Известия ТИНРО

2020 **Том 200, вып. 4**

ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 582.272:615.322

Е.Е. Федотова, В.П. Корчагин, Д.Д. Вингородова*
Дальневосточный федеральный университет,
690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *SARGASSUM PALLIDUM* В КАЧЕСТВЕ СЫРЬЯ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ФУКОКСАНТИНА

Показана перспективность использования бурой водоросли *Sargassum pallidum* как сырья для выделения фукоксантина. Проведены исследования по спиртовой экстракции фукоксантина из *S. pallidum* в различных условиях. Для проведения исследований использовали образцы водоросли, собранной в прибрежной зоне зал. Петра Великого. Исследования проведены на двух видах материала — замороженном и высушенном. Первоначально определяли массу сухого вещества: у замороженных водорослей 16,4 ± 1,0 %, у высушенных 93,6 ± 1,0 %. Для извлечения низкомолекулярных веществ использовали метод спиртовой экстракции. Образцы экстрагировали в течение 24 и 48 ч в темном месте этиловым спиртом разной концентрации в соотношении 1 : 10. Затем раствор фильтровали или центрифугировали. Для определения количества фукоксантина в полученном растворе использовали спектрофотометрический метод. При экстракции замороженных водорослей выход фукоксантина выше, чем при экстракции высушенных, но на экстракцию замороженных водорослей необходимо потратить больше этилового спирта, чем на экстракцию высушенных водорослей. Новизна исследования заключается в том, что для определения наиболее рациональных условий экстракции она проводилась при различных показателях температуры, концентрации экстрагента и времени проведения экстракции. В результате проведенных исследований получили приемлемые условия спиртовой экстракции фукоксантина из бурой водоросли *S. pallidum*. Экономически выгодно проводить экстракцию на высушенном образце. Время экстракции — сутки; температура +7 °С. Экстрагирование должно протекать в темноте, в холодильнике. Концентрация спирта 80 ± 2 %.

Ключевые слова: бурые водоросли, *Sargassum pallidum*, фукоксантин, экстракция, функциональные добавки.

DOI: 10.26428/1606-9919-2020-200-1008-1015.

Fedotova E.E., Korchagin V.P., Vingorodova D.D. Using of brown algae *Sargassum pallidum* as raw materials for extraction of fucoxanthin // Izv. TINRO. — 2020. — Vol. 200, Iss. 4. — P. 1008–1015.

Fucoxanthin is a widespread carotenoid contained in tissues of brown algae, known by its antitumor activity and ability to suppress cancer cells growth. Its inclusion into diet prevents accumulation of the body fat and regulates level of glucose and insulin in the blood. Fucoxanthin can be considered as a promising nutritional supplement for suppressing obesity.

* *Федотова Екатерина Евгеньевна, аспирант, e-mail: katfedotova94@gmail.com; Корчагин Владимир Павлович, кандидат биологических наук, доцент, e-mail: vladkorch@hotmail.com; Вингородова Дарья Дмитриевна, студент, e-mail: vinogradova_dd@dvfu.ru.*

Fedotova Ekaterina E., postgraduate student, Far-Eastern Federal University, 8, Sukhanov Street, Vladivostok, 690950, Russia, e-mail: katfedotova94@gmail.com; Korchagin Vladimir P., Ph.D., assistent professor, Far-Eastern Federal University, 8, Sukhanov Street, Vladivostok, 690950, Russia, e-mail: vladkorch@hotmail.com; Vingorodova Daria D., student, Far-Eastern Federal University, 8, Sukhanov Street, Vladivostok, 690950, Russia, e-mail: vinogradova_dd@dvfu.ru.

Extraction of fucoxanthin from brown algae *Sargassum pallidum* is investigated under various conditions. The samples of algae were collected in different sites at Primorye coast in 2018–2019. Two types of the preparations were used — frozen and dried. The frozen preparations were stored under temperature of –18 °C no more than 30 days. For the dried preparations, fresh algae were dried in a dark room by air fan under temperature of +18–+20 °C and then crushed to powder and stored in dark place under the same temperature no more than 6 months. Content of dry substance in the preparations was 16.4 ± 1.0 % for frozen algae and 93.6 ± 1.0 % for dried algae. Fucoxanthin was extracted from these preparations by method of alcohol extraction using the ethanol water solution in ratio of 1 : 10 during 24 hours in a dark place, then the solution was filtered or centrifuged. Concentration of fucoxanthin in the filtered solution was measured in spectrophotometer relative to a standard solution (ethanol 96 %) with wavelength of 350–800 nm. Yield of fucoxanthin was higher from the frozen preparations, but more ethanol was consumed for its extraction in comparison with extraction from the dried preparations. Besides, the dried preparations were processed during 1 day with the ethanol solution in concentration 96, 88, 84, 80, and 76 %, under various temperature. Yield of fucoxanthin decreased with temperature increasing: the optimal temperature was +7 °C, so the room temperature could not be recommended for extraction. The optimum concentration of ethanol for fucoxanthin extraction was 80 ± 2%.

Key words: brown alga, *Sargassum pallidum*, fucoxanthin, extraction, functional additive.

Введение

Фукоксантин — широко распространенный каротиноид, входящий в состав бурых водорослей. Полезные функциональные свойства фукоксантина как биологически активного вещества привлекают к нему внимание ученых. Доказана противоопухолевая активность фукоксантина, его способность к подавлению роста раковых клеток. На его основе производят ряд препаратов, которые применяют при лечении рака прямой кишки, печени и меланомы. Фукоксантин ингибирует рост *in vitro* клеток нейробластомы человека, рака предстательной железы, рака толстой кишки, лейкоза крови человека [Kim et al., 2010; Peng et al., 2011; Takaichi, 2011; Zhang et al., 2015].

В исследованиях, проводимых с бурой водорослью *Undaria pinnatifida* на жировой ткани лабораторных мышей, показано, что фукоксантин способствует сжиганию жира в клетках в белой жировой ткани за счет увеличения активности белка термогенина (UCP1). Установлено, что диета, богатая фукоксантином, способствует уменьшению накопления жировых отложений и регулирует уровень глюкозы и инсулина в крови. В некоторых работах показано, что противоопухолевое действие фукоксантина может быть обусловлено апоптогенными свойствами этого соединения [Mori et al., 2004; Maeda et al., 2005; D'Orazio et al., 2012; Gammone et al., 2015].

При изучении влияния препарата «Ксантиген», содержащего фукоксантин бурых водорослей, на массу тела женщин, содержание жира, липидов печени и биохимию крови показано, что употребление Ксантигена-600/2,4 мг (300 мг масла зерен граната + 300 мг экстракта бурой водоросли, содержащие 2,4 мг фукоксантина) в течение 16 нед приводило к статистически значимому снижению массы тела, окружности талии и содержания жира в печени [Abidov et al., 2010].

В ходе множественных исследований на крысах, получавших рацион с высоким содержанием жиров, фукоксантин способствовал снижению общего уровня холестерина и триглицеридов. Таким образом, фукоксантин может быть рассмотрен как перспективная пищевая добавка для подавления ожирения [Maeda et al., 2005; Ryabushko et al., 2014].

В Приморском крае среди бурых водорослей самой распространенной и наиболее изученной является *Saccharina* (*Laminaria*) *japonica*, которая широко используется в пищевой промышленности и медицине. В пищу и как сырье для получения лечебно-профилактических препаратов и биодобавок применяют также бурую водоросль *Sargassum pallidum*, содержащую полисахариды, обладающие иммуностимулирующей и противоопухолевой активностью [Атлас…, 2008]. В отличие от *S.* (*L.*) *japonica*, *S. pallidum* не

так широко известен, хотя находится в широком доступе и по биологической ценности не уступает *S.* (*L.*) *japonica* [Аминина, 2012].

В настоящей работе рассматривается получение эффективных способов экстракции фукоксантина из бурой водоросли *S. pallidum* для дальнейшего использованиях как функционального компонента в пищевой промышленности.

Материалы и методы

Для проведения исследований использовали бурую водоросль *S. pallidum*, собранную в прибрежной зоне зал. Петра Великого (о. Рейнеке; бухта Новик о. Русский) в весенне-летний период 2018–2019 гг. (рис. 1).

Рис. 1. Карта прибрежной зоны зал. Петра Великого (отмечены места взятия водорослей)
Fig. 1. Scheme of sampling in Peter the Great Bay

Из водорослей получали как высушенные, так и замороженные образцы. Перед заморозкой водоросли промывали от загрязнения и удаляли лишнюю влагу. Затем нарезали мелкие куски и укладывали в герметичную упаковку. Срок хранения замороженных образцов составлял не более 30 сут при температуре –18 °С. Для получения высушенного образца свежую водоросль *S. pallidum* промывали от загрязнения, сушили в темном помещении в потоке воздуха при температуре +18–20 °С в течение 5–7 сут и измельчали до порошкообразного состояния. Хранение осуществлялось при комнатной температуре в темноте не более 6 мес.

Определение сухих веществ в полученных образцах проводили при помощи прибора анализатора влажности «ЭЛВИЗ-2». Принцип работы прибора основан на термогравиметрическом экспресс-методе, когда проба высушивается инфракрасным излучением: проба помещается на взвешивающее устройство анализатора влажности, запускается режим сушки. Прибор фиксирует начальную массу пробы и непрерывно контролирует ее в процессе сушки. По окончании сушки на алфавитно-цифровой индикатор выводится результат измерения — влажность пробы в процентах.

Для получения низкомолекулярных веществ из образцов использовали метод спиртовой экстракции в различных условиях. Высушенные и замороженные образцы поделили на 2 равные части. Одну половину экстрагировали в течение 24 ч, другую — 48 ч. Экстракция проходила в темном месте в холодильнике (+7 °С). Некоторые образцы были подвергнуты экстракции при комнатной температуре (+25 °С). Экстрагентом служил этиловый спирт концентрацией 80 и 96 % в соотношении 1 : 10. Экстракты из высушенных и

замороженных образцов готовили следующим образом: в колбу с герметичной крышкой насыпали порошок образца или навеску замороженного, заливали экстрагентом, перемешивали, закрывали колбу и убирали в темное место для проведения экстракции. Полученный препарат фильтровали или центрифугировали при 4000 g 5 мин. Для определения количества фукоксантина в полученном растворе использовали спектрофотометрический метод (Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800). Отфильтрованный раствор помещали в кюветы и измеряли в спектрофотометре относительно эталонного раствора (этилового спирта 96 %). Измеряли спектр поглощения в интервале длин волн 350–800 нм. Расчет осуществляли по формуле [Narayani et al., 2016]:

$$\text{фукоксантин (мг/г)} = A470 - 1{,}239\,(A631 + A581 - 0{,}3 \times A664) - 0{,}0275 \times A664/141,$$

где А — оптическая плотность указанной длины, нм.

Результаты и их обсуждение

При сравнительном анализе двух видов материалов (замороженных и высушенных) определено содержание сухих веществ. Измерения на анализаторе влажности «ЭЛВИЗ-2» показали, что содержание сухих веществ в замороженной бурой водоросли *S. pallidum* — 16,4 ± 1,0 %, а в высушенной — 93,6 ± 1,0 %.

Высушенные и замороженные образцы были разделены на 16 частей (по 8 образцов): по 4 образца высушенных и замороженных водорослей экстрагировали 1 сут, остальные — 2 сут. Содержание низкомолекулярных веществ в полученных образцах оказалось различным для разных условий проведения эксперимента (табл. 1).

Таблица 1

Содержание фукоксантина, полученного при разных условиях экстракции, мг/г

Table 1

Content of fucoxanthin extracted in certain conditions of extraction, mg/g

Материал для экстракции (водоросли)	Время экстракции, ч							
	24				48			
	Концентрация спирта, %							
	96		80		96		80	
	Температура экстракции, °С							
	7	20	7	20	7	20	7	20
Высушенные	2,60	1,50	3,76	2,40	2,40	1,30	2,80	1,10
Замороженные	1,60	1,30	2,0	1,80	1,15	1,03	2,20	1,98

На основании полученных данных можно сделать вывод, что наибольшее количество фукоксантина присутствует в образцах, экстракцию которых проводили при следующих условиях: температура +7 °С (в холодильнике), концентрация спирта 80 ± 2 %. Эти образцы показали наиболее высокий пик фукоксантина при видимой длине волны его определения (рис. 2).

Сравнили выход фукоксантина и количество спирта, которое было затрачено в эксперименте (табл. 2). При экстракции замороженных водорослей выход фукоксантина выше, чем при экстракции высушенных бурых водорослей, но на экстракцию замороженных водорослей необходимо потратить больше этилового спирта, чем на экстракцию высушенных водорослей. Таким образом, использование высушенных бурых водорослей экономически более выгодно. Поэтому, если исходить из получения большего количества фукоксантина, то выгоднее использовать замороженные водоросли, если исходить из затрат спирта на экстракцию, то выгоднее использовать высушенные водоросли.

Для получения более точных данных была подробно рассмотрена зависимость количества выделяемого фукоксантина от концентрации спирта и температурных условий. Для этого были проведены дополнительные экстракции с разной концен-

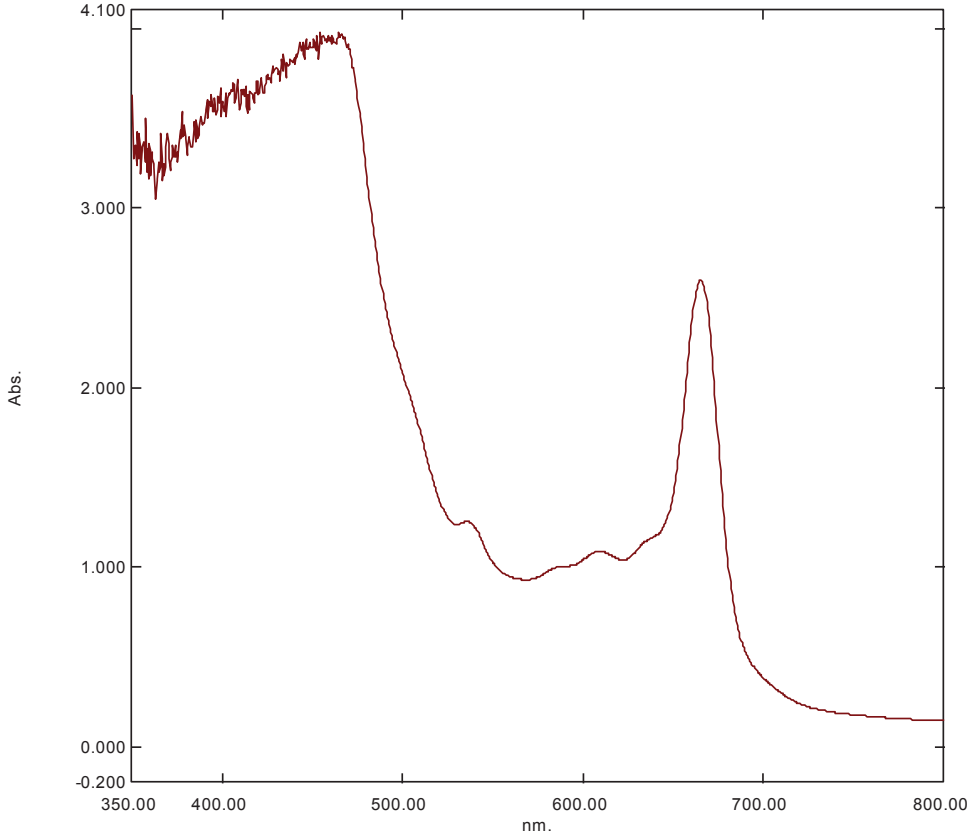

Рис. 2. Пик фукоксантина на графике, полученном при спектрофотометрическом анализе препарата экстракта из бурых водорослей *S. pallidum*

Fig. 2. Results of spectrophotometric analysis of brown algae extract

Таблица 2

Сравнительный анализ выхода фукоксантина и расхода спирта у замороженного и высушенного образцов водоросли

Table 2

Yield of extracted fucoxanthin and ethanol consumption for processing of frozen and dried preparations of brown algae

Показатель	Замороженные водоросли	Высушенные водоросли
Содержание фукоксантина на 1 г экстракта, мг	2,0	3,76
Выход фукоксантина на 100 г сухого вещества препарата, мг	12328,8	3311,9
Расход спирта (96 %) для выделения фукоксантина на 100 г сухого вещества, мл	6516,3	811,3
Расход спирта (96 %) на выход 1 г фукоксантина, мл	444,43	250,3

трацией спирта. Взяли 5 навесок высушенного образца *S. pallidum* по 10 г каждый. Их экстрагировали при рациональных условиях (1 сут, +7 °С). Концентрация спирта в экстрактах составляла 96, 88, 84, 80 и 76 %.

Лучшие показатели экстрагируемости фукоксантина проявляются при использовании этилового спирта концентрацией 80 % (рис. 3).

Для определения температурной зависимости дополнительно проведена спиртовая экстракция высушенных бурых водорослей *S. pallidum* при температуре +30 °С в течение 1 сут. Выход фукоксантина составил 2,1 мг/г.

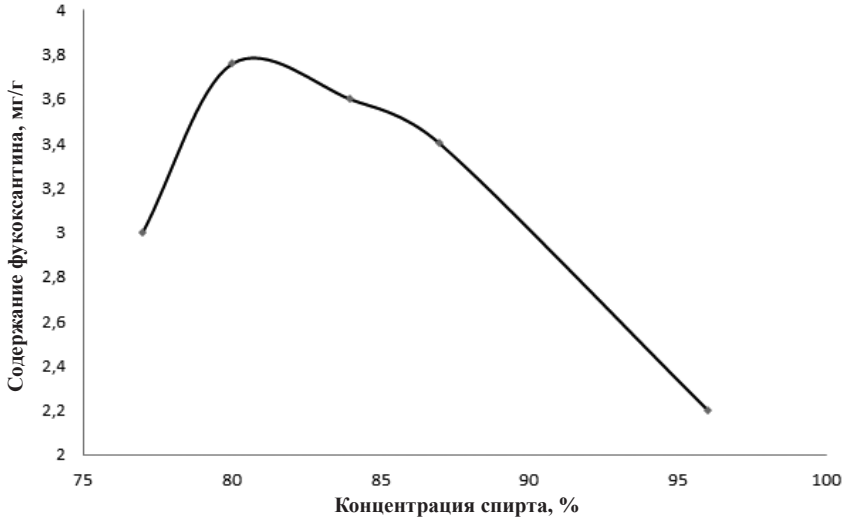

Рис. 3. Зависимость выхода фукоксантина от концентрации этилового спирта
Fig. 3. Yield of fucoxanthin extracted from brown algae with ethanol of certain concentration

Таким образом, при увеличении температуры экстракции уменьшается выход фукоксантина из образца, поэтому проводить экстракцию при температуре, близкой к комнатной и выше, нецелесообразно.

Выводы

В результате проведенных исследований получены приемлемые условия спиртовой экстракции фукоксантина из бурой водоросли *S. pallidum*. Мы считаем, что рационально проводить экстракцию из высушенной водоросли, так как ее проведение требует меньшего количества этилового спирта в отличие от экстракции замороженной. Время экстракции — сутки; температура +7 °С. Экстрагирование должно протекать в темноте, в холодильнике. Концентрация спирта 80 ± 2 %.

Благодарности

Выражаю благодарность своему научному руководителю В.П. Корчагину за ценные советы при планировании исследования и рекомендации по оформлению статьи.

Финансирование работы

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Соблюдение этических стандартов

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Информация о вкладе авторов

Концепция исследования — В.П. Корчагин; сбор и обработка материала — Д.Д. Вингородова; статистическая обработка, написание текста — Е.Е. Федотова; редактирование — Е.Е.Федотова, В.П. Корчагин.

Список литературы

Аминина Н.М. Биологическая ценность морских водорослей дальневосточного побережья // РЫБПРОМ: Технологии и оборудования для переработки водных биоресурсов. — М. : ИП Вареха Е.Ю., 2012. — № 3. — С. 32–35.

Атлас массовых видов водорослей и морских трав российского побережья Дальнего Востока / В.Д. Дзизюров, В.Н. Кулепанов, Т.В. Шапошникова и др. — Владивосток : ТИНРО-центр, 2008. — 327 с.

Abidov M., Ramazanov Z., Seifulla R., Grachev S. The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat // Diabet. Obes. Metab. — 2010. — Vol. 12(1). — P. 72–81. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2009.01132.x.

D'Orazio N., Gemello E., Gammone M.A. et al. Fucoxantin: a treasure from the sea // Mar. Drugs. — 2012. — Vol. 10(3). — P. 604–616. DOI: 10.3390/md10030604.

Gammone M.A., Riccioni G., D'Orazio N. Carotenoids: potential allies of cardiovascular health // Food & Nutr. Res. — 2015. — Vol. 59. — P. 1–11. DOI: 10.3402/fnr.v59.26762.

Kim K.N., Heo S.J., Kang S.M. et al. Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway // Toxicol. in Vitro. — 2010. — Vol. 24. — P. 1648–1654. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.05.023.

Maeda H., Hosokawa M., Sashima T. et al. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2005. — Vol. 332. — P. 392–397.

Mori K., Ooi T., Hiraoka M. et al. Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater // Mar. Drugs. — 2004. — Vol. 2(2). — P. 63–72. DOI: 10.3390/md202063.

Narayani S., Saravanan S., Bharathiraja S., Mahendran S. Extraction, partially purification and study on antioxidant property of fucoxanthin from *Sargassum cinereum* J. Agardh // Pharm. Res. — 2016. — Vol. 8(3). — P. 610–616.

Peng J., Yuan J.P., Wu C.F., Wang J.H. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health // Mar. Drugs. — 2011. — Vol. 9(10). — P. 1806–1828. DOI: 10.3390/md9101806.

Ryabushko V.I., Prazukin A.V., Popova E.V., Nekhoroshev M.V. Fucoxanthin of the brown algae *Cystoseira barbata* (Stackh.) C. Agardh from the Black Sea. J. Black Sea // Mediter. Environ. — 2014. — Vol. 20(2). — P. 108–113.

Takaichi S. Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions // Mar. Drugs. — 2011. — Vol. 9(6). — P. 1101–1118. DOI: 10.3390/md9061101.

Zhang H., Tang Y., Zhang Y. et al. Fucoxanthin: a promising medicinal and nutritional ingredient // Evidence-based complementary and alternative medicine. — 2015. DOI: 10.1155/2015/723515.

References

Aminina, N.M., Biological value of seaweed of the Far East coast, *RYBPROM: Tekhnologii i oborudovaniya dlya pererabotki vodnykh bioresursov* (RYBPROM: Technologies and equipment for the processing of aquatic biological resources), Moscow: IP Varekha E.Yu., 2012, no. 3, pp. 32–35.

Dzizyurov, V.D., Kulepanov, V.N., Shaposhnikova, T.V., Sukhoveeva, M.V., Gusarova, I.S., and Ivanova, N.V., *Atlas massovykh vidov vodorosley i morskikh trav rossiyskogo poberezh'ya Dal'nego Vostoka* (Atlas of mass species of algae and sea grasses of the Russian coast of the Far East), Vladivostok: TINRO-tsentr, 2008.

Abidov, M., Ramazanov, Z., Seifulla, R., and Grachev, S., The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat, *Diabet. Obes. Metab.*, 2010, vol. 12, no. 1, pp. 72–81. doi 10.1111/j.1463-1326.2009.01132.x

D'Orazio, N., Gemello, E., Gammone, M.A., de Girolamo, M., Ficoneri, C., and Riccioni, G., Fucoxantin: a treasure from the sea, *Mar. Drugs,* 2012, vol. 10, no. 3, pp. 604–616. doi 10.3390/md10030604

Gammone, M.A., Riccioni, G., and D'Orazio, N., Carotenoids: potential allies of cardiovascular health, *Food & Nutr. Res.,* 2015, vol. 59, pp. 1–11. doi 10.3402/fnr.v59.26762

Kim, K.N., Heo, S.J., Kang, S.M., Ahn, G., and Jeon, Y.J., Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway, *Toxicol. in Vitro*, 2010, vol. 24, pp. 1648–1654. doi 10.1016/j.tiv.2010.05.023

Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., and Miyashita, K., Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, vol. 332, pp. 392–397.

Mori, K., Ooi, T., Hiraoka, M., Oka, N., Hamada, H., Tamura, M., and Kusumi, T., Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater, *Mar. Drugs*, 2004, vol. 2, no. 2, pp. 63–72. doi: 10.3390/md202063

Narayani, S., Saravanan, S., Bharathiraja, S., and Mahendran, S., Extraction, partially purification and study on antioxidant property of fucoxanthin from *Sargassum cinereum* J. Agardh, *Pharm. Res.*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 610–616.

Peng, J., Yuan, J.P., Wu, C.F., and Wang, J.H., Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health, *Mar. Drugs*, 2011, vol. 9, no. 10, pp. 1806–1828. doi 10.3390/md9101806

Ryabushko, V.I., Prazukin, A.V., Popova, E.V., and Nekhoroshev, M.V., Fucoxanthin of the brown algae *Cystoseira barbata* (Stackh.) C. Agardh from the Black Sea. J. Black Sea, *Mediter. Environ.,* 2014, vol. 20, no. 2, pp. 108–113.

Takaichi, S., Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions, *Mar. Drugs*, 2011, vol. 9, no. 6, pp. 1101–1118. doi 10.3390/md9061101

Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C., and Liu, Z., Fucoxanthin: a promising medicinal and nutritional ingredient, *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015. doi 10.1155/2015/723515

Поступила в редакцию 10.06.2020 г.

После доработки 17.08.2020 г.

Принята к публикации 20.08.2020 г.