

7. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия /под ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб.: СпецЛит, 2004. – 289 с.
8. Журинов М.Ж. Химия эфедриновых алкалоидов. – Алма-Ата: Наука, 1990. – 140 с.
9. Бузук Г.Б., Ловкова М.Я. Метаболизм алкалоидов: регуляция на молекулярном уровне, пространственная организация // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31. – С. 467–479.



УДК 547.995.12+632.995+582.28

Г.В. Кашина, В.Г. Шелепов, А.И. Машанов

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАЧКА ГАММАРУСА (GAMMARUS LACUSTIS)

В статье рассматривается применение новой технологии переработки ракка гаммаруса, которая позволяет получать биологически активные вещества с заданной функцией с целью использования их в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве.

Ключевые слова: ракок гаммарус, биологически активные вещества, каротин, астаксантин, липидный комплекс, хитин, хитозан.

G.V. Kashina, V.G. Shelepor, A.I. Mashanov

BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVES ON THE BASIS OF THE GAMMARUS CRAYFISH (GAMMARUS LACUSTIS) PROCESSING PRODUCTS

The application of the new technologies for Gammarus crayfish processing that allows to obtain biologically active substances with the given function for the purpose of their use in the food industry, medicine and agriculture is considered in the article.

Key words: Gammarus crayfish, biologically active substances, carotene, astaxanthin, lipidic complex, chitin, chitosan.

Введение. Одним из перспективных направлений в биотехнологии является выделение биологически активных веществ из гидробионтов, содержащих широкий спектр уникальных компонентов с ценными свойствами. Основными объектами для получения комплекса нутриентов, используемых в пищевой и кормовой продукции, являются промысловые и культивируемые морские и пресноводные ракообразные: крабы, креветки, ракчи, криль и др.

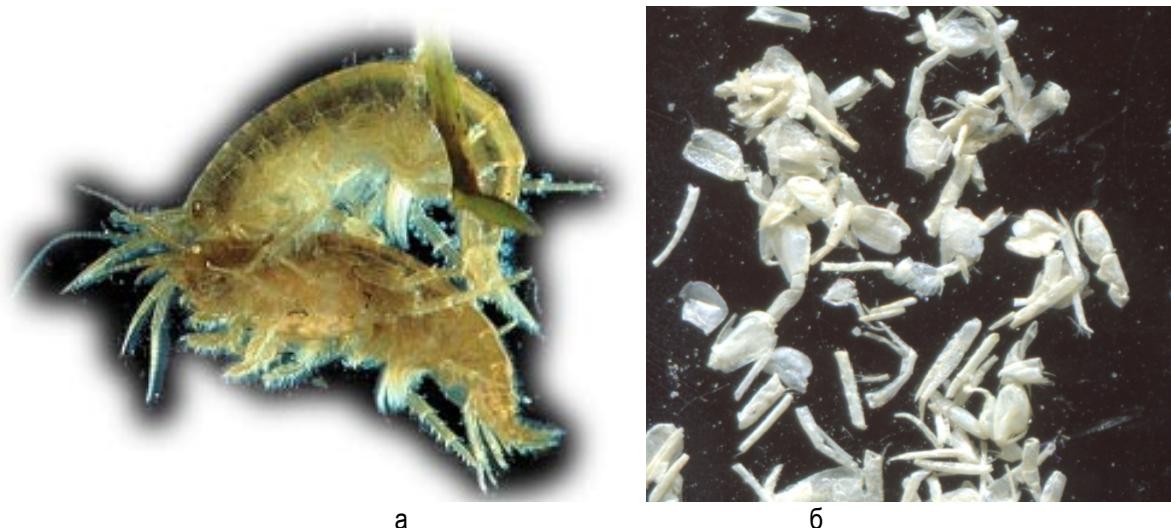
В реках и озерах Алтайского края и в целом в Западной Сибири значительный резерв сырья для получения хитозана представляют запасы озерного рака-бокоплава гаммарус (*Gammarus lacustris*).

Популяции рака гаммаруса, обитающего в пресноводных озерах Западной Сибири, отличаются от популяций других регионов более крупным размером, высокой питательной ценностью и повышенным содержанием каротиноидов [1]. Основное направление промысла гаммаруса связано с реализацией его на рыборазводящие заводы в качестве корма для рыб.

В наших исследованиях был использован отсев рака после его подработки, который представлен большей частью сегментальными частями тела рака.

Высокое содержание (20–30 %) панциря и его малая толщина облегчают процесс диспергирования гаммаруса, необходимого при всех способах получения БАВ и как перспективное вспомогательное вещество для производства лекарственных препаратов, что и определило направление наших исследований.

Размеры фрагментов отсев рака гаммаруса, получаемого при его подработке для реализации, составляют от 0,5 до 5–7 мм (рис.).



Вид раков гаммаруса (а) с фрагментами отсева (б)

Возможности варьирования свойств полимеров хитозана и создания на их основе иммобилизованных соединений позволяют разрабатывать препараты с регулируемым высвобождением биологически активных веществ. Особенно актуально использование в этом направлении гидрофильных набухающих полимеров, обладающих не только формообразующей способностью, но и спектром функциональных свойств и высокой биосовместимостью с тканями макроорганизма, таких, как полисахариды и аминополисахариды, к которым относятся хитин и хитозан.

Хитозан – поли-(1-4)-2-амино-2-дезокси- β -D-глюкоза получают при удалении ацетильной группы из положения C2 в хитине в результате обработки его в жестких условиях раствором щелочи. Появление в каждом элементарном звене макромолекулы свободной аминогруппы придает хитозану свойства полиэлектролита, одним из которых является характерный для растворов полиэлектролитов эффект полиэлектролитного набухания – аномального повышения вязкости разбавленных растворов при уменьшении концентрации полимера [1, 3].

Физико-химические и биологические свойства данного полимера и публикуемые результаты клинического применения позволяют рассматривать хитозан и его производные перспективными веществами для получения лекарственных препаратов с различным фармакотерапевтическим действием.

Цель исследований. Получение хитозана из гаммаруса и определение его физико-химических и технологических свойств для определения направлений использования в бионанотехнологии получения БАВ.

Материалы и методы исследований. Хитозан получали из рака гаммаруса методом дезацетилирования хитина согласно общепринятой методике. Спектрофотометрию в инфракрасной области проводили в лаборатории Новосибирского центра контроля качества и сертификации ЛС на ИК-Фурье спектрометре «Infracum FT-801». Подготовку образцов для исследования проводили по методике ОФС 42-0043-07 ГФ XII изд. Результаты исследований обрабатывали с использованием программы «ZaIR» для «Windows». Элементный состав (CHN) хитозана гаммаруса определяли по газообразным продуктам сгорания на хроматографе Thermo-Electron с программным обеспечением Eager 300, преобразующим результаты в процентное содержание азота, углерода и водорода в образце.

Степень дезацетилирования хитозана устанавливали колориметрическим способом, основанном на определении оптической плотности растворов нингидрина, в который вносили навески хитозана от 4 до 10 мг.

Вязкость растворов хитозана устанавливали вискозиметрически согласно методике, описанной в ОФС 42-0038-07 [4]. Определение характеристической вязкости образцов хитозана позволило рассчитать среднюю молекулярную массу по уравнению: $[\eta] = 1,38 \cdot 10^{-4} M_w^{0,85}$.

Определение остаточного белка в хитозане проводили по методике ОФС 42-0053-07 ГФ XII, ч. 1 «Определение белка колориметрическим методом с биуретовым реагентом».

Удельную поверхность хитозана устанавливали по методике, согласно которой величина адсорбции 45 мг метиленового синего соответствует примерно 700 м² поверхности.

Технологические свойства хитозана определяли по стандартным методикам. Ситовой анализ проводили по ОФС 42-0136-09, ГФ XII, ч. 2, используя набор сит с величиной отверстия 7,1; 5,6; 5,0; 4,5; 3,5; 3,0;

2,5; 1,0; 0,25 мм. Влагосодержание полимера определяли по ОФС 42-0087-08 «Потеря в массе при высушивании». Сыпучесть хитозана оценивали на приборе ВП-12А. Насыпной объем порошков определяли по методике ОФС 42-0137-09 на вибрационном уплотнителе порошков модели 545р-АК-3 ЖЗТО.

Результаты исследований и их обсуждение. Рачок гаммарус содержит до 7 % хитина, который выделяли путем последовательной обработки сырья 6 % раствором пероксида водорода, раствором хлороводородной кислоты 0,7 моль/л, раствором натрия гидроксида 0,175 моль/л. Каждую стадию сопровождали промыванием сырья до нейтральной реакции промывных вод ($\text{pH} = 7$). Выделенный хитин промывали этианолом и ацетоном под вакуумом до полного извлечения пигментов и высушивали. Затем проводили дезацетилирование хитина натрия гидроксида раствором 50 % при температуре 120–130°C в течение 1 ч в инертной среде. Для окончательной очистки хитозан промывали этианолом и ацетоном, высушивали на воздухе. Из 400 г исходного сырья (гаммарус) получили 25,13 г хитина, а после дезацетилирования 16,4 г хитозана. Выход хитозана по хитину составил 80,8 % от теоретического.

Хитозан, полученный из гаммаруса, представлял собой светло-желтый мелкий порошок без запаха, нерастворимый в воде очищенной, и натрия гидроксида растворе 10 %, частично набухающий в названных растворителях с образованием на поверхности частиц полимера гелеобразной оболочки. Образец хитозана гаммаруса растворим в минеральных кислотах, легко растворим в органических кислотах.

Идентификация хитозана гаммаруса проведена по элементному составу и ИК-спектрам. Элементный анализ (табл.) показал, что для хитозана, выделенного из рачка гаммарус, характерно такое же соотношение углерода, водорода и азота, как и для хитозана из краба камчатского, и оно близко к вычисленному по формуле хитозана соотношению названных элементов. Как известно, хитозан из морских ракообразных отличается от хитина более низким содержанием углерода и более высоким содержанием азота (в хитине содержание углерода составляет 48,4 %, водорода – 6,9, азота – 6,5 %), данная особенность наблюдается и в хитозане из гаммаруса.

Содержание углерода, водорода и азота в хитозане

Источник хитозана	Элементарный состав, %		
	Углерод	Водород	Азот
Краб камчатский	43,7	6,4	7,4
Рачок гаммарус	43,8	6,3	7,3
Расчет по формуле	44,7	6,9	8,7

Исследования химического состава гаммаруса цельного сушеного показали, что в его состав входит 48 % белка, 4,5 % липидов и 4 % хитина. В наших экспериментах в качестве объекта исследований были использованы отсевы рачка гаммаруса (*Cammarus lfcustris*), полученные в результате переработки рачка на корм, очищенные от механических примесей.

С целью выделения из гаммаруса липидов, кератиноидов, белкового гидролизата и хитин/хитозанового комплекса сырье помещали в контейнер-фильтр из мелкопористой ткани и проводили его поэтапную обработку. На первом этапе сырье подвергали обработке 65–70 % раствором этилового спирта при температуре 20–30 °C в течение 4–6 ч, в соотношении сырье/экстрагент 1:8 с одновременным воздействием ультразвука с частотой 27–40 кГц. По истечении времени экстракции контейнер-фильтр помещали в центрифугу и для отделения кератиноидно-липидного комплекса (КЛК).

Сырье промывали в проточной воде и отжимали в центрифуге. Выход КЛК составлял до 10 % по отношению к навеске сухого гаммаруса. Оранжево-красный цвет раствору липидов гаммаруса придает присутствие в них каротиноида – астаксантина, содержание которого определено спектрофотометрическим методом, основанным на том, что кератиноиды имеют максимумы поглощения в ультрафиолетовом спектре.

Длина волны, соответствующая максимуму поглощения, определяется природой каротиноида и свойствами растворителя. Раствор астаксантина в хлороформе имеет максимум поглощения при длине волны 490 нм.

Выход КЛК составил в пределах от 10 до 12 % по отношению к навеске сухого гаммаруса, количество астаксантина в липидной части в свою очередь равнялось 0,85–1,0 мг/100 г.

Астаксантин применяется как антиоксидант в биологически активных добавках (БАД), а также используется владельцами рыбных ферм и производителями кормов для повышения яркости окраса аквариумных рыб для придания их мясу более «благородного» оттенка.

Результаты анализа жирно-кислотного состава КЛК показали, что количество полиненасыщенных жирных кислот в них составляет около 35 % от общего содержания липидов. В КЛК содержатся эссенциальные (20 %), а также эйкозапентаеновая (9 %) и докозагексаеновая (2,5 %) жирные кислоты.

Известно, что полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) играют одну из основных ролей в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний, в стабилизации клеточных мембран и повышении иммунитета, кроме того, ПНЖК семейства ω -3 способны подавлять активность одного из ключевых ферментов синтеза холестерина [4]. Эссенциальные жирные кислоты (линолевая, линоленовая и арахидоновая), относящиеся к семейству ω -6, крайне важны для обеспечения оптимального функционирования метаболических процессов в организме.

Таким образом, высокая физиологическая активность КЛК гаммаруса свидетельствует о перспективности получения на его основе БАД к пище гипохолестеринемического, антиоксидантного и общеукрепляющего действия для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Для получения белкового гидролизата сырьё подвергается автоферментативному депротеинированию в водной среде с добавлением папаина. Очищенный белковый гидролизат концентрировали и высушивали.

Выход сухого гидролизата из гаммаруса составил около 15 % по отношению к навеске сухого гаммаруса. Сухой гидролизат, представляющий собой порошок светло-кремового цвета, полностью растворимый в воде, со слабым специфическим запахом гаммаруса. В сухом веществе содержится белка 70–75 %, липидов – 2–2,5, углеводов – 4–4,5 %, минеральных веществ – до 10 %. Также в ферментативном гидролизате из гаммаруса присутствует полный набор аминокислот: незаменимые аминокислоты составляют 20–25 г/кг, заменимые аминокислоты – 25–28, свободные аминокислоты 15–17 г/кг.

На последующих этапах сырье в контейнер-фильтре подвергали автоферментативному депротеинированию в водной среде и ингибиции 2–5 % раствором перекиси водорода (H_2O_2) в течение 4 ч. При этом сырье одновременно подвергается обеззараживанию, отбеливанию и дезодорированию. На заключительном этапе сырье подвергали окончательному депротеинированию и обезжириванию 10 % раствором карбоната натрия (Na_2CO_3) при температуре раствора 80–85°C, в соотношении сырье/экстрагент 1:10 в течение 1 ч с одновременным воздействием ультразвука с частотой 27–40 кГц. Продукт процеживали промывали, в токе воды до обесцвечивания отжимали на центрифуге и контейнер-фильтр сушили в потоке воздуха с температурой 30–40°C.

Заключение. Таким образом, комплексная переработка позволила получить каротиноидно-липидный комплекс (10–12 %), белковый гидролизат (10–15 %), комплекс хитин/хитозана (4–10 %) – важных компонентов при производстве продуктов питания, биологически активных добавок, лекарственных и косметических средств.

Важным технологическим элементом при производстве комплексов биологически активных веществ заключается в том, что на всех этапах переработки сырья оно находилось в фильтр-контейнерах, что позволяет сократить потери сырья, снизить затраты труда и повысить выход действующих веществ.

Литература

1. Быков В.П. Справочник по химическому составу и технологическим свойствам водорослей, беспозвоночных и морских млекопитающих. – М.: ВНИРО, 1999. – С. 118–119.
2. Определение общих допустимых уловов (ОДУ) амфиоподы *Gammarus Lacustris* /Л.И Литвиненко., А.И. Литвиненко, О.В. Козлов [и др.]: метод. указания. – Тюмень: Госрыбцентр, 2004. – 18 с.
3. Лукин А.Ю. Пресноводная аквакультура: состояние, тенденции и перспективы развития: тез. докл. науч.-практ. конф. – Тюмень: ФГУП «Госрыбцентр», 2008. – С. 75–76.
4. Ржавская Ф.М., Меняева Т.М. Экология моря. – Севастополь: ИНБЮМ, 2003. – Вып. 64. – С. 62–64.