелико и составляет 1—3 % масс. [5]. Принято считать, что бурые водоросли, растущие в умеренных или субарктических областях, могут накапливать омега-3 и омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), для условных обозначений которых принята специальная кодировка вида (a:b, n-c), где a — число атомов углерода в молекуле ПНЖК, b — число двойных связей в молекуле и c — номер атома углерода в углеводородном остатке

молекулы кислоты, при котором находится первая двойная связь ( $s = 1$  для концевой метильной группы). Основными омега-3 ПНЖК являются эйкозапентаеновая кислота (20:5, n-3), стеарионовая кислота (18:4, n-3) и  $\alpha$ -линоленовая кислота (18:3, n-3), в то время как арахидоновая кислота (20:4, n-6) является основной омега-6 ПНЖК [6]. Кроме того, различными исследователями сообщается о высоком содержании в бурых водорослях таких насыщенных жирных кислот (НЖК), как миристиновая (14:0) и пальмитиновая (16:0) кислоты, а также олеиновая кислота (18:1, n-9), относящаяся к классу мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) [7, 8].

Потребность человека в незаменимых жирных кислотах (линолевая, линоленовая, арахидоновая) составляет 2 г/сут [9, 10]. Вместе с тем, растительных источников данного комплекса кислот найдено либо ограниченное количество, либо, например, для арахидоновой кислоты, вовсе не обнаружено.

Наиболее распространенным методом для определения жирнокислотного состава биомассы водорослей является газовая хроматография с пламенно-ионизационным или масс-спектрометрическим детектированием [11, 12].

Задача выделения малоизмененных компонентов липидно-пигментного комплекса и сохранения их биологической активности предполагает использование приемов мягкого химического или физического воздействия на растительное сырье. При реализации традиционных технологий используется обработка биомассы химическими растворителями при высоких температурах, что приводит к деградации и химической модификации компонентов [13, 14]. Избежать данных негативных эффектов позволяет использование сверхкритической флюидной экстракции (СКФЭ) [15–20]. Целью данного исследования является применение метода СКФЭ для извлечения, исследования компонентного состава и биологической активности жирнокислотной фракции арктических бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus*.

## МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

**Объекты исследования и пробоподготовка.** В качестве объектов исследования использовали образцы двух видов бурых водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus*, отобранных в ходе комплексной научно-исследовательской экспедиции «Арктический Плавающий университет» в июле 2015 года в акватории острова Большой Соловецкий Белого моря.

Пробы сушили до достижения воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при температуре  $30 \pm 1$  °C [21]. Далее образцы измельчали, отбирали фракцию от 0,1 до 1,0 мм, усредняли и хранили в герметичной стеклянной таре в темном помещении.

Для исследований применялись следующие реактивы: метанол (>99,8 %, «Merck», Германия), этанол (97 %), изопропанол (>99,9 %, «Компонент-Реактив», Россия), ацетон (ч.д.а., «Вектон»), гексан (1 сорт, «Криохром», Россия), нонадекановая кислота (аналитический стандарт, «Sigma-Aldrich», США), хлороформ (х.ч., «Компонент-Реактив», Россия), метиловый эфир гептадекановой кислоты (аналитический стандарт, «Sigma-Aldrich», США), 1,1-дифенил-2-пикрилгидразин (ДФПГ) (97 %, «Sigma-Aldrich», США), реактив Folin-Ciocalteu («Sigma-Aldrich», США), натрий металлический (ч.д.а., «Нева Реактив», Россия), флороглюцин (99 %, «Sigma-Aldrich», США), бутилгидроксианизол (БНА, 99 %, «Sigma-Aldrich», США).

**Полупрепаративная сверхкритическая флюидная экстракция.** Процесс СКФЭ проводили в проточной системе SFE-5000 производства компании «Thar Technologies».

В ходе исследования изучалось влияние типа соразтворителя (метанол, этанол, изопропанол, ацетон, гексан) и его содержания в диапазоне 0—50 % об. от флюида (при 300 атм и 4 °С).

**Определение содержания жирных кислот.** Эффективность процесса СКФЭ оценивалась по выходу жирных кислот относительно исчерпывающей экстракции методом Блайя — Дайера [22] смесью хлороформ—метанол в соотношении 1 : 2. Перед экстракцией к пробе водоросли добавлялась вода в таком количестве, чтобы соблюдалось объемное соотношение хлороформ : метанол : вода = 1 : 2 : 0,8. Экстракты хранили при температуре –20 °С не более суток, перед этерификацией их упаривали в роторном испарителе до 1 мл.

Этерификацию жирных кислот как в хлороформных, так и в сверхкритических экстрактах осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 514886-99 [23] путем последовательной обработки образцов метилатом натрия в метаноле и метанольным раствором хлористого водорода с последующей экстракцией гексаном. Полученные гексановые экстракты упаривали в роторном испарителе до 1 мл. Для проверки полноты этерификации в навеску водоросли до экстракции вносили 0,5 мл гексанового раствора, содержащего 1 мг нонадекановой кислоты. Для количественного анализа жирных кислот в виалу отбирали 400 мкл гексанового раствора с метиловыми эфирами жирных кислот и вносили 100 мкл гексанового раствора, содержащего 0,5 мг метилового эфира гептадекановой кислоты.

Идентификация жирных кислот осуществлялась с использованием газового хроматомасс-спектрометра GCMS-QP2010 Ultra («Shimadzu», Япония). Количественное определение выполнялось с использованием газового хроматографа Agilent 7820A GC System Maestro («Agilent Technologies», США) с пламенно-ионизационным детектором. Для разделения использовалась колонка HP-INNOWAX, 60 м × 0,25 мм × 0,50 мкм. Условия анализа: газ носитель — азот, скорость газаносителя в колонке 2 мл/мин, объем пробы 2 мкл, деление потока 10 : 1, температура испарителя 280 °С. Температура колонки изменялась по следующей программе: начальная температура 80 °С (5 мин), конечная температура 250 °С (47 мин), скорость подъема 2,5 град/мин, общее время анализа 120 мин. Параметры пламенно-ионизационного детектора: температура 300 °С, частота опроса 20 Гц, поток поддувочного газа (азот) 23 мл/мин, поток воздуха 300 мл/мин, поток водорода 30 мл/мин. Параметры масс-спектрометрического (МС) детектора: температура 250 °С, сканирование в диапазоне массовых чисел 50—600 а.е.м. Идентификация производилась с использованием библиотек масс-спектров NIST и Wiley.

**Содержание полифенольных веществ и маннита.** Суммарное содержание полифенольной фракции определяли колориметрическим методом с применением реактива Folin—Ciocalteu по [24]. В качестве стандарта использовали флороглюцин.

Определение содержания маннита проводили спектрофотометрическим методом, основанным на образовании медных комплексов при периодатном окислении в соответствии с ГОСТ 26185-84 [25].

**Исследование антиоксидантной активности экстрактов.** Анализ проводили на спектрофотометре Spekol-1300 («Analytik Jena», Германия), оценивая степень обесцвечивания раствораДФПГ. 2 мл 0,3 мМ раствораДФПГ в этаноле смешивали с 2 мл разбавленного этанольного экстракта и измеряли снижение оптической плотности растворов при длине волны 515 нм. Результаты выражали в эквивалентах бутилгидроксианизола.

**Исследование биологической активности.** Антисептическую активность исследовали в отношении аэробных бактерий (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. пуо-*

genes *A. S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*) и грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*) и нитчатых грибов родов *Aspergillus* и *Mucor*. В качестве испытуемого субстрата использовали водную суспензию фракций 5 пг/мл. Каплю суспензии бактериальной взвеси в концентрации 500 млн бактерий на мл в объеме 1 мл наносили на поверхность посева в стандартной чаше Петри.

В основном для культивирования бактерий использовали мясо-пептонный агар, гноеродные кокки сеяли на кровяной агар, дрожжеподобные грибы — на среде Сабуру. Оценку чувствительности производили спустя сутки инкубации посева бактерий и дрожжеподобных грибов в термостате при 37 °С; посеvy пленей выдерживали при комнатной температуре 4 дня.

Оценку чувствительности производили в процентах относительно каждого из изучаемых представителей микроорганизмов по наличию зоны отсутствия роста бактерий и дрожжеподобных грибов. За положительный результат принимали диаметр отсутствия роста микроорганизмов от 1,5 см и более. В качестве сравнения использовали сертифицированный антисептик из хвойного экстракта (фитотон).

Для изучения влияния испытуемых субстанций на формирование превентивной воспалительной реакции, отражающей направленный хемотаксис иммунокомпетентных клеток и их взаимодействие в формировании реакции врожденного иммунитета, использовали внутрибрюшинное введение испытуемых субстанций беспородным белым мышам (самцы) в дозе 5 мкг/кг в виде суспензии в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл. Перитонеальный экссудат получали через 48 ч путем промывания брюшной полости 4 мл физиологического раствора; в качестве контроля использовали перитонеальный экссудат мышей, которым за 48 ч вводили 0,5 мл стерильного физиологического раствора. Полученную взвесь клеток отстаивали при комнатной температуре в течение 30 мин, в осадке подсчитывали общее содержание клеток и делали мазки, которые фиксировали по Май-Грюнвальду и окрашивали по Романовскому — Гимзе. В мазках подсчитывали цитограмму с учетом содержания нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов.

Известно, что лейкоциты мигрируют к очагу раздражения на самых ранних стадиях развития реакции, впрочем, как и при любом изменении внутренней среды, нейтрофильные гранулоциты первыми появляются в очаге неблагополучия [26—30]. Нейтрофилы и моноциты участвуют в реализации и регуляции реакций врожденного и адаптивного иммунитета [31—32]. Моноциты-макрофаги поглощают в крови и тканях эндогенные макромолекулы после гибели нейтрофилов и физиологической денатурации белков. Лимфоциты являются иммунологически реактивными клетками, способными реагировать на изменение антигенной среды активизацией с последующим процессом дифференцировки и обеспечения клеточноопосредованных и антителозависимых реакций адаптивного иммунитета. Лимфоциты отличаются от других клеток крови тем, что они циркулируют между лимфоидными органами и тканевыми пространствами. Считается, что циркулирующие лимфоциты характеризуются значительной продолжительностью жизни. Нерезициркулирующие лимфоциты представляют собой малые формы, они могут мигрировать, но не циркулируют [33].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью обоснования приоритетного вида арктических бурых водорослей как сырья для извлечения жирнокислотной фракции выполнены исследования ком-

понентного состава данной группы веществ в водорослях вида *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus*.

В соответствии с данными, полученными при экстракции традиционным методом, исследуемые образцы водоросли вида *L. digitata* содержат 0,35 % масс. жирных кислот от массы воздушно-сухого образца водоросли, а водоросли вида *F. vesiculosus* — 1,61 % масс.

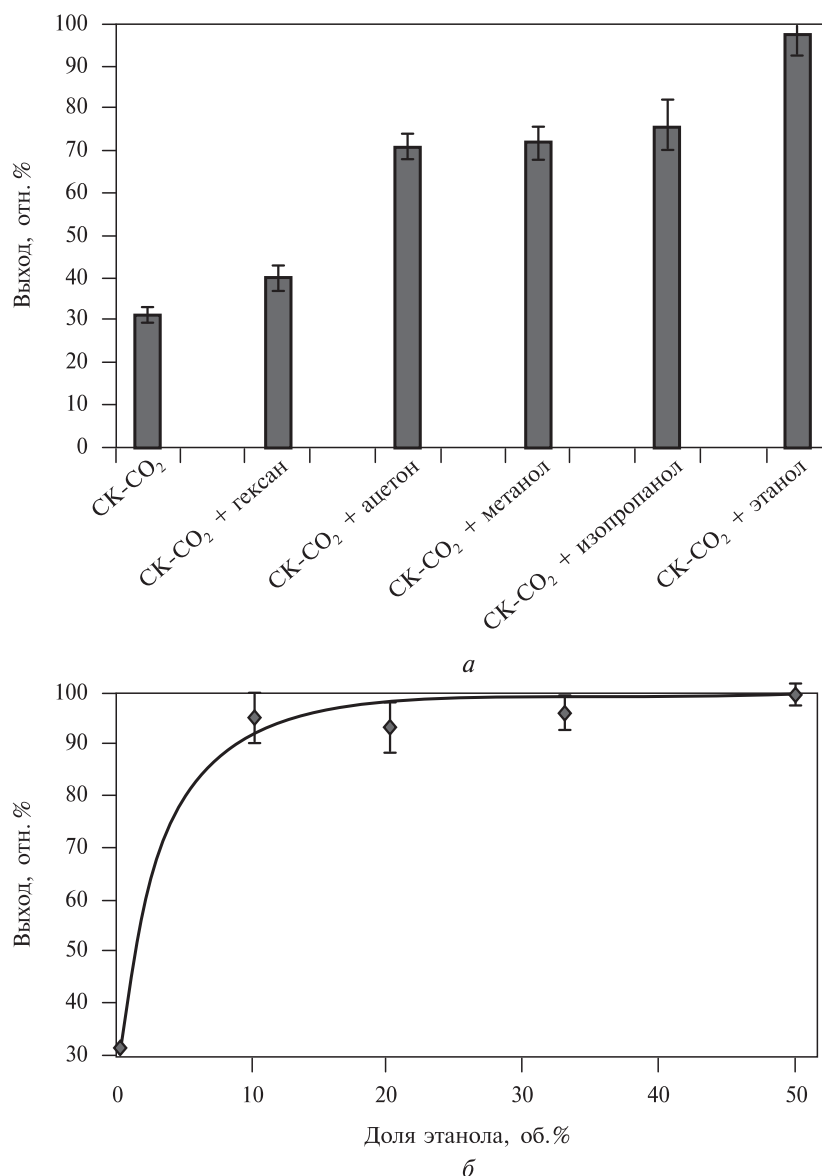
Основными насыщенными жирными кислотами рассмотренных водорослей являются миристиновая и пальмитиновая. Причем если содержание пальмитиновой кислоты в *L. digitata* выше, чем в *F. vesiculosus*, на 30 %, то содержание миристиновой кислоты выше в *F. vesiculosus* (таблица 1). Эти типы водорослей характеризуются высоким содержанием олеиновой кислоты (32,7 отн. % для *F. vesiculosus* и 17,1 отн. % для *L. digitata*). Кроме того, в обоих видах водорослей обнаружено относительно высокое содержание  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 полиненасыщенных жирных кислот — линолевой,  $\alpha$ -линоленовой, стеариновой, арахидоновой и эйкозапентаеновой. Суммарное содержание ПНЖК в *F. vesiculosus* 40,5 отн. % ( $\omega$ -3 — 17,8 отн. %,  $\omega$ -6 — 22,7 отн. %), в *L. digitata* — 49,9 отн. % ( $\omega$ -3 — 33,2 отн. %,  $\omega$ -6 — 16,7 отн. %) (таблица 1). Хотя доля ПНЖК в *L. digitata* выше, чем в *F. vesiculosus*, на 10 отн. %, абсолютное их содержание в *F. vesiculosus* в 3 раза выше, что делает *F. vesiculosus* гораздо более ценным источником ПНЖК.

Таким образом установлено, что более перспективным источником комплекса жирных кислот арктических бурых водорослей из рассмотренных является *F. vesiculosus*, поскольку этот вид характеризуется более высоким содержанием данных соединений.

Таблица 1

**Жирнокислотный состав водорослей**

Жирная кислота	Относительное содержание жирных кислот в биомассе водорослей, отн. %	
	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>
Миристиновая (14:0)	7,3 ± 1,1	10,2 ± 1,5
Пальмитиновая (16:0)	19,4 ± 2,9	13,3 ± 2,0
Пальмитолеиновая (16:1, n-7)	2,6 ± 0,4	0,80 ± 0,12
Стеариновая (18:0)	1,4 ± 0,2	1,10 ± 0,17
Олеиновая (18:1, n-9)	17,1 ± 2,6	32,7 ± 4,9
Линолевая (18:2, n-6)	8,8 ± 1,3	12,7 ± 1,9
$\alpha$ -Линоленовая (18:3, n-3)	8,5 ± 1,3	5,80 ± 0,87
Стеарионовая (18:4, n-3)	11,1 ± 1,7	3,80 ± 0,57
Арахидоновая (20:4, n-6)	7,9 ± 1,2	10,0 ± 1,5
Эйкозапентаеновая (20:5, n-3)	13,6 ± 2,0	8,20 ± 1,23
$\Sigma$ НЖК	28,1 ± 4,2	24,6 ± 3,7
$\Sigma$ МНЖК	19,7 ± 3,0	33,5 ± 5,0
$\Sigma$ ПНЖК	49,9 ± 7,5	40,5 ± 6,1



**Рис. 1.** Зависимость выхода жирных кислот от вида соразтворителя (а) и доли этанола (б) в СК флюиде

Значительное влияние как свойств сырья (влажность, размер частиц), так и параметров процесса (температура, давление, расход флюида и продолжительность экстракции) СКФЭ на выход СК экстракта показано многими исследователями [20].

Исходя из анализа природы основных компонентов водоросли *F. vesiculosus*, в котором показано преобладание полярных соединений, очевидна невозможность достижения высокого выхода целевых компонентов при СКФЭ без использования полярного соразтворителя.

Предварительные исследования (рис. 1) и литературные данные [33–37] позволили определить параметры СКФЭ, обеспечивающие высокий выход экстракта: влажность сырья 9 % масс. (воздушно-сухое сырье), температура 60 °С, давление

Таблица 2

Выход компонентов при СКФЭ водоросли *Fucus vesiculosus*

Компонент	Выход, мг/г водоросли
Жирные кислоты	21,9
Полифенолы	20,2
Маннит	7,2
Прочие компоненты	14,7

300 атм, время экстракции 60 мин, состав флюида: СК-СО<sub>2</sub> (расход 5,65 г/мин или 5,40 мл/мин) + сорастворитель — этанол с расходом 10 % об. от флюида (0,47 г/мин или 0,60 мл/мин).

Показано, что использование сорастворителя (метанола, этанола, изопропанола, ацетона и гексана) значительно увеличивает выход экстракта с 31 отн. % без использования сорастворителя до 95 отн. %. При этом наибольший эффект извлечения компонентов из растительной матрицы наблюдается для системы СК-СО<sub>2</sub> — этанол (рис. 1а) с долей сорастворителя во флюиде 10 % об. (рис. 1б).

Для исследования сверхкритического экстракта водоросли *F. vesiculosus* (как наиболее предпочтительной для выделения компонентов жирнокислотного комплекса) была проведена экстракция с условиями, установленными в ходе предварительных исследований. Выход экстракта составил 6,4 % масс. от массы водоросли, в т.ч. выход ЖК 2,2 % масс. от массы водоросли (100 % от содержания ЖК, определенного методами, предусматривающими экстракцию органическими растворителями). Суммарный выход компонентов в СК экстракте представлен в таблице 2.

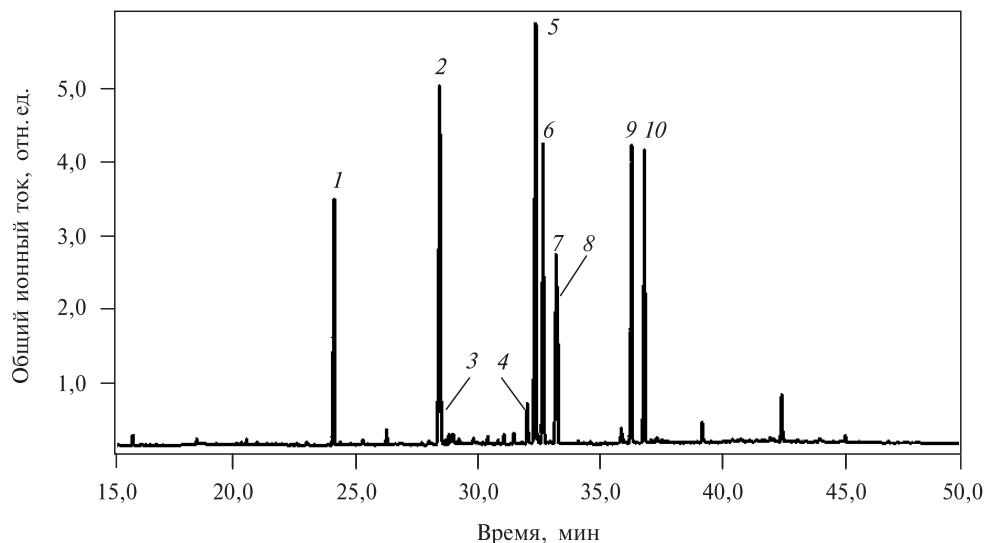
Для решения задачи выделения фракций с преимущественным содержанием ЖК, различающихся по степени насыщения, предложена схема разделения СК экстракта, основанная на различиях протолитических свойств компонентов.

Для этого полученный полупрепаративной СКФЭ раствор липидно-пигментного комплекса выдерживали при температуре  $25 \pm 2$  °С в течение 2 ч до полного расслоения на осадок (фракция 2) и надосадочный этанольный раствор (фракция 1), который подвергался дальнейшему концентрированию на роторном испарителе. Поскольку жирные кислоты при обычных условиях растворимы в этаноле, данное явление, по всей видимости, может быть объяснено тем, что в водорослях жирные кислоты находятся не только в свободном, но и в связанном виде в составе фосфолипидов, гликолипидов и других соединений, растворимость которых в этаноле может существенно различаться.

На рис. 2 представлен образец МС-сигнала общего ионного тока для хроматограммы фракции 1 СК экстракта, а на рис. 3 — масс-спектры идентифицированных компонентов.

Согласно литературным данным [38, 39] для ПНЖК наблюдается большая растворимость в спиртах при низких температурах по сравнению с насыщенными и мононенасыщенными кислотами. Поэтому для получения фракций, обогащенных данными группами соединений, фракция 1 подвергалась термостатированию при  $-15$  °С в течение суток. Подобная обработка приводит к образованию маслянистого осадка (фракция 3) и надосадочной жидкости (раствор компонентов в холодном этаноле) (фракция 4).

Соотношение фракций в экстракте, их состав и антиоксидантная активность представлены в таблице 3. Жирнокислотный состав фракций представлен в таблице 4.



**Рис. 2.** Хроматограмма общего ионного тока для фракции 1 водоросли вида *F. vesiculosus* и масс-спектры компонентов:

1 — (14:0); 2 — (16:0); 3 — (16:1, n-7); 4 — (18:0); 5 — (18:1, n-9); 6 — (18:2, n-6); 7 — (18:3, n-3); 8 — (18:4, n-3); 9 — (20:4, n-6); 10 — (20:5, n-3)

Согласно полученным данным фракция 1 содержит 62 отн. % жирных кислот, полученных в ходе СК экстракции. При этом она характеризуется соотношением ЖК, близким к их соотношению в исходной водоросли, что свидетельствует об отсутствии избирательности в накоплении ЖК в данной фракции.

Нерастворимая в спирте фракция 2 характеризуется наивысшим содержанием жирных кислот (76,6 % от массы фракции) по сравнению с другими фракциями и обладает повышенным относительным содержанием олеиновой и линолевой кислот (46,1 и 16,7 отн. % соответственно). С другой стороны, данная фракция содержит существенно меньше насыщенных жирных кислот.

Нерастворимая в холодном этаноле фракция 3 характеризуется высоким содержанием жирных кислот (40,1 % от массы фракции), при этом относительное содержание НЖК, МНЖК и ПНЖК соответственно 24,4, 37,0 и 38,6 отн. %; примерно такое же соотношение наблюдается в экстрактах, полученных методом Блайя — Дайера.

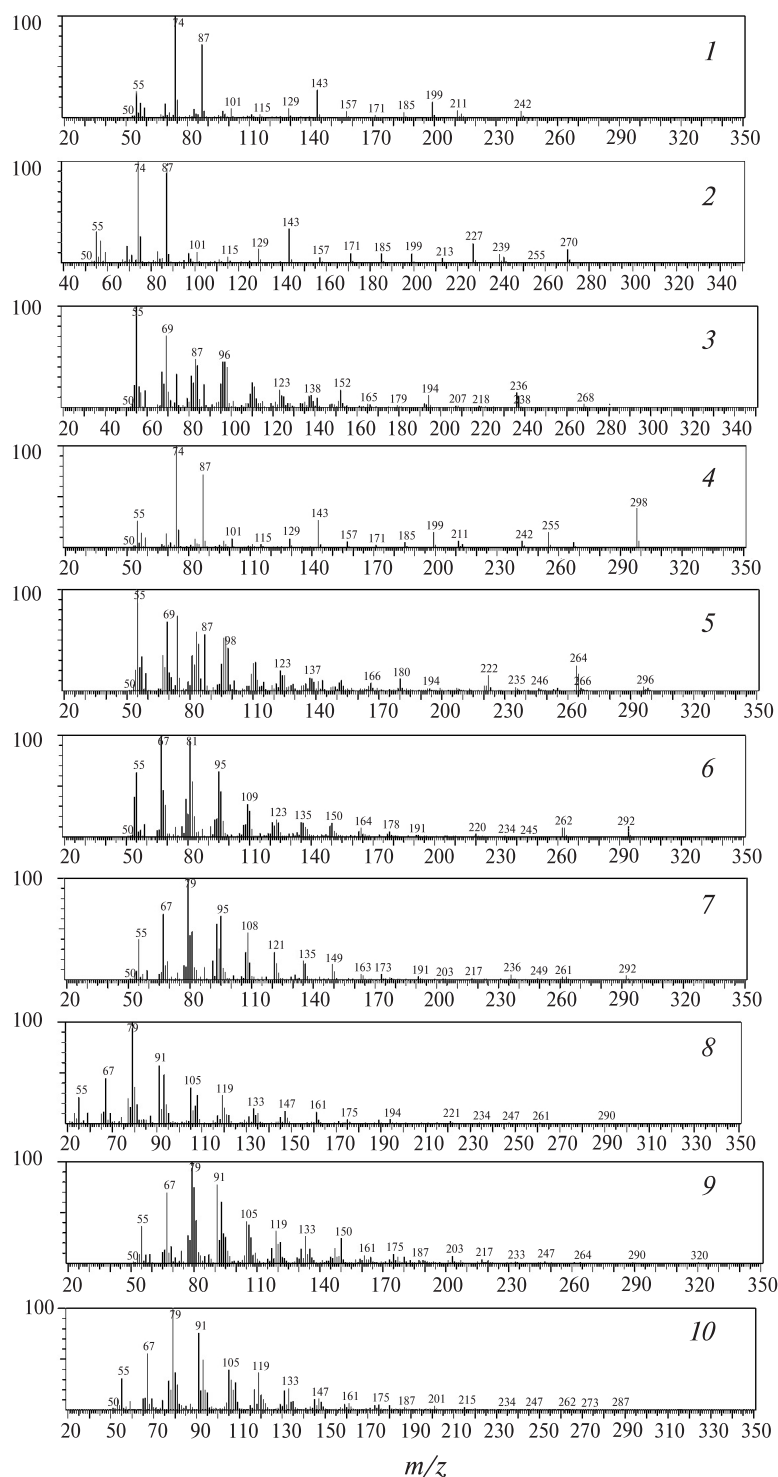
Таблица 3

**Состав фракций сверхкритического экстракта (СКЭ) *Fucus vesiculosus***

Фракция экстракта	Доля фракции в СКЭ, отн. %	Содержание компонентов в фракциях, отн. %				АОА*, ммоль-экв. ВНА/г а.с.в.
		ЖК	Полифенолы	Маннит	Прочие компоненты	
Фракция 2	17	77±4	1,7±0,1	13,6±0,8	7,7±5,8	0,03±0,01
Фракция 3	31	40±2	4,2±0,2	16,4±0,8	39,1±4,3	0,35±0,02
Фракция 4	52	17±1	64,3±3	7,7±0,4	11,5±3,3	3,71±0,20

\*АОА — антиоксидантная активность; измеряется в эквивалентах (ммоль-экв.) бутилгидроксианизола (ВНА), используемого в качестве стандарта, на единицу веса (г) абсолютно сухого вещества (а.с.в.) экстракта.





**Рис. 3.** Масс-спектры компонентов фракции 1 водоросли вида *F. vesiculosus*:  
1 — (14:0); 2 — (16:0); 3 — (16:1, n-7); 4 — (18:0); 5 — (18:1, n-9); 6 — (18:2, n-6); 7 — (18:3, n-3);  
8 — (18:4, n-3); 9 — (20:4, n-6); 10 — (20:5, n-3)

Таблица 4

**Жирнокислотный состав фракций СКЭ**

Жирная кислота	Доля жирных кислот от их общего содержания во фракциях, отн. %			
	Фракция 1	Фракция 2	Фракция 3	Фракция 4
Миристиновая (14:0)	9,6±1,4	6,5±1,0	8,6±1,3	11,8±1,8
Пальмитиновая (16:0)	15,4±2,3	10,5±1,6	13,9±2,1	13,1±2,0
Пальмитолеиновая (16:1, n-7)	0,7±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	1,2±0,2
Стеариновая (18:0)	3,3±0,5	1,6±0,2	1,9±0,3	0,8±0,1
Олеиновая (18:1, n-9)	37,0±5,6	46,1±6,9	36,3±5,4	18,3±2,7
Линолевая (18:2, n-6)	14,2±2,1	16,6±2,5	14,7±2,2	11,1±1,7
α-Линоленовая (18:3, n-3)	4,6±0,7	6,0±0,9	6,7±1,0	10,3±1,5
Стеаридоновая (18:4, n-3)	1,9±0,3	1,3±0,2	2,7±0,4	11,4±1,7
Арахидоновая (20:4, n-6)	7,8±1,2	6,6±1,0	8,0±1,2	7,6±1,1
Эйкозапентаеновая (20:5, n-3)	5,6±0,8	4,30±0,65	6,5±1,0	14,4±2,2
Σ НЖК	28,3±4,2	18,6±2,8	24,4±3,7	25,7±3,9
Σ МНЖК	37,7±5,7	46,7±7,0	37,0±5,6	19,5±2,9
Σ ПНЖК	34,1±5,1	34,8±5,2	38,6±5,8	54,8±8,2

Основным компонентом фракции 4, растворимой в холодном этаноле, являются полифенольные соединения, содержание которых достигает 64,3 отн. %, что составляет 96 отн. % от суммы полифенолов, полученных в ходе СК экстракции. Тем не менее, в данной фракции содержится 16,5 отн. % жирных кислот и она характеризуется высоким относительным содержанием ПНЖК (54,8 отн. %) и низким содержанием МНЖК (19,5 отн. %) в сравнении как с классическим экстрактом, так и с другими фракциями СК экстракта. Таким образом, изменение температуры растворителя позволило получить фракцию, обогащенную полиненасыщенными жирными кислотами и полифенолами.

Поскольку жирные кислоты и полифенолы обладают противовоспалительными, иммуномодулирующими и бактерицидными свойствами, а полифенолы известны высокой антиоксидантной активностью, высокое содержание этих компонентов во фракциях 2 и 4 СКЭ экстракта водоросли *F. vesiculosus* побудило нас провести оценку их биологической активности.

В таблице 5 представлены результаты испытания бактериостатической активности исследуемых субстанций. Установлена бактериостатическая способность полифенольной фракции (фракция 4): удельный вес чувствительных культур (за исключением полирезистентных штаммов) находится в пределах 76 %, антисептическая способность распространяется на грамположительные и грамотрицательные бактерии (таблица 5). Кроме того, антиоксидантная активность полифенольной фракции 4 существенно выше, чем у остальных фракций (таблица 3).

Обогащенная жирными кислотами фракция 2 наряду с фракцией 4 обладает достаточно значимым фунгицидным влиянием на испытываемые штаммы дрожже-

Таблица 5

**Бактериостатический эффект испытуемых субстанций  
(количество культур бактерий с подавлением роста/количество испытуемых культур)**

Штаммы	Фракция 2	Фракция 4	Фитотон
<i>P. aeruginosa</i>	6/12	17/39	11/22
<i>S. aureus</i>	3/6	8/16	5/10
<i>K. pneumoniae</i>	15/30	32/66	31/62
<i>S. pyogenes A</i>	18/36	44/88	34/78
<i>S. pneumoniae</i>	19/38	36/72	36/72
<i>E. faecalis</i>	21/42	34/68	33/66
<i>E. coli</i>	14/28	35/70	35/70
<i>B. subtilis</i>	11/22	42/84	32/64
<i>P. vulgaris</i>	13/26	41/82	38/76
Средний %	24,0 ± 3,9	58,5 ± 5,3	52,0 ± 3,6
Средний % для грам(+) бактерий	30,4 ± 3,5	62,0 ± 2,7	57,6 ± 4,7
Средний % для грам(-) бактерий	20,0 ± 3,4	63,7 ± 3,2	54,0 ± 3,4

подобных грибов рода *C. albicans* и *C. tropicalis*. Торможение роста грибов четко выражено у полифенольной фракции 4, несколько более заметное у дрожжеподобных грибов, чем у плесеней, что, вероятно, обусловлено действием как жирных кислот, так и полифенолов. Полученные данные представлены в таблице 6.

Внутрибрюшинное введение суспензий испытуемых фракций белым мышам обеспечивает увеличение в составе перитонеального экссудата (таблица 7) общего содержания клеток за счет нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов при введении жирнокислотной фракции 2 и преимущественно — нейтрофильных гранулоцитов после введения полифенольной фракции 4. Изменения клеточного состава перитонеального экссудата в ответ на внутрибрюшинное введение исследуемых субстанций свидетельствуют об активизации целенаправленной миграции иммунокомпетентных клеток, обеспечивающих реакции врожденного и адаптивного иммунитета. Действие этих фракций, по всей видимости,

Таблица 6

**Фунгистатический эффект испытуемых субстанций  
(количество культур с подавлением роста/количество испытуемых культур грибов)**

Грибы	Фракция 2	Фракция 4	Фитотон
<i>C. albicans</i>	12/24	32/64	12/24
<i>C. tropicalis</i>	15/30	36/72	17/34
<i>Aspergillus</i>	17/34	26/52	19/38
<i>Mucor</i>	19/38	29/58	17/34
Среднее, %	31,5 ± 3,3	61,5 ± 2,8	32,5 ± 2,9

Таблица 7

**Содержание клеток и состав цитогаммы перитонеального экссудата мышей  
через 48 часов после внутрибрюшинного введения испытуемых субстанций**

Показатель	Фракция 2	Фракция 4	Контроль
Общее число клеток, 10 <sup>9</sup> кл./мл	19,53 ± 0,80	19,48 ± 0,64	8,61 ± 0,49
Нейтрофилы, %	12,23 ± 0,80	36,15 ± 0,91	2,32 ± 0,37
Моноциты, макрофаги, %	34,86 ± 0,70	27,13 ± 0,65	27,23 ± 0,60
Лимфоциты, %	50,93 ± 0,60	26,96 ± 0,73	36,89 ± 0,60

обусловлено высоким содержанием как полиненасыщенных жирных кислот, так и полифенольных соединений.

Таким образом, изменение свойств растворителя позволило получить фракции сверхкритического экстракта бурой водоросли с преимущественным содержанием целевых компонентов и обладающих различными медико-биологическими свойствами.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан способ сверхкритической флюидной экстракции липидно-пигментного комплекса арктических бурых водорослей вида *Fucus vesiculosus*. Выделены фракции с преимущественным содержанием целевых компонентов (жирные кислоты, полифенолы), обладающие выраженными бактерицидной, фунгицидной и иммуностимулирующей активностями.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Научно-исследовательская работа выполнена в рамках проектной части государственного задания Министерства образования и науки РФ в сфере научной деятельности № 4.1288.2014/К, при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-33-00243. Использовано оборудование ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.594.21.0004 от 15 августа 2014 года).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freile-Pelegrin Y., Morales L. J. Bot. Marina. 2004. Vol. 47. P. 140.
2. Quasneya M.E., Cartera L.C., Oxford C., Warkinsa S.M. et. al. J. Nutr. Biochem. 2001. Vol. 12. P. 310.
3. Chajes V., Bougnoux P.W. Rev. Nutr. Diet. 2003. Vol. 92. P. 133.
4. Khan M.N.A., Cho J.Y., Lee M.C. et. al. J. Agric. Food Chem. 2007. Vol. 55. P. 6984.
5. Gosch B.J., Magnusson M., Paul N.A., De Nys R. GCB Bioenergy. 2012. Vol. 4. P. 919.
6. Miyashita K., Mikami N., Hosokawa M. J. of Funct. Foods. 2013. Vol. 5. P. 1507.
7. Khotimchenko S.V., Vaskovsky V.E., Tityanova T.V. Botanica Marina. 2002. Vol. 45. P. 17.
8. Schmid M., Guiheneuf F., Stengel D.B. J. of Applied Phycology. 2014. Vol. 26. P. 451.
9. Silke K. Schagen, Vasiliki A. Zampeli, Evgenia Makrantonaki, Christos C. Zouboulis. Dermatoendocrinol. 2012. Fasc. 4. No. 3. P. 298.
10. Строев Е.А. Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1986. 479 с. С. 340, 352.
11. Blouin N. et al. J. of Applied Phycology. 2006. Vol. 18. P. 79.
12. Ragonese C. et al. Food Chemistry. 2014. Vol. 145. P. 932.
13. Jaren-Galan M., Nienaber U., Schwartz S.J. J. of Agricul. and Food Chem. 1999. Vol. 47. P. 3558.
14. Crampon C., Boutin O., Badens E. Indust. & Engineering and Chem. Res. 2011. Vol. 50. P. 8941.

15. Garcia A., Lucas A.D., Rincon J. et al. J. of American Oil Chemists Society. 1996. Vol. 73. P. 1127.
  16. Herrero M., Castro-Puyana M., Mendiola J.A. Trends in Analytical Chem. 2013. Vol. 43. P. 67.
  17. Raventys M., Duarte S., Alarcyn R. Food Science Technology International. 2002. Vol. 8. No. 5. P. 269.
  18. Friedlienberg M.H.G. Biochim. et Biophys. Acta. 1954. Vol. 14. No. 1. P. 136.
  19. Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds / Ed. by Jose L. Martinez. CRC Press, 2008. 420 p.
  20. Боголицын К.Г., Красицова А.А., Гусакова М.А. СКФ-ТП. 2015. Т. 10. № 1. С. 61.
  21. Подкорытова А.В. Качество, безопасность и методы анализа продуктов из гидробионтов М.: Изд-во ВНИРО, 2009. 108 с.
  22. Bligh E.G., Dyer W.J. Canad. J. of Biochem. and Physiol. 1959. Vol. 37. P. 911.
  23. ГОСТ Р 51486-99. Получение метиловых эфиров жирных кислот. Дата введения 2001-01-01. 8 с.
  24. ГОСТ 14502-1-2010. Чай. Метод определения общего содержания полифенолов. М.: Стандартинформ, 2012. 14 с.
  25. ГОСТ 26185-84. Водоросли морские, травы морские и продукты их переработки. Методы анализа. М.: Стандартинформ, 2010. 34 с.
  26. Buther E.C., Picker L.J. Science. 1996. Vol. 272. P. 60.
  27. Springer T.A. Cell. 1994. Vol. 76. P. 301.
  28. Conssens L.M., Werb Z.J. Exp. Med. 2001. Vol. 193. P. 23.
  29. Di Carlo E., Forni G., Musiant P. Chem. Immunol. Allergy. 2001. Vol. 83. P. 182.
  30. Pretswich R.J., Errington F., Hatfield P. Clin. Oncol. 2008. Vol. 20. P. 101.
  31. Nothan C. Nature Rev. Immunol. 2006. Vol. 6. P. 173.
  32. Yang D., Chen Q., Chertov O., Oppenheim J.J. J. Leukoc. Biol. 2000. Vol. 68. P. 945.
  33. Scapini P., Lapinet-Vera J.A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., Cassatella M.A. Immunol. Rev. 2000. Vol. 177. P. 195.
  34. Ford W.L., Gowans J.L. Seminars Hemat. 1969. Vol. 6. P. 67.
  35. Справочник химика / Под ред. Б.П. Никольского. М.—Л.: Госхимиздат, 1963. 1168 с.
  36. Reverchon E., De Marco I. J. of Supercrit. Fluids. 2006. Vol. 38. P. 146.
  37. Mendes R., Nobre B., Cardoso M., Peirera A., Palavra A. Inorg. Chim. Acta. 2003. Vol. 356. P. 328.
  38. Mendes R., Reis A., Palavra A. Food Chem. 2006. Vol. 99. P. 57.
  39. Choi K., Nakhost Z., Krukonis V., Karel M. Food Biotechnol. 1987. Vol. 1. Is. 2. P. 263.
- 
- 

**FATTY ACID COMPONENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF SUPERCRITICAL EXTRACTS OF ARCTIC BROWN ALGAE  
*FUCUS VESICULOSUS***

**<sup>1,2</sup>K.G. Bogolitsyn, <sup>1</sup>P.A. Kaplitsin, <sup>3</sup>L.K. Dobrodeeva, <sup>1</sup>A.S. Druzhinina,  
<sup>1</sup>D.V. Ovchinnikov, <sup>1</sup>A.E. Parshina, <sup>1</sup>E.V. Shulgina**

<sup>1</sup>*Lomonosov Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Ecological Problems of the North of UB RAS, Arkhangelsk, Russia*

<sup>3</sup>*Institute of Environmental Physiology Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*

Supercritical (SC) fluid extraction is utilized to study the fatty acid composition of the arctic brown algae. A method for fractioning of the SC extract based on the differences in solubility of its components (fatty acids, polyphenols) is proposed. The composition and biological activity of fractions are determined.

**Key words:** arctic brown algae, supercritical fluids, fatty acids, polyphenols, antioxidant activity.

---

---