

ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 582.26–119:615.322

Н.М. Аминина, Т.И. Вишневская, Е.П. Караулова, Е.В. Якуш*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4**СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ И АНТИОКСИДАНТНАЯ
АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ
МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ**

Приведены результаты исследования содержания полифенольных соединений в экстрактах сахарины японской, фукуса исчезающего и анфельции тобучинской. Определена степень экстракции полифенольных соединений из водорослей при различных условиях. Показано, что из сахарины японской и анфельции тобучинской больше полифенолов экстрагируется дистиллированной водой, из фукуса исчезающего — 50 %-ным этанолом. Установлено, что антиоксидантная активность экстрактов исследованных водорослей зависит от концентрации в них полифенолов и условий проведения экстракции. Спиртовые экстракты фукуса отличаются самой высокой концентрацией полифенолов и обладают наиболее сильной антиоксидантной активностью среди исследованных нами объектов.

Ключевые слова: полифенолы, антиоксидантная активность, сахарина японская, фукус исчезающий, анфельция тобучинская, условия экстракции.

Aminina N.M., Vishnevskaya T.I., Karaulova E.P., Yakush E.V. Content of polyphenols and antioxidant activity of extracts from certain species of seaweeds // Izv. TINRO. — 2017. — Vol. 189. — P. 184–191.

Polyphenol compounds in extracts from the seaweeds *Saccharina japonica*, *Fucus evanescens*, and *Ahnfeltia tobuchinensis* are investigated and antioxidant activity of the extracts is evaluated. The extracts were prepared using different solvents (distilled water, ethanol, acetone) or mixtures of the solvents under various conditions. By the species, the polyphenols were extracted better by water from *S. japonica* and *A. tobuchinensis* and by 1 : 1 mixture of water and ethanol from *F. evanescens*. Heating increased the degree of polyphenols extraction but could decrease antioxidant activity of the extracts. After 24 hours extraction by 70 % acetone solution under 50 °C, the antioxidant activity of the extract from *S. japonica* was in 3 times lower as compared with the extract obtained at room temperature, though the polyphenols concentration was almost the same (0.09 and 0.11 mg/mL, respectively). The polyphenols concentration was the highest and antioxidant activity was the strongest for the extract from *F. evanescens* by 50 % ethanol solution under room temperature. The properties of the extracts from seaweeds are compared with the extracts from terrestrial plants. The polyphenols content

* Аминина Наталья Михайловна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, e-mail: aminina@tinro.ru; Вишневская Татьяна Ивановна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, e-mail: vishnevskaya@tinro.ru; Караулова Екатерина Павловна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, e-mail: karaulova@tinro.ru; Якуш Евгений Валентинович, кандидат химических наук, заведующий НИО, e-mail: evyakush@tinro.ru.

Aminina Natalia M., Ph.D., head of laboratory, e-mail: aminina@tinro.ru; Vishnevskaya Tatiana I., Ph.D., senior researcher, e-mail: vishnevskaya@tinro.ru; Karaulova Ekaterina P., Ph.D., senior researcher, e-mail: karaulova@tinro.ru; Yakush Eugene V., Ph.D., head of department, e-mail: evyakush@tinro.ru.

in the extract from blackcurrant berry is comparable with the extract from *S. japonica* and its antioxidant activity is close to that for the extract from *F. evanescens*.

Key words: extraction, polyphenol, antioxidant activity, *Saccharina japonica*, *Fucus evanescens*, *Ahnfeltia tobuchiensis*, extraction condition.

Введение

Многие патологические состояния человека и животных связаны с нарушением нормального уровня свободных радикалов в их органах и тканях. В современной клинической практике коррекция подобных нарушений нередко выполняется с применением экзогенных антиоксидантов полифенольной природы (Gordon, 2012). Обычно это синтетические препараты, использование которых зачастую сопряжено с побочными эффектами или активность их теряется под действием пищеварительных ферментов. Поэтому в настоящее время идет интенсивный поиск природных полифенолов, обладающих значимой антиоксидантной активностью. Эти соединения широко распространены в наземных и морских растениях. Основными источниками природных антиоксидантов считаются высшие наземные растения, при этом совершенно неоправданно недооценивается значение морских водорослей, в особенности бурых, содержащих значительные концентрации полифенолов специфического строения. Активность этих соединений из морского сырья была продемонстрирована *in vitro* во многих работах (Nakamura et al., 1996; Shibata et al., 2008; Yoon et al., 2011; Shobharani et al., 2014; Zhao et al., 2016).

Условия выделения полифенольных соединений значительно варьируют в зависимости от источника сырья, что, в свою очередь, влияет на состав и содержание их в экстракте и на его антиоксидантную активность (Hayouni et al., 2007). Кроме того, степень экстракции полифенолов из морского сырья зависит от района и времени сбора водорослей, физиологических и экологических особенностей их произрастания (Marinho-Soriano et al., 2006). Несмотря на то что в последние годы появилось много данных по исследованию полифенолов морского растительного сырья, работы, посвященные изучению этих соединений в водорослях российского побережья дальневосточных морей, встречаются редко.

Целью настоящей работы было исследование условий выделения полифенолов из некоторых видов морских водорослей Японского моря и определение антиоксидантной активности полученных экстрактов.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований были выбраны три вида промысловых бурых и красных водорослей, добытых в августе 2015 г. в прибрежных водах о. Сахалин: сахарина японская *Saccharina japonica*, фукус исчезающий *Fucus evanescens*, анфельция тобучинская *Ahnfeltia tobuchiensis*.

Каждый высушенный и измельченный образец морских водорослей (10,0 г) взвешивали на электронных весах марки VIBRA HT, вносили в термостойкую колбу, добавляли 100 мл растворителя. Колбы встряхивали и оставляли при комнатной температуре или помещали в водяную баню при температуре 50 °C на 24 или 72 ч. Затем смесь центрифугировали при 8 тыс. об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали и использовали для определения в ней концентрации полифенолов.

Экстракцию проводили как моноэкстрагентами, так и сочетаниями двух различных растворов. В двух случаях водорослевый остаток после экстракции дистиллированной водой обрабатывали 70 %-ным раствором этанола 24 ч при комнатной температуре или 2 ч при температуре 50 °C и далее 22 ч при комнатной температуре. Смесь центрифугировали, надосадочную жидкость объединяли с первым экстрактом и использовали для дальнейших исследований.

В качестве сравнения исследовали водные экстракты ягод смородины черной *Ribes nigrum*. Экстракцию проводили дистиллированной водой в течение 3 ч при охлаждении (4 °C).

Общее содержание полифенолов в экстракте определяли в соответствии с модифицированным методом Фолина-Чекольте (Koivikko et al., 2005), используя флороглюцин в качестве стандарта (Phloroglucinol, 99 %, HPLC, Sigma-Aldrich). Калибровочную кривую строили в диапазоне концентраций стандарта 5–50 мкг/мл.

Исследуемые образцы экстрактов разводили в соответствии с рабочим диапазоном калибровочной кривой. Аликвоту разбавленного образца 100 мкл смешивали с 100 мкл реактива Фолина-Чекольте. Приливали 200 мкл 20 %-ного раствора Na_2CO_3 и оставляли в темноте на 30 мин при 18 °С. Растворы центрифугировали при 8 тыс. об/мин (центрифуга Hitachi RX II Series) и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при 750 нм с использованием микропланшетного сканера Polarstar Omega (Germany). Общее содержание полифенолов рассчитывали, используя стандартную калибровочную кривую. Измерения проводили трижды, данные анализировали с помощью программного обеспечения Statistica 7. Результаты выражены в виде среднего значения со стандартным отклонением. Значения с 95 %-ным доверительным интервалом ($P < 0,05$) считались статистически значимыми.

Результаты и их обсуждение

Выделение фенольных соединений из растений проводится полярными растворителями, чаще всего водой, водно-спиртовыми растворами, водными растворами ацетона. Полярность растворителя и условия экстракции имеют важное значение при определении способа максимального извлечения этих соединений из растительного сырья (Hayouni et al., 2007). Из литературных данных (Machu et al., 2015) известно, что степень экстракции полифенолов в значительной степени зависит от вида водоросли. Например, максимальное количество полифенолов из *Eisenia bicyclis*, как и из других видов бурых и красных водорослей, удалось экстрагировать дистиллированной водой и смесью вода : уксусная кислота : метанол (30 : 69 : 1, v/v/v), из *S. japonica* больше полифенолов было выделено с использованием 80 %-ного метанола, а из *Undaria pinnatifida* — 100 %-ного метанола (Machu et al., 2015). Максимальное количество полифенолов из красной водоросли удалось извлечь с помощью этилацетата, а самую высокую антиоксидантную активность показал экстракт хлороформа (Nurul et al., 2011). Для *Saccharina bongardiana*, произрастающей у берегов Камчатки, наиболее высокую концентрацию полифенолов удалось получить четырехкратной экстракцией 70 %-ным ацетоном в течение 1 ч (Auezova et al., 2013). Время экстракции у разных исследователей также варьирует от 10 мин (Machu et al., 2015) до суток и более (Спрыгин и др., 2012; Movahedinia, Heydari, 2014), температура — от 4 до 100 °С (Machu et al., 2015). До сих пор еще не установлены оптимальные условия для экстракции полифенолов из разного растительного сырья, вероятно, в связи с гетерогенным составом этих соединений в растениях, а также значительным варьированием их содержания в зависимости от условий произрастания.

Закономерности влияния экстрагента и условий экстракции на содержание полифенолов в растворах и их антиоксидантную активность были изучены на примере сахарины японской, основной промысловой водоросли дальневосточных морей. Нами были выбраны наиболее часто встречающиеся в экспериментах с бурыми водорослями растворители (дистиллированная вода, этанол, ацетон) и температура экстракции (комнатная и нагревание до 50 °С), а также максимально применяемое в исследованиях время экстракции (24 и 72 ч).

Установлено, что в зависимости от условий экстракции содержание полифенолов в растворах меняется от 0,079 до 0,222 мг/мл. Максимальное количество полифенолов из сахарины японской экстрагировано дистиллированной водой при комнатной температуре в течение 72 ч (рис. 1).

Этанол и ацетон в 70 %-ной концентрации снижают количество экстрагируемых веществ из водоросли. Но во всех случаях увеличение продолжительности экстракции с 24 до 72 ч приводит к повышению концентрации полифенолов в растворе, особенно при использовании воды.

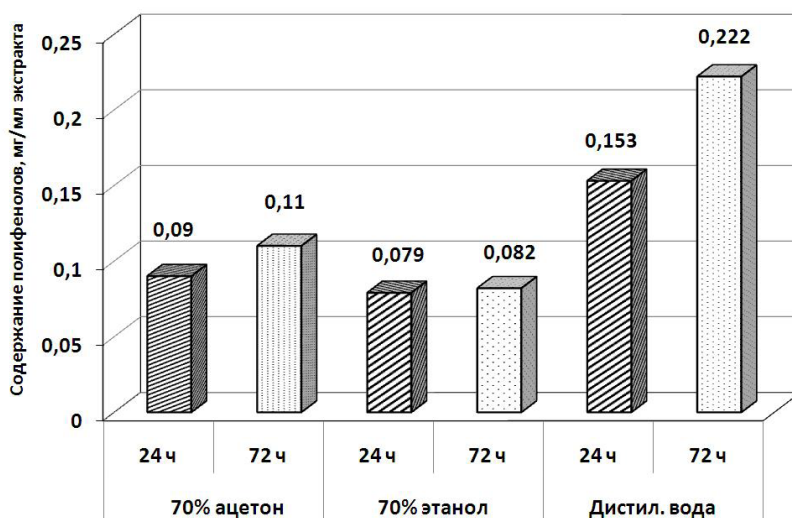


Рис. 1. Содержание полифенолов в экстрактах сахарины японской, полученных при комнатной температуре (26 °C)

Fig. 1. Polyphenols content in the extracts from *Saccharina japonica* obtained under room temperature (26 °C)

Нагревание при экстракции до 50 °C в течение 24 ч увеличивает количество полифенолов в водном растворе на 25 %, в растворе этанола — на 16, а ацетона — на 31 % (рис. 2).

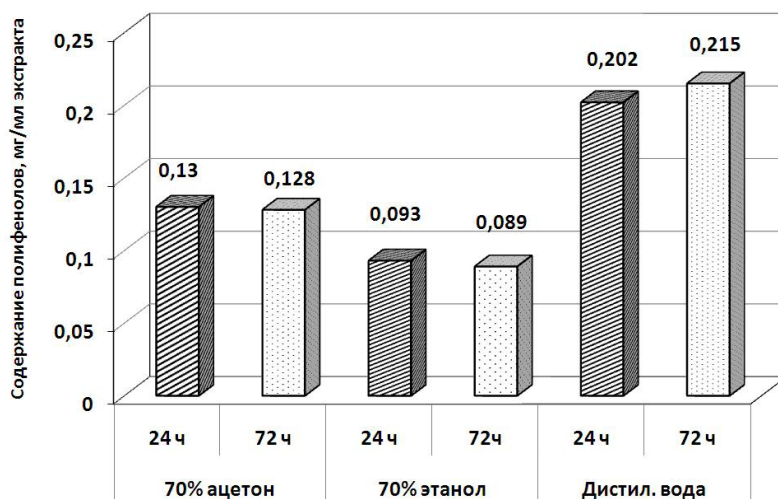


Рис. 2. Содержание полифенолов в экстрактах сахарины японской, полученных при нагревании до 50 °C

Fig. 2. Polyphenols content in the extracts from *Saccharina japonica* obtained under heating to 50 °C

Однако дальнейшее нагревание до 72 ч оказывается не эффективным и даже несколько уменьшает количество полифенолов в растворе ацетона и этанола.

Была предпринята попытка увеличить выход полифенолов в раствор двукратной экстракцией, сначала водой, затем 70 %-ным раствором этанола. В результате в суммарном экстракте концентрация полифенолов не увеличивается, а снижается (рис. 3).

Уменьшение концентрации полифенолов подтверждает тот факт, что основное количество исследуемых веществ экстрагируется из сахарины японской при использовании воды в качестве растворителя.

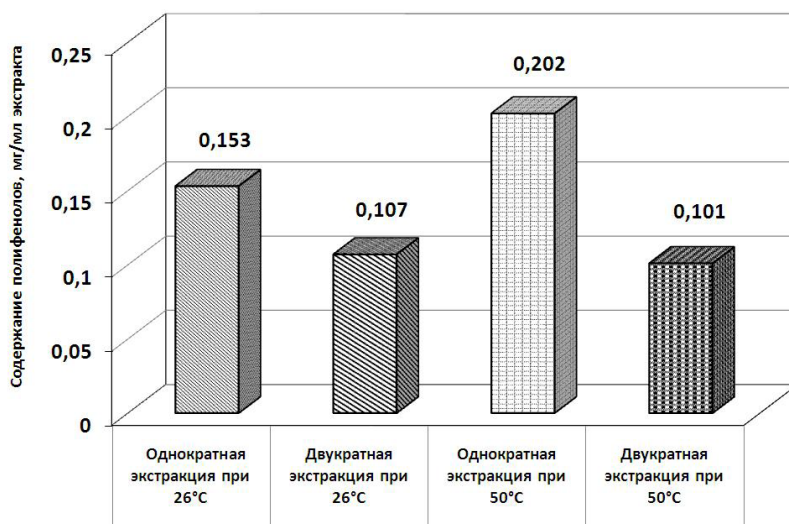


Рис. 3. Содержание полифенолов в сумме экстрактов сахарины японской, полученных последовательно с использованием воды и раствора этанола

Fig. 3. Polyphenols content in the extract from *Saccharina japonica* obtained by sequential using of water and ethanol solution

Все полученные нами экстракты исследовали на их антиоксидантное действие *in vitro*. Установлено, что антиоксидантная активность экстрактов зависит не только от концентрации в них полифенолов, но и от условий проведения экстракции (рис. 4).

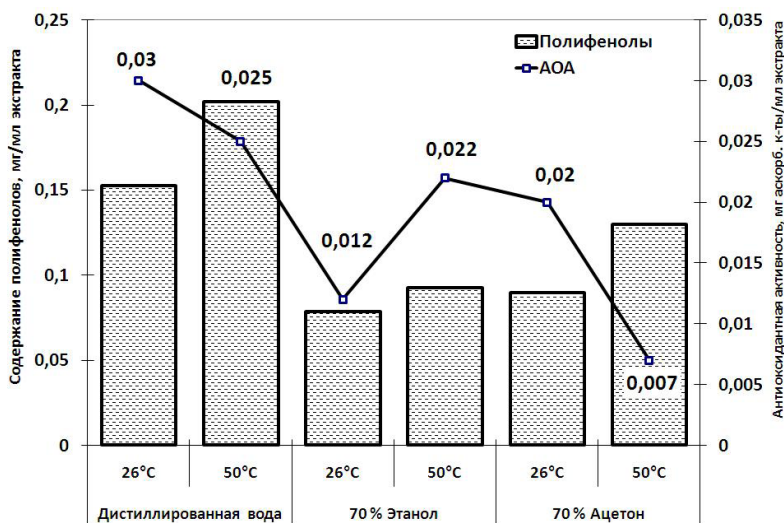


Рис. 4. Содержание суммы полифенолов и антиоксидантная активность в экстрактах сахарины японской

Fig. 4. Total polyphenols content in the extracts from *Saccharina japonica* and their antioxidant activity

Нагревание при 50 °С приводит к увеличению выхода полифенолов в экстракт, но может отрицательно сказываться на их антиоксидантной активности. Такая закономерность наблюдается при использовании в качестве растворителей дистиллированной воды и 70 %-ного раствора ацетона. В случае использования последнего растворителя нагревание в течение 24 ч при 50 °С приводит к падению антиоксидантной активности практически в 3 раза в отличие от экстракта, полученного при комнатной температуре, хотя концентрация полифенолов в них незначительно различается (соответственно 0,090–0,130 мг/мл). Скорее всего, при экстракции полифенолов в результате нагревания

происходит изменение структуры каких-то соединений, отвечающих за антиоксидантную активность экстрактов. В то же время при использовании этанола нагревание в течение 24 ч приводит не только к увеличению концентрации полифенолов на 15 %, но и к возрастанию антиоксидантной активности на 45 %. Можно предположить, что антиоксидантная активность экстрактов из сахарины японской определяется присутствием в них фракций различной природы, концентрация которых зависит от используемого растворителя и условий экстракции.

В целом оптимальными условиями извлечения из сахарины японской суммы полифенолов и их фракций с максимальной антиоксидантной активностью можно считать использование в качестве экстрагента дистиллированной воды при комнатной температуре и длительности процесса более 24 ч.

Вторым этапом нашей работы было исследование общего содержания полифенолов в промысловых водорослях разной систематической принадлежности. Результаты исследований представлены в таблице.

Общее содержание полифенольных соединений в экстрактах бурых и красных водорослей
Total content of polyphenol compounds in the extracts from brown and red algae

Наименование образца	Режим экстракции	АОА, мг аскорб. к-ты/мл экстракта	Общее содержание полифенолов, мг/мл экстракта
Анфельция тобучинская	Дист. вода, 24 ч, 26 °С	0,006 ± 0,003	0,051 ± 0,004
Анфельция тобучинская	Этанол 50 %, 24 ч, 26 °С	0,011 ± 0,006	0,042 ± 0,007
Фукус исчезающий	Дист. вода, 24 ч, 26 °С	0,115 ± 0,011	0,621 ± 0,021
Фукус исчезающий	Этанол 50 %, 24 ч, 26 °С	0,333 ± 0,031	1,454 ± 0,123

Из исследованных видов водорослей максимальное количество полифенолов обнаружено в фукусе исчезающем (1,454 мг/мл), минимальное — в анфельции тобучинской (0,042 мг/мл). Соответственно этому меняется и антиоксидантная активность экстрактов, максимальной она оказалась у фукуса исчезающего.

В отличие от сахарины японской и анфельции тобучинской, для фукуса экстракция 50 %-ным этанолом оказалась более эффективной, чем дистиллированной водой. Концентрация полифенолов в этом растворе в 2,3 раза выше, чем при экстракции водой. При этом антиоксидантная активность экстракта увеличивается в 2,9 раза по сравнению с водным экстрактом.

Для сравнения был проведен эксперимент с наземными растениями, в частности с ягодами черной смородины, которые считаются ценным источником флавонолов, обладающих высокой биологической активностью (Häkkinen et al., 1999). Установлено, что содержание полифенолов в экстрактах смородины сравнимо с их содержанием в экстрактах из сахарины японской, а их антиоксидантная активность близка к таковой у экстракта фукуса (рис. 5).

На рис. 5 видно, что антиоксидантная активность растительных экстрактов не зависит напрямую от суммы полифенолов, а определяется присутствием в них различных фракций соединений. Для определения этой взаимосвязи требуется проведение исследований по разделению суммы полифенолов на отдельные фракции и определению их антиоксидантной активности. Однако однозначно можно сказать, что спиртовые экстракты фукуса отличаются самой высокой концентрацией полифенолов и обладают наиболее сильной антиоксидантной активностью среди исследованных нами объектов.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что степень экстракции полифенолов из фукуса исчезающего выше при использовании в качестве растворителя водного раствора этанола, а из сахарины японской и анфельции тобучинской — дистиллированной воды.

Антиоксидантная активность экстрактов полифенолов из исследованного сырья в значительной степени определяется температурой проведения экстракции.

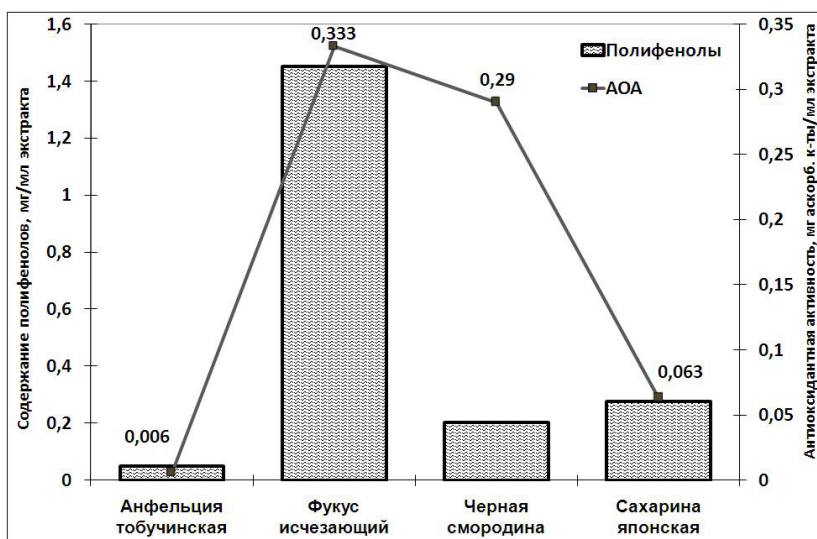


Рис. 5. Содержание суммы полифенолов и антиоксидантная активность экстрактов растительного сырья морского и наземного происхождения

Fig. 5. Total polyphenols content in the extracts from vegetal raw materials of marine and terrestrial origin and their antioxidant activity

Максимальное количество полифенолов и самая высокая антиоксидантная активность обнаружены в 50 %-ном этанольном экстракте из фукуса исчезающего.

Список литературы

- Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Сизова Л.А.** Морские водоросли — перспективный источник полифенольных антиоксидантов и комплексов эссенциальных фосфолипидов // Известия Самарского научного центра РАН. — 2012. — Т. 14, № 1(9). — С. 2299–2302.
- Auezova L., Najjar F., Selivanova O. et al.** Antioxidant activity of brown alga *Saccharina bongardiana* from Kamchatka (Pacific coast of Russia). A methodological approach // J. Appl. Phycol. — 2013. — Vol. 25, Iss. 4. — P. 1189–1196.
- Gordon M.H.** Significance of Dietary Antioxidants for Health // Int. J. Mol. Sci. — 2012. — Vol. 13, № 1. — P. 173–179.
- Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M. et al.** Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries // J. Agric. Food Chem. — 1999. — Vol. 47, № 6. — P. 2274–2279.
- Hayouni E.I.A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts // Food Chem. — 2007. — Vol. 105, Iss. 3. — P. 1126–1134.
- Koivikko R., Loponen J., Honkanen T., Jormalainen V.** Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions // J. Chem. Ecol. — 2005. — Vol. 31(1). — P. 195–212.
- Machu L., Misurcova L., Vavra Ambrozova J. et al.** Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products // Molecules. — 2015. — Vol. 20(1). — P. 1118–1133.
- Marinho-Soriano E., Fonseca P.C., Carneiro M.A.A., Moreira W.S.C.** Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds // Bioresour. Technol. — 2006. — Vol. 97(18). — P. 2402–2406.
- Movahedinia A., Heydari M.** Antioxidant activity and total phenolic content in two alga species from the Persian Gulf in Bushehr province, Iran // Int. J. Sci. Res. — 2014. — Vol. 3, Iss. 5. — P. 954–958.
- Nakamura T., Nagayama K., Uchida K., Tanaka R.** Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis* // Fish. Sci. — 1996. — Vol. 62, № 6. — P. 923–926.
- Nurul A.Z., Darah I., Shaida F.S., Nor A.** Supardy Phytochemical composition and antibacterial potential of hexane extract from Malaysian red algae, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen // World Appl. Sci. J. — 2011. — Vol. 15(4). — P. 496–501.

Shibata T., Ishimaru K., Kawaguchi S. et al. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae // J. Appl. Phycol. — 2008. — Vol. 20. — P. 705–711.

Shobharani P., Nanishankar V.H., Halami P.M., Sachindra N.M. Antioxidant and anticoagulant activity of polyphenol and polysaccharides from fermented *Sargassum* sp. // Int. J. Biol. Macromol. — 2014. — Vol. 65. — P. 542–548.

Yoon N.Y., Lee S.-H., Wijesekara I., Kim S.-K. In vitro and intracellular antioxidant activities of Brown alga *Eisenia bicyclis* // Fish. and Aquat. Sci. — 2011. — Vol. 14, Iss. 3. — P. 179–185.

Zhao Z., Yang X., Gong Z. et al. Antioxidant activities of crude phlorotannins from *Sargassum hemiphyllum* // J. Huazhong Univ. Sci. Technol. (Med. Sci.) — 2016. — Vol. 36, Iss. 3. — P. 449–455.

Поступила в редакцию 21.02.17 г.

Принята в печать 7.04.17 г.