

ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ

УДК (664.951.014:577.115):594.582.2/.8

Е.В. Ермоленко¹, Р.М. Султанов¹, С.П. Касьянов¹, Ю.Г. Блинов^{2*}¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
690059, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17;² Тихоокеанский научно исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4**КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ
КОМАНДОРСКОГО КАЛЬМАРА *BERRYTEUTHIS MAGISTER***

Представлена разработанная технология комплексной переработки липидов печени командорского кальмара. Данный промысловый объект является одним из самых массовых видов, однако печень кальмара ранее никогда не утилизировалась, хотя является богатым источником липидов с простой эфирной связью, 1-*O*-алкил-глицериновых эфиров (АГЭ), и омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ω 3 ПНЖК). Представленная технология переработки позволяет получать три препарата различного компонентного состава и различной фармакологической активности. Были получены две фракции алкил-глицериновых эфиров — насыщенные и ненасыщенные, — а также концентрат омега-3 полиненасыщенных жирных кислот с суммарным содержанием эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот 46 %.

Ключевые слова: алкил-глицериновые эфиры, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, технология, биологическая активность, командорский кальмар.

Ermolenko E.V., Sultanov R.M., Kasyanov S.P., Blinov Yu.G. Complex processing of lipids from liver of the gonatid squid *Berryteuthis magister* // Izv. TINRO. — 2014. — Vol. 176. — P. 288–294.

Berryteuthis magister is one of the most common commercial species in the North-West Pacific, but its liver never was utilized before, though it was a rich source of the lipids with simple ether links, 1-*O*-alkyl-glycerol ethers (AGE), and ω 3 polyunsaturated fatty acids (ω 3 PUFA). Technology for complex processing of lipids from its liver is developed and presented in details. These forms of lipids are distinguished by a wide range of biologic activity: AGE are effective immunomodulators which enhance hemopoiesis, relieve lesions and lower risk of secondary lesions under radio-therapy and can be used for treatment of some malignant tumors (glioma, prostate cancer, lung carcinoma, etc.); ω 3 PUFA could be used for prophylactic of cardiovascular diseases, Alzheimer's sclerosis, senile dementia, skin diseases (protein synthesis control) and other diseases. The presented technology provides extraction of three preparations with different chemical composition and pharmacological activity. Both saturated and unsaturated AGE could be extracted using the property of different solubility in organic

* Ермоленко Екатерина Владимировна, аспирант, e-mail: ecrive711@mail.ru; Султанов Руслан Миргасимович, аспирант, e-mail: russik101190@mail.ru; Касьянов Сергей Павлович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: serg724@yandex.ru; Блинов Юрий Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора, e-mail: tinro@tinro.ru.

Ermolenko Ekaterina V., postgraduate student, e-mail: ecrive711@mail.ru; Sultanov Ruslan M., postgraduate student, e-mail: russik101190@mail.ru; Kasyanov Sergey P., Ph.D., senior researcher, e-mail: serg724@yandex.ru; Blinov Yury G., D.Sc., professor, deputy director, e-mail: tinro@tinro.ru.

solvents for different components of the mixture of hydrolyzed lipids. The main component of the saturated AGE fraction is chimyl alcohol (90.5 %), but the unsaturated fraction contains 54.7 % of monounsaturated AGE. The ω 3 PUFA are concentrated to summary 46 % content of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by the method of fatty acids crystallization with carbamide. Comparing with traditional raw materials for AGE and ω 3 PUFA production, as shark liver, the liver of gonatid squid is more suitable because of its high and accessible resources, whereas sharks are presented in bycatch only so cannot be considered as a stable source.

Key words: 1-*O*-alkyl-glycerol ether, ω -3 polyunsaturated fatty acid, chemical technology, biological activity.

Введение

Морские липиды — это многокомпонентная смесь различных по структуре и свойствам соединений. Например, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ω 3 ПНЖК) обладают высокой биологической активностью и являются незаменимыми для человека. Проведенные научные исследования доказали, что омега-3 ПНЖК, главным образом докозагексаеновая кислота (ДГК), требуются для нормального функционирования мозга (Innis, 2007). ДГК активно транспортируется через плаценту от матери к плоду, а также присутствует в грудном молоке, что указывает на ее важность для развития плода, постнатального роста и развития (Imhoff-Kunsch et al., 2011; Heaton et al., 2013). Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) и ДГК также играют центральную роль в поддержании гомеостаза воспалительных реакций. ЭПК — предшественник тромбоксанов, простагландинов и лейкотриенов — высокоактивных иммуно-воспалительных регуляторов (Сергеева, Варфоломеева, 2006). Кроме того, недавно описанные окисленные метаболиты ЭПК и ДГК — резолвины, докозатриены и нейропротектины — обладают как противовоспалительными, так и защитными свойствами (Serhan et al., 2004; Vazan et al., 2012). Дефицит ω 3 ПНЖК в диете может способствовать возникновению сердечнососудистых, иммуно-воспалительных заболеваний, инсульта и психических расстройств (Lands, 2012).

Другой специфический класс соединений, присутствующий в составе морских липидов, — 1-*O*-алкил-глицериновые эфиры (АГЭ), которые, например, в печени кальмара могут составлять до 50 % от суммы нейтральных липидов (Hayashi et al., 1985; Касьянов и др., 2010). АГЭ в природе встречаются в виде 1-*O*-алкил-2,3-диацилглицеринов (АДГ) или в виде алкильных полярных липидов (рис. 1). В свободном состоянии АГЭ не найдены, они образуются в процессе ферментативного или химического деацилирования АДГ.

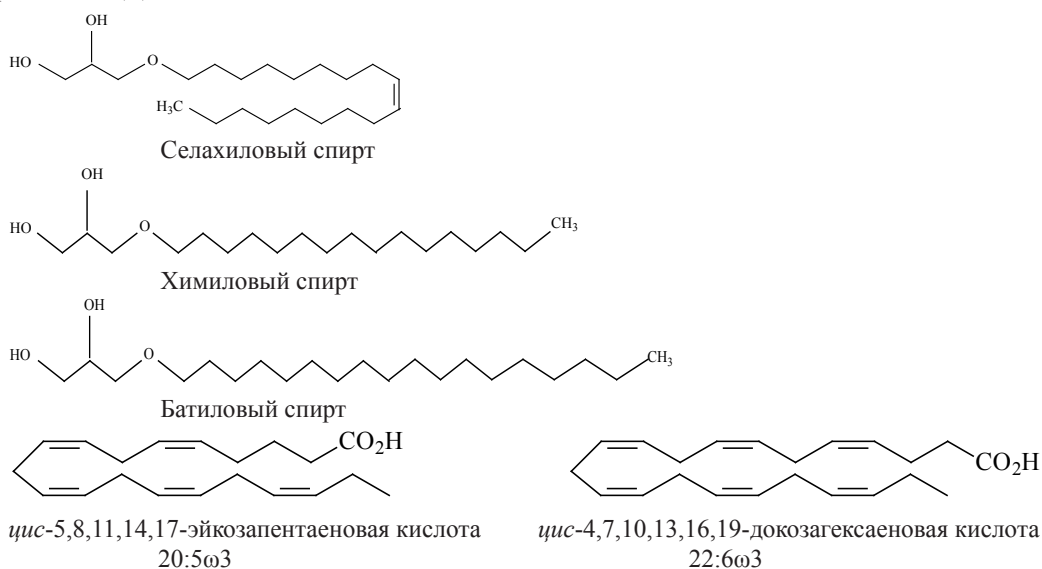


Рис. 1. Структурные формулы наиболее распространенных АГЭ, ЭПК и ДГК
Fig. 1. Structural formulas of the most common of AGE, EPA and DHA

Биологический потенциал АГЭ в последние годы привлекает очень большое внимание в связи с тем, что они являются предшественником важнейшего липидного посредника — фактора активации тромбоцитов (Magnusson, Haraldsson, 2011). У человека АГЭ обнаружены в липидах женского молока и костного мозга, что связывают со становлением и поддержанием иммунного статуса младенцев и взрослых (Iannitti, Palmieri, 2011). Биомедицинские исследования с участием АГЭ показали их высокую биологическую активность практически во всех органах и тканях человека (Pédrono et al., 2004; Новгородцева и др., 2007). Однако эти исследования проводились или на общих липидах, содержащих в своем составе АДГ, или на синтетических АГЭ. В ряде исследований показано, что биологическая активность АГЭ изменяется в очень широких пределах и зависит от структуры, длины и степени ненасыщенности алкильного заместителя, причем наибольшую активность показали насыщенные С10-16 и мононенасыщенные С18 производные АГЭ. Сложности в химическом синтезе и отсутствие на рынке чистых природных АГЭ, очевидно, сдерживают детальные биомедицинские исследования (Frishein et al., 1999).

Цель настоящего исследования — разработка комплексного технологического процесса переработки липидов печени кальмара для получения препаратов ω3 ПНЖК и АГЭ.

Материалы и методы

Печень командорского кальмара *Berryteuthis magister* была заготовлена на промысле в Беринговом море. Выделение жира из печени проводили стандартными методами (Пат. № 2241026).

Определение состава липидов проводили гравитометрически. Навеску липидов фракционировали колоночной хроматографией на силикагеле (40–100 мкм, Чехия), используя элюирующую систему гексан-диэтиловый эфир в градиенте эфира 0 → 10 %. Полярные липиды вымывали смесью хлороформа с уксусной кислотой (0,5 %). Индивидуальные фракции липидов упаривали и взвешивали.

Для выделения из жира АГЭ жир кальмара подвергали щелочному гидролизу для высвобождения жирных кислот (ЖК) из 2- и 3-го положения глицерина. Далее смесь липидов растворяли в ацетоне и дважды кристаллизовали из него при низких температурах. Осадок насыщенной фракции АГЭ после второй кристаллизации высушивали от растворителя (Пат. № 2415125; Пат. № 2476211). Далее из оставшейся смеси липидов извлекали ненасыщенную фракцию АГЭ экстракцией растворами низкомолекулярных спиртов.

Получение концентратов ω3 ПНЖК методом комплексообразования с мочевиной проводили по ранее разработанному методу (Пат. № 1581737).

Состав ЖК в виде метиловых эфиров определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Shimadzu-14A» с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке «Supelcowax-10™», 0,25 мм × 30 м. Газ-носитель гелий, температура термостата 190 °С, температура инжектора и детектора — 240 °С.

Состав АГЭ в виде TMS-производных определяли на хромато-масс-спектрометре «GC-MS Shimadzu QP 5050A». Пробу TMS-производных АГЭ готовили, добавляя к 2 мг образца 0,2 мл силилирующего реактива BSTFA и выдерживали 1 ч при температуре 60 °С. Условия анализа: колонка MDN-5S, 30 м × 0,5 мм, температура инжектора 250 °С, температура детектора 250 °С, программа: температура колонки 200 °С — 3 мин, затем 2 °С/мин до 260 °С, при 260 °С — 10 мин, газ-носитель гелий, линейная скорость потока 30 см/мин.

Идентификацию пиков проводили, используя стандартные смеси метиловых эфиров ЖК и TMS-производных АГЭ.

Результаты и их обсуждение

Состав липидов печени кальмара в значительной степени изменялся в зависимости от сезона и района вылова, что связано главным образом с питанием моллюска.

В табл. 1 приведены средние значения из 8 выборок печени кальмара, выловленного в различные сезоны.

Таблица 1

Состав липидов печени командорского кальмара

Table 1

Lipid composition of gonatid squid *Berryteuthis magister* liver

Класс липидов	Содержание, % от общих липидов (n = 8)
Эфиры стеринов	5,5
Алкил-диацилглицерины (АДГ)	40,4
Триглицериды	11,2
Жирные кислоты	22,4
Диглицериды	5,0
Моноглицериды	2,5
Холестерин	5,2
Алкил-глицериновые эфиры (АГЭ)	6,4
Фосфолипиды	1,4

Примечание. Приведен состав липидов промышленно заготовленной на промысле печени кальмара (хранение при минус 25 °С в течение 3 мес).

Из данных табл. 1 видно, что АДГ и ЖК составляли более половины, соответственно 40,4 и 22,4 % от общих липидов. Поскольку печень кальмара характеризуется высокой активностью липолитических ферментов, гидролизующих ацильные радикалы, то высокое содержание в липидах свободных ЖК и АГЭ является следствием этой активности (Hayashi et al., 1985).

Как отмечалось выше, биологическая активность гомологов АГЭ зависит от длины алкильного радикала и степени их ненасыщенности (Deniau et al., 2010). Основным молекулярным видом в суммарных АГЭ является 1-О-гексадецил-глицериновый эфир (С16:0), или химилловый спирт (рис. 1). Его доля достигает 64,0 % от суммы АГЭ, выделенных из общих липидов печени кальмара, в то время как суммарные ненасыщенные АГЭ составляют только 27,9 %. Но, учитывая большую активность ненасыщенных АГЭ при ряде патологий (Deniau et al., 2010), была предпринята попытка сконцентрировать в одном процессе отдельно обе фракции — насыщенную и ненасыщенную. В дальнейшем их можно будет использовать как источники для выделения индивидуальных гомологов АГЭ.

Выделение различных фракций АГЭ. Состав АГЭ липидов печени кальмара приведен в табл. 2 и на хроматограмме (рис. 2).

Таблица 2

Состав АГЭ в липидах печени кальмара и полученных препаратах

Table 2

AGE composition in lipids of squid liver and its preparations

АГЭ*	Содержание, % от суммы АГЭ		
	Печень кальмара	Насыщенные АГЭ	Ненасыщенные АГЭ
14:0	2,2	3,5	3,2
15:0	0,3	0,2	0,3
16:1	1,0	–	3,9
16:0	63,6	90,5	34,2
17:1	–	–	0,4
17:0	1,4	0,8	1,0
18:1	23,6	–	43,1
18:0	4,5	5,0	5,7
20:1	3,0	–	6,2
22:1	0,3	–	1,1
Другие	0,1	–	0,9

* Приведены радикалы в 1-м положении глицерина, первая цифра — длина углеродной цепочки радикала, вторая — число двойных связей.

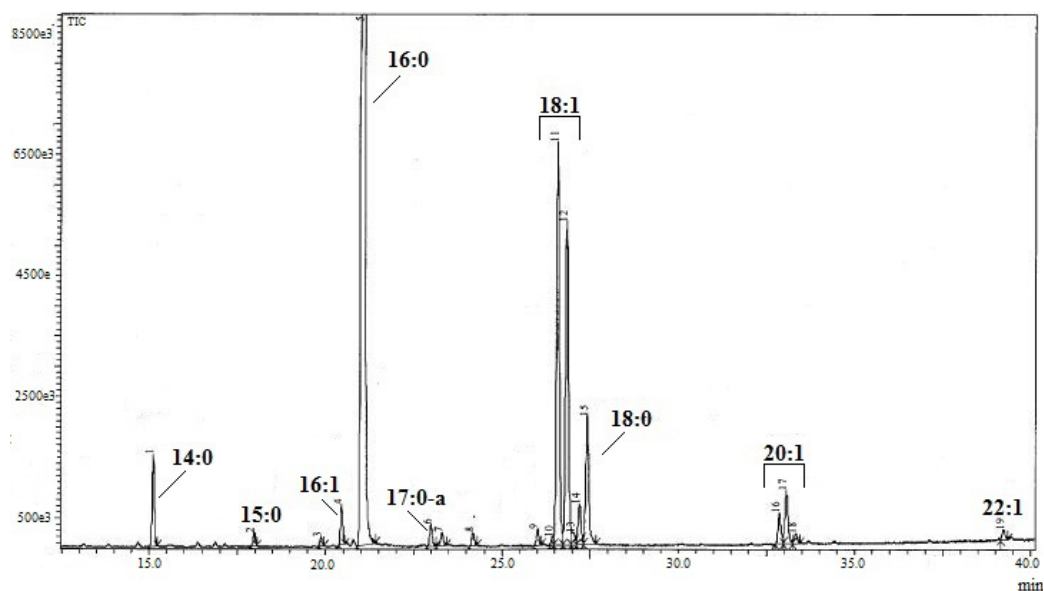


Рис. 2. Хроматограмма суммарных АГЭ, выделенных из жира печени кальмара
 Fig. 2. Chromatogram of total AGE extracted from squid liver lipids

Поскольку близость физико-химических свойств триацилглицеринов и АДГ не позволяла использовать методы разделения, основанные на физических принципах — низкотемпературная кристаллизация или растворимость в органических растворителях, разделение по классам проводили после предварительного щелочного гидролиза нативных липидов. Образовавшиеся свободные ЖК и АГЭ имеют различную растворимость в ацетоне при низких температурах. Это свойство было использовано в процедуре разделения АГЭ и свободных ЖК.

Двойной кристаллизацией из ацетона удалось выделить насыщенные АГЭ с чистотой свыше 98 %. Другим методом выделения насыщенных АГЭ является кристаллизация их из гексана (Hayashi, 1986). Однако гексан является неприемлемым растворителем ввиду его взрывоопасности и высокой стоимости. После высушивания получали белый рассыпчатый порошок с температурой плавления около 70 °С. Затем проводили экстракцию ненасыщенных АГЭ из оставшейся смеси липидов (Пат. № 2415125; Пат. № 2476211). Ненасыщенная фракция АГЭ представляла собой при комнатной температуре непрозрачную маслянистую жидкость. Таким образом, получена фракция АГЭ, в которой содержание ненасыщенных АГЭ увеличилось с 28,3 до 54,7 %.

Концентрирование ЭПК и ДГК. Жир печени командорского кальмара не рассматривался в качестве источника ЭПК и ДГК, поскольку их суммарное содержание не превышает 15 % от суммы ЖК, что близко к показателям жира из печени минтая или трески. Однако учитывая предварительный гидролиз и удаление АГЭ, можно считать этот источник перспективным для выделения как концентратов ω 3 ПНЖК, так и высокоочищенных ЭПК и ДГК. Среди многочисленных методов концентрирования ω 3 ПНЖК (Shahidi, Wanasundara, 1998) комплексообразование с мочевиной является одним из самых востребованных ввиду эффективности и простоты исполнения (Stechi et al., 2012). Этот метод успешно применен нами в технологии для концентрирования омега-3 ПНЖК, изначально присутствующих в жире.

Основную часть общих жирных кислот составляли насыщенные и моноеновые ЖК, которые легко удалялись комплексообразованием с мочевиной по ранее разработанному методу (Пат. № 1581737). В результате был получен концентрат с суммарным содержанием ω 3 ПНЖК 56,6 % (табл. 3).

В результате проведенных исследований была разработана принципиальная технологическая схема выделения из жира печени кальмара концентрата ω 3 ПНЖК и различных по степени ненасыщенности АГЭ (рис. 3).

Таблица 3

Состав жирных кислот липидов печени кальмара и полученного концентрата $\omega 3$ ПНЖК

Table 3

Composition of fatty acids in squid liver lipids and in extracted and concentrated $\omega 3$ PUFA

Жирная кислота*	Содержание, % от общей суммы		
	ЖК липидов печени кальмара	ЖК в осадке с мочевиной	Концентрат ПНЖК после мочевины
14:0	2,38	3,56	0,69
16:0	8,28	6,43	0,28
$\Sigma 16:1$	5,09	4,68	6,97
Фитановая	2,55	0,97	7,65
18:0	1,34	0,86	0,11
$\Sigma 18:1$	22,83	34,68	14,78
18:2 $\omega 6$	0,97	0,73	2,61
18:3 $\omega 3$	0,45	0,33	1,37
18:4 $\omega 3$	0,73	0,30	2,37
$\Sigma 20:1$	13,28	19,97	1,76
20:4 $\omega 6$	0,36	—	1,24
20:4 $\omega 3$	0,63	0,38	2,66
20:5 $\omega 3$	8,57	3,67	28,01
$\Sigma 22:1$	14,03	16,79	0,78
21:5 $\omega 3$	0,39	0,16	1,39
22:5 $\omega 3$	0,50	0,32	1,98
22:6 $\omega 3$	5,74	3,76	17,99
Другие	11,88	2,41	7,36
$\Sigma \omega 3$ ПНЖК	17,15	9,33	56,56

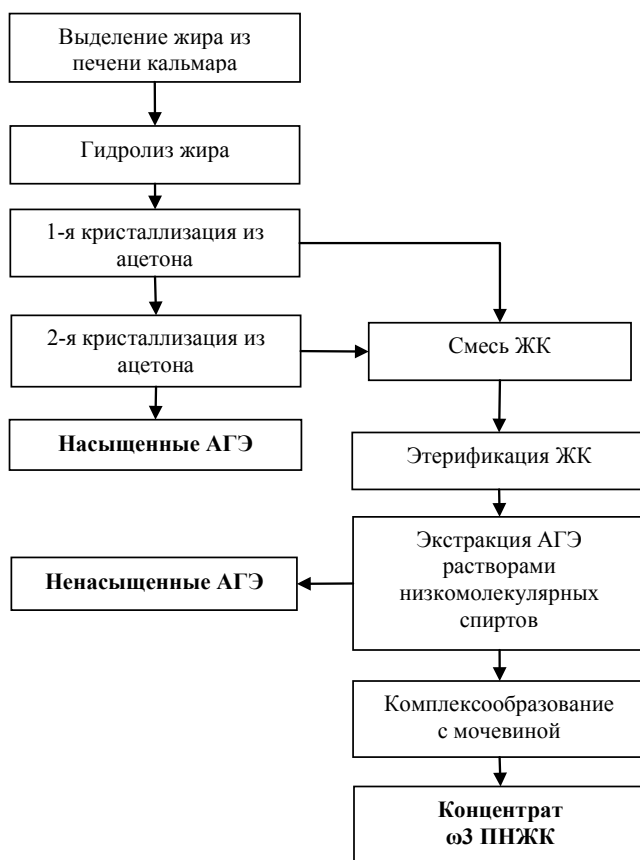
* Первая цифра обозначает количество углеродных атомов в цепи жирной кислоты, вторая — количество ненасыщенных связей, $\omega 3$ — расположение первой двойной связи от метильной группы.

Рис. 3. Технологическая схема получения насыщенных и ненасыщенных АГЭ и концентрата $\omega 3$ ПНЖК из липидов печени кальмара

Fig. 3. Scheme of technology for producing of saturated and unsaturated AGE and concentrated $\omega 3$ PUFA from squid liver lipids

Заключение

Разработанный технологический процесс комплексной переработки липидов печени командорского кальмара обеспечивает эффективное получение целевых препаратов — $\omega 3$ ПНЖК и АГЭ. В одном технологическом процессе реализуется возможность выделения как насыщенной, так и ненасыщенной фракций АГЭ. Каждый из получаемых препаратов имеет стандартизированный состав и может быть применен для профилактики и лечения различных патологий.



Список литературы

- Касьянов С.П., Латышев Н.А., Светашев В.И. и др.** Фармакологические эффекты биологически активной добавки к пище на основе моноалкилглицеринов // Тихоокеан. мед. журн. — 2010. — № 2. — С. 32–35.
- Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Виткина Т.И., Касьянов С.П.** Сравнительная характеристика биологической активности жиров из гепатопанкреаса камчатского краба и печени командорского кальмара // Вестн. ДВО РАН. — 2007. — № 6. — С. 105–110.
- Пат. № 1581737** Способ получения концентрата этиловых эфиров эйкозопентаеновой и докозагексаеновой кислот / С.П. Касьянов, Н.А. Латышев, Т.В. Глушенко. — Заявлено 23.06.1988; Опубл. 30.07.1990.
- Пат. № 2241026** Способ получения жира из печени кальмара / С.П. Касьянов, Л.Н. Бочаров, В.Н. Акулин, Е.В. Якуш. — Заявлено 10.04.2003; Опубл. 27.11.2004.
- Пат. № 2415125** Способ получения алкил-глицериновых эфиров / С.П. Касьянов, Н.А. Латышев. — Заявлено 09.09.2009; Опубл. 27.03.2011.
- Пат. № 2476211** Способ получения алкил-глицериновых эфиров из морских жиров / С.П. Касьянов, Н.А. Латышев, Ч.К. Чуен. — Заявлено 16.09.2011; Опубл. 27.02.2013.
- Сергеева М.Г., Варфоломеева А.Т.** Каскад арахидоновой кислоты : монография. — М. : Нар. образование, 2006. — 256 с.
- Bazan N.G., Eady T.N., Khoutorova L. et al.** Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke // *Experimental Neurology*. — 2012. — Vol. 236. — P. 122–130.
- Crexvi V.T., Monte M.L., Monte M.L., Pinto L.A.A.** Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: chemical hydrolysis and urea complexation // *JAOCS*. — 2012. — Vol. 89. — P. 329–334.
- Deniau A.L., Mosset P., Pedrono F. et al.** Multiple beneficial health effects of natural alkylglycerols from shark liver oil // *Mar. Drugs*. — 2010. — Vol. 8. — P. 2175–2184.
- Frishein R., Brohult J., Rohstein-Rubin R.** The effects of alkylglycerols on cellular growth and sensitivity to chemotherapeutic agents in tumor cultures // *Tumor biology and human genetics*. — 1999. — Vol. 9. — P. 134–138.
- Hayashi K.** Isolation of Alkyl Glyceryl Ethers from Liver Oil Unsaponifiables by Recrystallization // *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* — 1986. — Vol. 52, № 8. — P. 1475.
- Hayashi K., Okawa Y., Kawasaki K.** Liver lipids of gonatid squid *Beryteuthis magister*: a rich source of alkyl glyceryl ethers // *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* — 1985. — Vol. 51, № 9. — P. 1523–1526.
- Heaton A.E., Meldrum S.J., Foster J.K. et al.** Does docosahexaenoic acid supplementation in term infants enhance neurocognitive function in ginfancy? // *Front. Hum. Neurosci.* — 2013. — Vol. 7. — P. 1–12.
- Iannitti T., Palmieri B.** An update on the therapeutic role of alkylglycerols // *Mar. Drugs*. — 2011. — Vol. 8. — P. 2267–2300.
- Imhoff-Kunsch B., Stein A.D., Martorell R. et al.** Prenatal docosahexaenoic acid supplementation and infant morbidity: randomized controlled trial // *Pediatrics*. — 2011. — Vol. 128, № 3. — P. 1–8.
- Innis S.M.** Dietary (n-3) fatty acids and brain development // *J. Nutr.* — 2007. — Vol. 137, № 4. — P. 855–859.
- Lands B.** Consequences of essential fatty acids // *Nutrients*. — 2012. — Vol. 4. — P. 1338–1357.
- Magnusson C.D., Haraldsson G.G.** Ether lipids // *Chem. Phys. Lipids*. — 2011. — Vol. 164. — P. 315–340.
- Pedrono F., Cheminade C., Legrand A.B.** Natural 1-O-alkylglycerols reduce platelet-activating factor-induced release of [³H]-serotonin in rabbit platelets // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. — 2004. — Vol. 71. — P. 19–23.
- Serhan C.N., Arita M., Hong S., Gotlinger K.** Resolvins, docosatrienes, and neuroprotections, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers // *Lipids*. — 2004. — Vol. 39. — P. 1125–1132.
- Shahidi F., Wanasundara U.** Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies // *Trends in Food Science & Technology*. — 1998. — Vol. 9, № 6. — P. 230–240.

Поступила в редакцию 4.12.13 г.