



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008107376/13, 26.02.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.02.2008

(45) Опубликовано: 10.07.2009 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2205019 C1, 27.05.2003. RU 2132622
C1, 10.07.1999. RU 2240816 C1, 27.11.2004.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-т 100-лет
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Герасименко Наталья Ивановна (RU),
Шевченко Наталья Михайловна (RU),
Звягинцева Татьяна Николаевна (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

**ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)**

(54) СПОСОБ ПЕРЕРАБОТКИ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к технологии переработки бурых водорослей. Сырые или замороженные водоросли подвергают гидролизу водным раствором соляной кислоты, экстракт сливают и направляют на извлечение водорастворимых полисахаридов осаждением их этиловым спиртом. Остаток экстрагируют 96% этиловым спиртом для получения смеси, включающей целевые продукты, полученный спиртовой экстракт концентрируют и из концентрата гексановым растворителем извлекают смесь свободных жирных кислот, стеринов, производных пигментов, после чего дихлорметаном или хлороформом извлекают смесь полифенольных соединений и пигментов. С помощью колоночной хроматографии на силикагеле под пониженным давлением выделяют целевые

продукты высокой степени чистоты: свободные жирные кислоты, стерины, производные хлорофиллов и каротиноидов выделяют гексановым экстрактом. Для получения очищенного комплекса полифенольных соединений используют дихлорметановый или хлороформенный экстракт. Водоросль, оставшуюся после спиртовой экстракции, сушат на воздухе и используют для выделения солей альгиновых кислот. Изобретение позволяет получать из одного сырьевого источника разные по химической природе биологически активные вещества высокой степени чистоты: свободные жирные кислоты, полифенольные соединения, стерины, производные пигментов, водорастворимые полисахариды, соли альгиновых кислот с высокими выходами. 1 з.п. ф-лы.

RU 2 360 545 C1

RU 2 360 545 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2008107376/13, 26.02.2008**(24) Effective date for property rights:
26.02.2008(45) Date of publication: **10.07.2009 Bull. 19**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-t 100-let Vladivostoku,
159, Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj
khimii DVO RAN, zav. patentnym otdelom N.I.
Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Gerasimenko Natal'ja Ivanovna (RU),
Shevchenko Natal'ja Mihajlovna (RU),
Zvjagintseva Tat'jana Nikolaevna (RU),
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIJ INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KhIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh
DVO RAN) (RU)**

(54) KELP PROCESSING METHOD

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: invention relates to technology of kelp processing. Raw or frozen kelp is hydrolysed by hydrochloric acid water solution, extract is drained off and put to water-soluble polysaccharides extraction by ethanol sedimentation. The rest is extracted by 96% ethanol to obtain mixture, containing end products, obtained spirit extract is concentrated. Mixture of free fatty acids, sterine, derivate colourants is extracted from concentrate by hexane solvent. After that mixture of polyphenol compounds and colourants is extracted by dichloromethane or chloroform. High purity end

products are extracted on silica gel at lowered pressure with help of column chromatography. Free fatty acids, sterols, chlorophyllous and carotinoid derivates are extracted by hexane extract. Dichloromethane or chloroform extract are used for producing fine complex of polyphenol compounds. Kelp left after spirit extraction is dried on air and used for alginic acids salts producing.

EFFECT: invention allows to obtain chemically different high purity biologically active substances free fatty acids, polyphenol compounds, sterols, colourants derivates, water-soluble polysaccharides, alginic acids salts with high yields.

2 cl, 7 ex

Изобретение относится к технологии переработки морских бурых водорослей семейства Ламинариевые (сем. Laminariaceae) с получением из них разных по химической природе биологически активных веществ и прежде всего свободных жирных кислот и полифенольных соединений, а также фитостеринов, водорастворимых полисахаридов, солей альгиновых кислот.

Актуальность задачи получения указанных выше биологически активных веществ обусловлена следующими причинами.

Жирные кислоты, особенно полиеновые (полиненасыщенные, ПНЖК), необходимы для развития и нормального функционирования мозга, зрительной системы, кожи. Высокое потребление в пищевом рационе полиеновых жирных кислот обеспечивает снижение сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний, воздействует на процессы, связанные с человеческим ростом, репродукцией, врожденным и приобретенным иммунитетом. Полиеновые жирные кислоты обладают антиканцерогенной, противоопухолевой, антиметастатической активностями (Noda H., et al., Hydrobiologia, 1990, 204/205, 577-584; Vries C.E. de Norden C.J. van. Anticancer Res., 1992, 12, 1513-1522; Sukenik A., et al., Ann. Nutr. Metab., 1994, 38, 85-96; Roberts D.D., et al., Arch. Biochem. Biophys., 1998, 267, 405-415), антитромботической и антиаритмической активностями (Carroll D.N., et al., Ann. Pharmacotherapy, 2002, 36, 1950-1956).

В настоящее время созданы препараты, содержащие от 30% до 45% ПНЖК ω 3 серии: Омега-3 (США), МахЕРА (Франция), Эйконол (Россия) и Теком (Украина). Экспериментальные и клинические исследования выявили у препаратов значительные гиполипидемические, фибринолитические, антиагрегантные, гипокоагулирующие и иммуномодулирующие свойства, объясняемые высоким содержанием ПНЖК ω 3 серии. Установлены протективные свойства препаратов в отношении воспалительных и фибротических процессов в легких, стимулировании фагоцитоза (Путинцева Н.В. Украинский пульмонологический журнал, 2003, 4, 56-58).

ПНЖК находят применение в препаратах, применяемых в терапии воспалений, таких как ревматоидный артрит, остеоартрит, слабоумие, включая болезнь Альцгеймера. ПНЖК, выделенные из водорослей, рассматривают как перспективные гепатопротекторы и антиоксиданты. Введение ПНЖК в состав препаратов способствует восстановлению функции печени и повышает резистентность клеток печени к воздействию повреждающих агентов (Назарчук Ю.С. и др. V Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. 2002, Киев).

Оптимальным соотношением ПНЖК ω 3 серии и ω 6 серии считается соотношение их в диапазоне 4:1-1:1. Между тем современная пища содержит избыток полиеновых кислот ω 6, ω 9 серий из-за потребления мяса, майонеза, яиц, растительных масел. Недостаток жирных кислот ω 3 серии, которые содержатся преимущественно в рыбе, морских беспозвоночных, орехах, льняном, соевом, кунжутном маслах, происходит из-за бедности нашего ежедневного рациона этими продуктами. Поэтому производство препаратов, содержащих ПНЖК ω 3 серии, не теряет своей актуальности. Водоросли могут быть более полным и более концентрированным источником ПНЖК, чем рыбные жиры. В этом плане определенный интерес представляют ламинариевые водоросли. Главными по количеству жирными кислотами в ламинариевых водорослях дальневосточных морей являются 16:0, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3, 18:4 ω 3, 20:4 ω 6, 20:5 ω 3. Доля ПНЖК ω 3 серии колеблется от 13,6 до 60,0%, доля ПНЖК ω 6 серии от 14,5 до 28,0% от суммы жирных кислот в зависимости от времени, места сбора и возраста

водорослей. Следует отметить, что морские водоросли не так уж богаты липидами (0,1-2,2% от сырого веса, или, как указывает ряд авторов, липиды составляют 0,4-4,8% от сухой массы водоросли). Однако огромные запасы водорослей, возможность их комплексной переработки компенсирует этот недостаток и позволяет рассматривать водоросли в качестве потенциального источника липидов и жирных кислот, в составе которых ПНЖК занимают значительную часть.

Увеличение использования ПНЖК фармацевтическими компаниями в составе рецептур различных препаратов и возросший спрос на такие препараты ставит задачу увеличения объемов производства ПНЖК из альтернативного сырья, включая водоросли, в дополнение к рыбным жирам и растительным маслам.

Не менее важными, чем ПНЖК, органическими соединениями бурых водорослей являются полифенольные соединения. Как показывают некоторые авторы (Ragan M.A., et al., Prog. Phycol. Res, 1986, 4, 129-241; Zhang J., et al., Applied Phycology, 2006, 18, 445-450), полифенольные соединения могут составлять 0,3-38,0% в спиртовых экстрактах бурых водорослей. Эти вещества действуют как защитные агенты против морских травоядных, патогенных организмов, эпифитов, ультрафиолета.

Полифенольные соединения проявляют антибактериальную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий, что показывает потенциальную возможность их применения в пищевой промышленности и медицине. Обладая антиоксидантной активностью, полифенольные соединения могут заменить синтетические антиоксиданты. Полифенольные соединения ингибируют активность фермента гуалуронидазы, которая включается в аллергические процессы, распространение рака и воспалительные процессы (Cerantola S., et al., Botanica marina, 2006, 49, 347-351). Имеются сообщения о противотромбозном и фунгицидном действиях полифенольных соединений (Способ переработки бурых водорослей. №2132622. 1999.07.10, А23L 1/0532, А61К 35/80, Некрасова В.Б., Никитина Т.В., Курныгина В.Т., Белозерских О.А.).

Полисахариды бурых водорослей обладают различными биологически активными свойствами: противоопухолевыми, антикоагулянтными, противовирусными и др. (Т.Н.Звягинцева et al. СВР. Part C.126. 2000, 209-215; RU 2304443 C1, 20.08.2007; RU 2247574 C1, 10.03.2005).

Наибольший интерес представляют следующие способы переработки водорослей с получением разнообразных по химической природе биологически активных веществ.

Известен способ получения биологически активных веществ из беломорской ламинарии, в соответствии с которым из водоросли получают несколько биологически активных веществ - маннит, водорастворимый полисахаридный комплекс, альгинат натрия (RU 2028153 C1, 09.02.1995). Однако известный способ не позволяет получать такие ценные вещества, как липиды, включающие в свой состав не менее ценные жирные кислоты.

Известен способ комплексной переработки бурых водорослей, включающий получение из высушенных и измельченных водорослей маннита, экстракцию его 0,8-1,2% водным раствором минеральной кислоты с последующей многостадийной очисткой маннитного экстракта оксидом или гидроксидом кальция, его кристаллизацию, очистку спиртом, повторную кристаллизацию маннита (RU 2070808 C1, 27.12.1996). После экстракции маннита из остатка промытой питьевой водой водоросли экстрагируют альгинат натрия при pH 8,8-9,6 и альгинат кальция добавлением раствора, содержащего ионы кальция. Гель альгината кальция обрабатывают раствором соляной кислоты для получения альгиновой кислоты и

затем ее одновалентных солей, кислой кальциевой соли альгиновой кислоты. Остаток водоросли после нейтрализации прессуют, гранулируют и высушивают для использования в качестве кормовой добавки.

Однако способ, несмотря на использование многократных процедур извлечения и очистки, направлен на получение только маннита и солей альгиновой кислоты, и не затрагивает получения других ценных биологически активных веществ, содержащихся в конкретных видах водорослей, в частности липидов или жирных кислот, водорастворимых полисахаридов.

Известен способ получения биологически активных веществ из ламинарии, заключающийся в обезжиривании водоросли хлороформом с последующей экстракцией ее этанолом, горячей водой и раствором карбоната натрия для получения маннита, суммарного полисахарида-белкового комплекса и альгината натрия (RU 2194525 C1, 20.12.2002).

Однако в указанном способе производится обезжиривание водоросли хлороформом, при этом теряются ценные вещества - липиды.

Известен способ комплексной переработки бурых водорослей с получением йододержащих и полисахаридных продуктов, который предусматривает экстракцию измельченных водорослей 65-75% раствором этанола при температуре 50-60°C в течение 1,5-2,5 часов, концентрирование водно-спиртового экстракта с получением водно-липидной эмульсии, которую охлаждают, разделяют на водную и липидную фракции для получения из водной фракции йодсодержащего минерально-маннитного комплекса, а из липидной фракции - йодсодержащего липидного комплекса (RU 2233104 C1, 27.07.2004). Водорослевый остаток используют для получения фукоидана, альгилозы кальция и/или альгилозы натрия, альгиновой кислоты.

Однако в указанном способе, получая широкий спектр биологически активных веществ, использование липидной части водоросли ограничивают использованием ее как источника йода, а не в качестве источника жирных кислот.

Известен способ переработки бурых водорослей с получением липидного концентрата фукуса (RU 2165720, C2, 27.04.2001) путем экстракции водорослей органическим растворителем с количеством углеродных атомов от 1 до 6. Липидный концентрат фукуса содержит в эмульгированной форме воду, водорастворимые аминокислоты, белки, полисахариды, сахара, а также богатый набор эфиров жирных кислот, включая $\omega 3$ типа, производные хлорофилла, стерины, микро- и макроэлементы. Липидный концентрат и продукт, производимый из него, - концентрат фукуса омыленный, где жирные кислоты составляют 10-70%, пигменты - 20-10000 мг%, сахара - 0,1-15%, йод 80-30000 мкг/г, стерины фукуса - 1-4%, зольные вещества - 3-30%, используются в качестве БАД и в составе различных БАД.

Однако и в указанном способе речь идет о процессе омыления липидов после их предварительного выделения из водорослей в составе сложной смеси. В процессе омыления липидсодержащей смеси водным раствором щелочи получают сумму жирных кислот в виде мыл, которые используют для производства конкретного БАД.

Известен способ комплексной переработки бурых водорослей с получением индивидуальных препаратов кислых и нейтральных полисахаридов (ламинараны, фукоиданы, полиманнуроновые кислоты) и концентрата низкомолекулярных биологически активных веществ, рекомендуемых для использования в парфюмерно-косметической промышленности (RU 2240816 C1, 27.11.2004). Изобретение направлено на получение индивидуальных препаратов полисахаридов со стандартными характеристиками, состав липидной части не характеризуется.

Упоминается лишь возможность использования его в парфюмерно-косметической промышленности.

Известен способ переработки бурых водорослей, а именно воздушно-сухой ламинарии и воздушно-сухого фукуса пузырчатого, для получения липидных и водорастворимых концентратов из этих водорослей (RU 2132622 C1, 07.10.1999). Липидный концентрат, получаемый из измельченных воздушно-сухих водорослей путем их экстракции органическим растворителем с числом атомов углерода от 1 до 6 и при температуре кипения растворителя при соотношении сырье - экстрагент 1:1-1:20, содержит практически всю липидную часть исходной водоросли, включая жирные кислоты $\omega 3$ серии, а также стерины, пигменты, жирорастворимые витамины, маннит, незаменимые аминокислоты и белки, микроэлементы. В липидном концентрате из фукуса дополнительно к ним содержатся полифенолы и фукоидан. В другом продукте, выделяемом из водорослей, - водорастворимом концентрате содержатся водорастворимые белки, маннит, полисахариды, витамины и микроэлементы. Как указывают авторы, концентрат ламинарии липидный следует использовать для производства концентрата ламинарии омыленного, который применяют в качестве субстанции лечебно-профилактической добавки «Кламин», обладающей онкопрофилактическим и радиопротекторным действием.

Однако в указанном способе ставится задача получения концентрата, содержащего липиды в составе сложной смеси, которую авторы предлагают использовать для производства другого продукта - концентрата ламинарии омыленного. Следует указать, что, применяя процедуру омыления липидов, авторы получают соли жирных кислот (мыло) в составе сложной смеси. Однако при производстве продукции, в том числе и БАД, предлагаемой разработчиками, регламентируются уровни суточного потребления жирных кислот, а не их солей (мыл).

В качестве прототипа выбран способ переработки бурых водорослей с получением лекарственного средства «Мамоклам», описанный в патенте (RU 2205019, C1, 27.05.2003). Средство получают из слоевищ, ризоидов и черенков ламинарии сахаристой и ламинарии японской, а также других видов семейства ламинариевых. Способ включает процедуру, по которой сначала получают липиды путем экстракции их из водоросли органическим растворителем с количеством углеродных атомов от 1 до 6. Липидную фракцию - концентрат ламинарии - после полной отгонки растворителя гидролизуют раствором гидроокиси натрия или другого щелочного реагента для получения концентрата ламинарии омыленного, в состав которого входят такие компоненты, как полиеновые жирные кислоты $\omega 3$ и $\omega 6$ серий, органически связанный с аминокислотами йод и другие минералы, производные хлорофилла, полисахариды - ламинаран, фукоидан. Главными действующими веществами в концентрате ламинарии и концентрате ламинарии омыленном, как указывают авторы, являются полиеновые жирные кислоты, йод, полисахариды ламинаран и фукоидан. Оба продукта - липидный концентрат и липидный концентрат омыленный используются в качестве субстанции для производства лекарственного препарата «Мамоклам».

Однако в указанном способе для получения веществ, аналогичных в заявляемом нами способе, вначале проводится процедура выделения органическими растворителями сложной смеси, содержащей липиды, затем липидную смесь после отгонки растворителя гидролизуют раствором гидроокиси натрия для получения жирных кислот. Следует указать, что при использовании водного раствора гидроокиси натрия авторы получают соли (мыла) жирных кислот. При производстве

продукции, в том числе и БАД, регламентируются уровни суточного потребления жирных кислот, а не их солей (мыл). Кроме того, известный способ не обеспечивает получения полифенольных соединений, фитостеринов, водорастворимых полисахаридов, солей альгиновых кислот.

5 Все указанные выше способы переработки водорослей представляют несомненный интерес и приводят к получению сложных смесей, включающих липиды или соли (мыла) жирных кислот. Эти сложные смеси показали положительный эффект при применении в составе конкретных препаратов. Однако для промышленного
10 производства разнообразных препаратов на основе биологически активных веществ водорослей требуются продукты со стандартными характеристиками для обеспечения дозирования веществ в составе препаратов в соответствии с суточной нормой потребления.

15 Технический результат, обеспечиваемый заявляемым способом, заключается в расширении спектра биологически активных веществ, получаемых из морских бурых водорослей.

Способ направлен, в первую очередь, на выделение суммы свободных жирных кислот, включая полиеновые, без предварительного извлечения липидов из водоросли
20 и, кроме того, позволяет получить высокоочищенные полифенольные соединения, фитостерины, водорастворимые полисахариды и соли альгиновых кислот с высокими выходами.

Таким образом, можно говорить о достаточно полной переработке водорослей с получением разнообразных по химической природе веществ.

25 Технический результат достигается тем, что гидролиз липидов (запасных липидов и полярных липидов биомембран - глицерогликолипидов и фосфолипидов) осуществляют 0,6-0,8 н. водным раствором соляной кислоты при нагревании в пределах 45-50°C в течение 4-5 часов и далее без нагрева в течение 12-15 часов без
30 предварительной процедуры извлечения липидов из водоросли. Обработка сырых или замороженных водорослей водным раствором соляной кислоты при нагревании позволяет произвести мягкий кислотный гидролиз липидов с образованием свободных жирных кислот и одновременно извлечь водорастворимые полисахариды.

Гидролиз липидов требует соблюдения температурных и временных режимов. При
35 использовании комнатных температур (18-25°C) процесс гидролиза липидов протекает медленно (более 2-х суток) и не в полной мере (пример 4). Полученная смесь содержит наряду со свободными жирными кислотами триацилглицерины и полярные липиды, не подвергшиеся гидролизу. Нагревание водоросли в растворе кислоты ускоряет процесс
40 гидролиза липидов. Опытным путем получено, что использование температур в диапазоне 45-50°C достаточно для полного гидролиза как запасных, так и полярных липидов водоросли, а оптимальным временем гидролиза при нагревании является 4-5 часов, далее водоросль в растворе кислоты оставляют на 12-15 часов без нагрева (примеры 1, 5, 6, 7). Проведение гидролиза при более высоких температурах ускоряет
45 процесс гидролиза липидов, но может привести к глубокой деструкции водорастворимых полисахаридов водоросли.

Обычно гидролиз полярных и запасных липидов, выделенных из растительного и животного сырья, ведут при 50-70°C, а в некоторых случаях и при более высоких
50 температурах, используя растворы кислот в диапазоне 0,5-2,5 н. При гидролизе липидов в водорослях мы учитывали наличие в сыром или замороженном сырье собственной воды, поэтому количество кислоты для гидролиза брали выше, чем это принято при выделении водорастворимых полисахаридов из сухого обезжиренного

сырья (обычно это 0,05 н). Опытным путем установлено, что содержание кислоты в пределах 0,6-0,8 н. достаточно для выполнения полного гидролиза как нейтральных (триацилглицеринов), так и полярных липидов и не ведет к деструкции водорастворимых полисахаридов (примеры 1, 5, 6, 7). При проведении гидролиза липидов происходит одновременное разрушение мембран клеток, что упрощает и облегчает процедуру последующей экстракции этиловым спиртом целевых продуктов - свободных жирных кислот, стерина, полифенольных соединений в составе сложных смесей. Обезжиренная водоросль после удаления остатка спирта из нее сушкой на воздухе используется для последующего получения солей альгиновых кислот.

Сущность способа заключается в следующем: ламинарию (свежесобранную или замороженную) заливают 0,6-0,8 н. водным раствором соляной кислоты (с образованием «зеркала») и выдерживают при температуре 45-50°C в течение 4-5 часов в зависимости от вида водоросли и далее водоросль в растворе кислоты оставляют на 12-15 часов без нагрева. После удаления водного раствора кислоты (экстракт I) остаток водоросли гомогенизируют в 96% этиловом спирте для извлечения продуктов гидролиза. Процедуру извлечения повторяют трижды. Спиртовые растворы отделяют от остатка водоросли, объединяют и концентрируют до минимального объема (примерно 1/10 его первоначального объема) с получением экстракта II, к экстракту II добавляют равный объем гексанового растворителя (гексана или нефраса), смесь перемешивают и оставляют для расслаивания на две фазы - гексановую и водно-спиртовую.

Гексановую фазу, содержащую в качестве главного компонента свободные жирные кислоты, концентрируют досуха на ротормном испарителе. Сухой остаток растворяют в гексане и конечную очистку свободных жирных кислот от примесей производят с помощью сверхбыстрой колоночной хроматографии под давлением. В качестве сорбента используют силикагель с размером частиц 40/100-100/160 микрон. Силикагель в колонку загружают в гексане, после оседания сорбента на его поверхность наносят гексановый раствор с целевыми продуктами. Для последовательного элюирования свободных жирных кислот, стерина, пигментов с хроматографической колонки используют гексан и градиент диэтилового эфира в гексане. Элюирование продуктов ведут 5-7 колоночными объемами растворителей, собирая фракции по одному колоночному объему. Контроль элюирования компонентов выполняют тонкослойной хроматографией в присутствии коммерческих стандартов жирных кислот и стерина.

Водно-спиртовую фазу нейтрализуют до pH 7 и фильтруют. Раствор концентрируют до небольшого объема, добавляют дихлорметан (или хлороформ), перемешивают. После разделения раствора на две фазы отделяют нижнюю дихлорметановую фракцию. Верхнюю фазу повторно промывают дихлорметаном, после чего ее отбрасывают. Полученные дихлорметановые экстракты объединяют, промывают водой, фильтруют и концентрируют для получения фракции полифенольных соединений (ПФС), которую дополнительно очищают колоночной хроматографией на силикагеле.

Водный раствор соляной кислоты (экстракт I) используют для извлечения водорастворимых полисахаридов осаждением их этиловым спиртом. После отделения осадка водорастворимых полисахаридов центрифугированием или отстаиванием на холоду водно-спиртовой супернатант концентрируют до небольшого объема и вновь выливают в этиловый спирт, выставляют на холод для образования второго осадка,

после чего супернатант сливают и отбрасывают. Осадки объединяют, очищают диализом против дистиллированной воды от примесей солей.

Остаток водоросли, полученный после спиртовой экстракции, высушивают на воздухе для удаления остаточного спирта и используют для выделения солей альгиновых кислот по известному способу (RU 2240816 C1, 27.11.2004).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1.

Экстракция 1. 150 г сырой водоросли (25 г сухой) ламинарии ребристой (*Costaria costata* [Turn.] Saund.) заливают 250-300 мл 0,8 н. водного раствора соляной кислоты (с образованием «зеркала») и выдерживают при температуре 50°C в течение 4-х часов, после прекращения нагрева водоросль оставляют на 15 часов в растворе кислоты. При использовании мороженой водоросли ее масса уменьшается за счет вымораживания воды до 50 г (25 г сухой водоросли), поэтому применяется 0,6 н. раствор соляной кислоты.

Водный раствор кислоты светло-зеленого цвета сливают, водоросль дополнительно промывают 250-300 мл питьевой воды. Водные растворы кислоты объединяют (получают экстракт I).

Экстракция 2. Остаток ткани экстрагируют 400-500 мл 96% этилового спирта в гомогенизаторе в течение 3-5 минут. Этанольный экстракт сливают, процедуру повторяют еще дважды со свежей порцией спирта. Этанольные экстракты объединяют, фильтруют и концентрируют в вакууме до 80-100 мл (экстракт 2).

Экстракция 3. Остаток обезжиренной водоросли высушивают досуха на воздухе и заливают 300 мл 1% водного раствора гидрокарбоната натрия, нагревают в течение 3-х часов при температуре 65°C для получения водного раствора натриевой соли альгиновой кислоты. После слива раствора 1 остаток водоросли повторно экстрагируют таким же раствором с получением раствора 2.

Выделение целевых продуктов из экстрактов:

Выделение водорастворимых полисахаридов.

Для выделения смеси водорастворимых полисахаридов (фукоидана и следовых количеств ламинарана) используют экстракт I, представляющий водный раствор соляной кислоты. Раствор (600 мл) вливают в 2,5 л 96% этилового спирта. Образуется белая хлопьевидная взвесь. После оседания ее на холоду спиртовой раствор сливают, осадок водорастворимых полисахаридов дважды промывают спиртом и спиртовые растворы отправляют на регенерацию. Выход смеси водорастворимых полисахаридов после сушки составляет порядка 0,78 г.

Получение свободных жирных кислот, стеринов, производных хлорофиллов и каротиноидов.

К 80 мл экстракта 2, помещенного в емкость с нижним сливом, добавляют равный объем гексана. Смесь перемешивают, оставляют на 10-15 мин для разделения на две фазы - гексановую (верхняя) и водно-спиртовую (нижняя).

Гексановую фазу отделяют от водно-спиртовой фазы и дополнительно промывают двумя объемами воды. Водную часть отбрасывают. Гексановую фазу упаривают на роторном испарителе под пониженным давлением. Выход сырых жирных кислот составляет 0,32 г (смесь жирных кислот с производными хлорофиллов, каротиноидов, стеринов, эфиров жирных кислот, непредельных углеводов).

0,32 г смеси растворяют в 50-100 мл гексана и помещают на хроматографическую колонку с силикагелем с размером частиц 40/100 микрон (высота столба сорбента 15-20 см, диаметр колонки 2 см). Скорость тока элюента (в пределах 30-40 мл/мин) через

колонку обеспечивают пониженным давлением. Для элюирования целевых продуктов используют последовательно гексан и градиент диэтилового эфира в гексане.

Элюирование продуктов ведут 5-7 колоночными объемами растворителей, собирая фракции по одному колоночному объему. Контроль элюирования целевых продуктов выполняют тонкослойной хроматографией в присутствии коммерческих стандартов жирных кислот, стерина, триацилглицеринов. Фракции, содержащие идентичные вещества, концентрируют на ротаторном испарителе. Получают 0,19 г свободных жирных кислот. Выход составляет порядка 88% от суммы жирных кислот. Выход стерина составляет 0,053 г (90% от суммы стерина). На колонке остаются производные хлорофиллов и каротиноидов. Элюирование их смесью гексана и диэтилового эфира дает 0,17 г продукта.

Получение полифенольных соединений.

Водно-спиртовую фазу после отделения от гексановой фазы нейтрализуют до pH 7, фильтруют, концентрируют до объема порядка 50 мл, добавляют два объема дихлорметана (или хлороформа), смесь перемешивают. После разделения раствора на две фазы отделяют нижнюю дихлорметановую фракцию. Верхнюю фазу повторно промывают дихлорметаном для полного извлечения ПФС, после чего верхнюю фазу отбрасывают. Дихлорметановые фракции объединяют, фильтруют и концентрируют. Выход продукта, который представляет фракцию, содержащую полифенольные соединения (ПФС), составляет порядка 122 мг. Конечную очистку фракции ПФС проводят на колонке с силикагелем с размером частиц 40/100 микрон (высота колонки 10-12 см, диаметр колонки 1 см). Для элюирования целевых продуктов используют хлороформ и градиент этанола в хлороформе. Скорость тока элюента через колонку обеспечивают пониженным давлением. Контроль элюирования целевых продуктов выполняют, применяя метод тонкослойной хроматографии в присутствии коммерческих стандартов. Элюаты, содержащие целевые продукты, концентрируют на ротаторном испарителе с получением 0,1 г ПФС.

Получение натриевых солей альгиновых кислот.

300 мл водного раствора 1, полученного при экстракции остатка водоросли гидрокарбонатом натрия, как описано выше, нейтрализуют до pH 7 и выливают в 1 л этилового спирта. Сразу образуются белые хлопья солей альгиновой кислоты, которые отфильтровывают через мелкоячеистую капроновую ткань, еще дважды растворяют в 96% этиловом спирте, освобождают от спирта фильтрованием через мелкоячеистую ткань, высушивают до постоянного веса. Выход солей альгиновых кислот из раствора 1 составляет 2,46 г.

Аналогичную процедуру проводят с раствором 2. Выход солей альгиновых кислот из раствора 2 составляет 1,39 г.

Пример 2. 150 г ламинарии ребристой подвергают процедурам, описанным в примере 1, однако обработку водоросли проводят при температуре 50°C в течение 2 часов 0,2 н. водным раствором соляной кислоты. Получение солей альгиновых кислот проводят, как в примере 1.

Проведение процесса при указанных условиях приводит только к частичному гидролизу липидов водоросли. Свободные жирные кислоты составляют порядка 20% от суммы липидов. При экстракции водоросли по схеме, описанной в примере 1, проводя экстракцию липидов спиртом, получают смесь, содержащую помимо свободных жирных кислот триацилглицерина, глицерогликолипиды и фосфолипиды.

Выход продуктов составляет: водорастворимые полисахариды - 0,79 г, жирные кислоты - 0,03 г, смесь липидов и пигментов - 0,78 г, ПФС - 0,1 г, соли альгиновых

кислот - 4,2 г.

Пример 3. 150 г сырой ламинарии ребристой подвергают процедурам, описанным в примере 2, однако обработку водоросли проводят 0,2 н. водным раствором соляной кислоты при температуре 50°C в течение 5 часов и далее водоросль оставляют в растворе кислоты до утра без нагрева. В этом случае гидролиз липидов проходит примерно на 50%, что приводит к увеличению выхода свободных жирных кислот.

Выход продуктов составляет: водорастворимые полисахариды - порядка 0,7 г, жирные кислоты 0,07 г, смесь липидов и пигментов - 0,68 г, ПФС - 0,1 г.

Пример 4. 50 г мороженой ламинарии ребристой подвергают процедурам, описанным в примере 1, однако обработку водоросли проводят при комнатной температуре в течение 24 часов 0,6 н. водным раствором соляной кислоты. Получение альгината натрия проводят, как в примере 1.

В результате неполного гидролиза липидов выделяют только 0,07 г свободных жирных кислот и 0,36 г липидов (триацилглицеринов, глицерогликолипидов, фосфолипидов), не подвергшихся гидролизу, и пигментов, 0,06 г ПФС.

Пример 5. 50 г мороженой ламинарии ребристой подвергают процедурам, описанным в примере 1. Обработку водоросли проводят при 45°C в течение 4 часов 0,6 н. водным раствором соляной кислоты и далее оставляют без нагрева до утра. Получение солей альгиновых кислот проводят, как в примере 1.

Выход продуктов составляет: водорастворимые полисахариды - порядка 1,1 г, жирные кислоты 0,25 г, ПФС - 0,2 г, стерины - 0,072 г, соли альгиновых кислот - 6,5 г.

Пример 6. 120 г сырой ламинарии цикориевидной (*Laminaria sichorioides*, Miyabe, сем. *Laminariaceae*) подвергают процедурам, описанным в примере 1. Обработку водоросли проводят при 45°C в течение 4 часов 0,8 н. водным раствором соляной кислоты. Получение солей альгиновой кислоты проводят, как в примере 1.

Получают 0,14 г свободных жирных кислот, 0,027 г стеринов, 0,1 г ПФС, 2,3 г водорастворимых полисахаридов (смеси ламинарана и фукоидана), 7,2 г альгината натрия.

Пример 7. 50 г мороженой ламинарии цикориевидной подвергают процедурам, описанным в примере 7, однако обработку водоросли проводят 0,6 н. водным раствором соляной кислоты при 45°C в течение 4 часов и далее оставляют до утра в растворе кислоты без нагрева.

Выход продуктов составляет: 0,15 г свободных жирных кислот, 0,027 г стеринов, 0,095 г ПФС, 2,3 г водорастворимых полисахаридов, 7,4 г солей альгиновых кислот.

Формула изобретения

1. Способ переработки бурых водорослей, заключающийся в том, что сырье заливают 0,6-0,8 н. водным раствором соляной кислоты, выдерживают при температуре 45-50°C в течение 4-5 ч, оставляют водоросль в растворе кислоты на 12-15 ч без нагрева, затем отделяют водный раствор кислоты с получением экстракта I, из которого извлекают водорастворимые полисахариды (ПС) осаждением их 96%-ным этиловым спиртом, далее остаток водоросли трижды гомогенизируют в 96%-ном этиловом спирте, спиртовые экстракты отделяют от остатка водоросли, объединяют и концентрируют до минимального объема с получением экстракта II, затем к экстракту II добавляют равный объем гексанового растворителя, смесь перемешивают и оставляют для расслаивания на две фазы - гексановую и водно-спиртовую, далее гексановую фазу, отделенную от водно-спиртовой фазы, высушивают досуха, вновь растворяют в гексане и наносят на хроматографическую колонку с силикагелем для

выделения жирных кислот (ЖК), стеринов и производных пигментов последовательным элюированием гексаном и градиентом диэтилового эфира в гексане; затем водно-спиртовую фазу нейтрализуют и фильтруют, раствор концентрируют до небольшого объема, добавляют дихлорметан или хлороформ для извлечения фракции полифенольных соединений (ПФС), затем фракцию ПФС отмывают дитиллированной водой, высушивают, растворяют в хлороформе и проводят дополнительную очистку ПФС колоночной хроматографией на силикагеле.

2. Способ по п.1, в котором остаток водоросли сушат и используют для получения солей альгиновых кислот.

15

20

25

30

35

40

45

50