

БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ И ПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПИЩЕВОЙ ИНГРЕДИЕНТ, ОБОГАЩЕННЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ШПИНАТА

**С.Н. Зорин, Ю.С. Сидорова, А.Д. Малинкин,
Н.А. Петров, В.К. Мазо**

ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, РФ, mailbox@ion.ru

В современном обществе возрастающая востребованность адаптогенов обусловлена такими факторами как подверженность психоэмоциональному стрессу, синдрому хронической усталости, физическим и умственным нагрузкам. Наблюдается тенденция роста производства и продаж синтетических адаптогенных препаратов. Однако для повышения неспецифической резистентности организма человека одним из наиболее перспективных подходов представляется использование в качестве алиментарного фактора адаптогенов растительного происхождения, лишенных многих недостатков химиотерапевтических средств: привыкания, токсичности, развития побочных негативных реакций при длительном применении. Использование растительных экстрактов, содержащих фитоадаптогены, в качестве компонентов специализированных пищевых продуктов отвечает задачам рационального природопользования уникальных растительных ресурсов России.

Термин «адаптоген», введенный выдающимся российским фармакологом Н.В. Лазаревым в 1947 году и определяемый как вещество, способное ввести организм в состояние неспецифически повышенной сопротивляемости организма (СНСП) к стрессорным воздействиям, самым тесным образом связан с классическим понятием стресса, (сформулированным Г. Селье). Растительные биологически активные вещества (БАВ) близкие по структуре к эндогенным медиаторам стресса той или иной природы могут проявлять адаптогенные свойства, влияя в качестве прострессоров (активаторов или ингибиторов) на системы, вовлеченные в регуляцию формирования ответа на стрессорные воздействия. Структурное соответствие позволяет выделить группы растительных адаптогенов, такие как фенольные соединения, структурно подобные катехоламинам (эндогенным стрессовым медиаторам симпато-адреналовой системы), и фитоэкдистероиды) структурно близкие кортизолу (медиатору гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, так называемому гормону стресса) Наиболее хорошо изученным представителем фитоэкдистероидов является низкотоксичное соединение 20-гидроксиэкдизон. Обсуждаются перспективы использования 20-гидроксиэкдизона в составе БАД к пище и специализированных продуктах для питания спортсменов. Анаболический эффект, свойственный 20-гидроксиэкдизону (20E) может быть объяснен влиянием этого соединения (как такового или его метаболитов) на протеинкиназу В- (PKB)/Akt-сигнальную макромолекулу, являющуюся ключевой в регуляции клеточной активности. Результаты достаточно многочисленных фармакологических исследований субстанции «Серпистен», представляющей смесь 20-гидроксиэкдизона и его структурного изомера 25S - инокостерона в соотношении 8:1, свидетельствуют о соответствии входящих в его состав фитоэкдистероидов критериям, характеризующим биологически-активные соединения как адаптогены. На наш взгляд, особый интерес представляют практически не изученные вопросы возможного синергизма в проявлении адаптогенных эффектов при сочетании фитоэкдистероидов и по-

лифенолов - соединений с выраженным антиоксидантным действием. Высокотехнологичные методы получения фитоэкдистероидсодержащего экстракта из дикорастущего растения серпухи венценосной (*Serratula coronata*) и анализа его химического состава были разработаны научным коллективом Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, (Сыктывкар) под руководством профессора В.В. Володина. Нами были проведены исследования *in vivo* по экспериментальной оценке влияния экстракта из этого дикорастущего растения на некоторые биомаркеры общего адаптационного синдрома и когнитивные функции у крыс линии Вистар. Было установлено, что потребление экстракта серпухи венценосной в дозе 2мг фитоэкдистероидов/кг массы тела в течение 25 суток способствует адаптации крыс линии Вистар к новым условиям и ускоряет процессы обучения и памяти при обучении инструментальному пицедобывательному навыку. Полученные с использованием стрессированных животных результаты обосновывали перспективы дальнейшего клинического исследования экстракта серпухи венценосной в профилактическом питании. Ассортимент выпускаемых фитоэкдистероидсодержащих препаратов и продуктов включает в настоящее время более 140 различных наименований. Следует, однако, отметить, что в зарубежных и отечественных препаратах и специализированных пищевых продуктах, проявляющих адаптогенные свойства, использованы индивидуальные экдистероиды (в основном синтетического происхождения) или экдистероидсодержащие экстракты дикорастущих лекарственных растений (*Rhaponticum carthamoides*, *Serratula coronata*, *Ajiga Turcestanica*, *Pfaffia*, *Cyanotis*). В этом плане перспективны исследования адаптогенных свойств комплексов экдистероидов и полифенолов выделенных из пищевого растительного сырья. В связи с вышеизложенным в ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» разработан и осуществляется проект 19-16-00107 «Новые функциональные пищевые ингредиенты адаптогенного действия, предназначенные для увеличения работоспособности организма человека и повышения его когнитивного потенциала». Проект предусматривает получение из растительного сырья новых функциональных пищевых ингредиентов, адаптогенные свойства которых будут отвечать критериям доказательной медицины: комплексов фитоэкдистероидов и полифенолов, а также их комплексную физико-химическую и физиолого-биохимическую характеристику, оценку качества и безопасности. Соответственно будет получено обоснование возможности использования разработанных функциональных пищевых ингредиентов (ФПИ) растительного происхождения при производстве специализированных видов пищевой продукции.

Целью представленного сообщения являются результаты начального этапа проекта, связанного с разработкой технологического подхода, включившего экстракцию пищевого шпината экстрагентами с различной полярностью и последующую препаративную хроматографию.

Материалы и методы. В качестве исходного сырья были использованы листья свежего шпината (закуплены в продовольственной торговой сети). Содержание влаги в листьях сырого шпината составляло 92%. Шпинат был лиофилизирован на установке ЛС 500 (производства «ПРОИНТЕХ», Пушкино, РФ) и измельчен с использованием лабораторного блендера (Fimar FRI, Италия).

Определение содержания щавелевой кислоты на различных стадиях получения фитоэкдистероидсодержащих экстрактов из лиофилизированных измельченных листьев шпината проводили методом перманганатометрического титрования с некоторыми модификациями (чувствительность метода 10 мкг/мл).

Содержания 20Е в экстрактах определяли методом ВЭЖХ, используя хроматограф Agilent Technologies 1100 с масс-детектором Agilent Technologies 6410 на колонке Agilent Technologies Poroshell 120 EC-C18 3,0*50 мм, 2,7 мкм и градиентном элюировании в системе 0,1% муравьиная кислота/ацетонитрил. В качестве стандарта использовался образец «Серпистен», предоставленный Институтом биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. Содержание общих полифенолов в экстрактах определяли спектрофотометрически по методу Фолина-Чокальтеу. В качестве стандарта при построении калибровоч-

вочной кривой использовали образец галловой кислоты (Carl Roth, Германия, содержание галловой кислоты больше или равно 99%). Экстракцию вели при температуре 25°C в течение 60 минут при массовом соотношении порошок листьев шпината/экстрагент 1/39 при перемешивании и осветляли получаемые экстракты центрифугированием в течение 30 минут при 4000 об/мин (центрифуга «Beckman J-6B», Австрия). В качестве экстрагента использовали водные растворы этилового спирта при трех концентрациях 0%, 20% и 40%.

Для последующего концентрирования 20Е был использован водный экстракт сухих листьев шпината (не содержащий спирта), который подвергали ультрафильтрации в тангенциальном потоке на установке для микро- и ультрафильтрации на базе фильтодержателя АСФ-018 (производство «Владисар», РФ) через мембрану с размером пор 10 кД со сбором низкомолекулярной фракции с последующим ее концентрированием на лабораторной установке обратного осмоса (на базе мембранного насоса Flojet Triplex R3811243F и обратноосмотического мембранного элемента типа 1812). Из полученного обогащенного 20Е экстракта удаляли щавелевую кислоту методом препаративной жидкостной хроматографии низкого давления на колонке С18 (4,0*9,0 см), при пропускании экстракта через колонку, последующего промывания водой и этиловым спиртом. Этанол удаляли на ротном испарителе при +50°C и полученный конечный продукт лиофильно высушивали.

Результаты и обсуждение. Содержание 20Е и общих полифенолов во всех трех экстрактах было практически одинаковым, не зависящим от использованного экстрагента. При экстракции водой содержание 20Е и общих полифенолов были равны (24,1±2,0) мкг/мл и (1,0±0,1) мг/мл, соответственно. При экстракции 20% и 40% этиловым спиртом эти значения составили (24,9±2,3) мкг/мл, (1,1 ± 0,1) мг/мл и (24,0±2,0) мкг/мл и (1,2±0,1) мг/мл, соответственно. В конечном продукте, полученном экстракцией водой измельченных сухих листьев шпината, ультрафильтрацией и сорбцией на колонке С18, содержание 20Е выросло по сравнению с высушенными листьями шпината почти в 9 раз и составило 8900 мкг/г. С учетом содержания влаги по отношению к сырому шпинату содержание 20Е в полученном конечном продукте увеличилось более чем в 110 раз. Содержание общих полифенолов в конечном продукте, равное (80,2±5,6) мг/г, увеличилось приблизительно в 2 раза по сравнению с высушенными листьями шпината и в 25 раз по сравнению с сырым шпинатом. Методом перманганатного титрования щавелевая кислота в конечном продукте не определялась. Щавелевая кислота противопоказана людям с повышенной кислотностью желудка и с заболеваниями почек, так как ее употребление приводит к обострению этих болезней и вызывает образование оксалатов кальция, откладывающихся в коленных и локтевых суставах, а также в шейных позвонках. Таким образом, в полученном продукте высокое содержание 20Е и полифенолов сочетается с предельно низким неопределяемым перманганатным титрованием содержанием щавелевой кислоты, что определяет перспективы дальнейшего масштабирования разрабатываемой технологии получения ФПИ для использования в составе функциональных пищевых продуктов адаптогенного действия.

Заключение. Разработан лабораторный вариант технологического подхода, позволяющего получать из пищевого сырья - листьев шпината, сухие экстракты с высоким содержанием 20-гидроксиэкдизона и полифенолов.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-16-00107 «Новые функциональные пищевые ингредиенты адаптогенного действия, предназначенные для увеличения работоспособности организма человека и повышения его когнитивного потенциала».