

Особенности распределения жирных кислот в триацилглицеринах зрелых семян лунника оживающего (*Lunaria rediviva* L.)

Сидоров Р.А. *, к.б.н., в.н.с., Казаков Г.В., инженер

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

*email: roman.sidorov@mail.ru

Впервые описан жирнокислотный состав запасных sn-1,2,3-триацилглицеринов (ТАГ) зрелых семян лунника оживающего – источника нутрицевтически ценной нервоновой кислоты (24:1n-9). Изучено распределение ацилов жирных кислот (ЖК) между sn-1(3)- и sn-2- положениями углеродных атомов глицеринового остатка ТАГ. Показано, что насыщенные (пальмитиновая, 16:0 и стеариновая, 18:0), а также мононенасыщенные ЖК с очень длинной цепью – гондоиновая (20:1n-9), эруковая (22:1n-9) и нервоновая этерифицируют исключительно крайние – β -углеродные атомы (sn-1(3)-положения), и отсутствуют в sn-2-положении.

Ключевые слова: лунник оживающий, триацилглицерины, жирные кислоты, нервоновая кислота.

Characteristics of the distribution of fatty acids in triacylglycerols of mature seeds of *Lunaria rediviva* L.

Sidorov R. A., Kazakov G.V.

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS

*email: roman.sidorov@mail.ru

The fatty acid composition of storage sn-1,2,3-triacylglycerols (TAGs) of mature Perennial honesty seeds, a source of nutraceutically valuable nervonic acid (24:1n-9), is described for the first time. The distribution of fatty acid (FA) acyls between the sn-1(3)- and sn-2- positions of carbon atoms of the glycerol residue of TAG is also discussed. Saturated fatty acids, such as palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0), as well as very long-chain monounsaturated fatty acids, including gondoic acid (20:1n-9), erucic acid (22:1n-9), and nervonic acid, have been found to esterify exclusively at the β -carbon atoms (sn-1(3) positions), with no presence in the sn-2 position.

Keywords: *Lunaria rediviva*, seeds, triacylglycerols, fatty acids, positional distribution, nervonic acid.

Введение. Растения рода *Lunaria*, главным образом – лунник однолетний (*Lunaria annua* L.) – являются продуцентами жирного масла, богатого мононенасыщенными жирными кислотами с очень длинной цепью (МЖКОДЦ) – гондоиновой, эруковой и нервоной (НК), принадлежащих к «семейству» ω -9 кислот, для промышленных (например, лубриканты [1], биотопливо [2]) и нутрицевтических применений. НК богаты липиды белого вещества человеческого мозга и миелиновые волокна [3], чем обусловлена её высокая нутрицевтическая ценность. Исследования

последних лет показали, что НК в качестве пищевой добавки обладает терапевтическим потенциалом при аденолейкодистрофии и рассеянном склерозе [4]. Установлено, что содержание этой кислоты в липидах тканей нервной системы коррелирует с болезнями Альцгеймера, Паркинсона, когнитивными способностями, смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний и ожирением [3]. НК может также действовать как неконкурентный ингибитор обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека I типа [5]. В свете этих данных поиск и изучение потенциальных продуцентов жирного масла, богатого НК, является, несомненно, актуальной задачей.

Известно, что на нутрицевтическую ценность триацилглицерина влияет не только состав ЖК, но и их распределение между *sn*-положениями углеродных атомов глицеринового остатка, так как у ЖК, этерифицирующих *sn*-2-положение и *sn*-1(3)- разная метаболическая «судьба» и, соответственно, – функциональная активность [6].

Целью нашего исследования стало изучение особенностей ЖК-состава и распределения ЖК между *sn*-положениями запасных ТАГ семян лунника оживающего – многолетнего растения, реликта третичного периода.

Материалы и методы. Зрелые плоды лунника оживающего собирали в сентябре 2023 года на территории Главного ботанического сада РАН (Москва, Россия), семена извлекали из стручков и хранили в бумажных конвертах при комнатной температуре. Экстракцию жирного масла, выделение ТАГ из экстракта, их липазный гидролиз, разделение продуктов гидролиза и вычисление состава *sn*-1(3)-положений выполняли, как описано ранее [7, 11]. Для получения метиловых эфиров ЖК (МЭЖК) из ТАГ использовали три метода: омыление 4 % КОН в 80 % водном этаноле с последующей экстракцией свободных ЖК и их этерификацией сернокислым метанолом [8]; прямую переэтерификацию ТАГ 1 % раствором H_2SO_4 в метаноле [8]; а также переэтерификацию 0,2 М метанольным раствором гидроксида триметилсульфония (ТМСГ). МЭЖК анализировали методом капиллярной газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, как описано ранее [7–9].

Результаты и обсуждение. Во время получения МЭЖК из ТАГ прямой их переэтерификацией в 1 % растворе H_2SO_4 в метаноле при 55 °С, мы обратили внимание на то, что реакция не протекает количественно – на дне виалы оставалась капля ТАГ, не вступивших в реакцию. По-видимому, это обусловлено наличием большого количества молекулярных видов ТАГ с ЖК с очень длинной цепью в их составе, которые имеют более высокую температуру плавления, по сравнению с ТАГ обычного состава. Поэтому мы дополнительно применили другие способы пробоподготовки, чтобы оптимизировать методику исследований и сравнили влияние способа получения МЭЖК из ТАГ семян лунника оживающего на ЖК-состав пробы. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние способа получения МЭЖК из *sn*-1,2,3-ТАГ лунника оживающего на ЖК-состав пробы

ЖК, масс. %	Способы дериватизации ТАГ (n=3)		
	Омыление	1 % H ₂ SO ₄ /MeOH	0,2М ТМСГ
16:0	***1,5 ± 0,1	4,1 ± 0,3	***1,4 ± 0,1
18:0	*0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	*0,1 ± 0,0
18:1 <i>n</i> -9	**18,6 ± 0,1	16,0 ± 0,6	**18,4 ± 0,4
18:2 <i>n</i> -6	12,2 ± 0,2	12,1 ± 0,1	12,3 ± 0,3
18:3 <i>n</i> -3	**1,5 ± 0,1	2,1 ± 0,1	**1,6 ± 0,1
20:1 <i>n</i> -9	**9,9 ± 0,0	13,0 ± 0,5	**9,7 ± 0,1
22:1 <i>n</i> -9	48,0 ± 0,3	47,4 ± 1,2	48,2 ± 0,7
24:1 <i>n</i> -9	***6,9 ± 0,0	4,2 ± 0,2	***6,9 ± 0,1
Прочие ЖК ^{а)}	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1

^{а)} также содержали 14:0, 16:1*n*-9, 16:1*n*-7, 18:1*n*-7, 20:1*n*-7, 20:2*n*-6, 20:0, 22:0, 22:1*n*-7, 24:0, 24:1*n*-7 в количествах 0,01-0,4 %; * – Результаты ANOVA теста в сравнении с 1 % H₂SO₄ в метаноле: *** – p<0,001, ** – p<0,01, * – p<0,05.

Главными ЖК были олеиновая, линолевая, гондоиновая, эруковая и нервоновая – на их сумму приходилось более 93 % ЖК, из них на сумму МЖКОДЦ – более 64 % ($\sum_{C18:x} / \sum_{\text{МЖКОДЦ}} = 1:2$). МЭЖК из ТАГ, полученные прямой переэтерификацией серноокислым метанолом, характеризовались достоверными различиями по сравнению с двумя другими способами получения МЭЖК, выраженных в повышенном в 2,7 раза содержании 16:0 и в 1,6 раза меньшим количеством нервоновой кислоты.

По результатам сравнения трёх разных методов получения МЭЖК из ТАГ, богатых МЖКОДЦ, для дальнейшей работы мы остановились на дериватизации с помощью ТМСГ, так как этот метод позволял получать пробы идентичного состава за время, в 3–4 раз меньшее, времени, требуемого для получения МЭЖК способом омыления с последующей этерификацией ЖК.

Для характеристики распределения ЖК между *sn*-положениями углеродных атомов глицеринового остатка ТАГ семян лунника оживающего, мы применили метод гидролиза этих соединений липазой панкреатической железы свиньи (Sigma-Aldrich кат. № L3126) с последующим выделением продуктов реакции – *sn*-1,2(2,3)-ДАГ и *sn*-2-МАГ – и установлением их ЖК-состава. Результаты этой работы приведены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 видно, что ЖК между *sn*-положениями внутри ТАГ распределены неравномерно: *sn*-2-положение совсем не содержало МЖКОДЦ, либо содержало их следовые количества, а ненасыщенные C₁₈ кислоты, были сосредоточены исключительно в *sn*-2-положении. Таким образом, на долю олеиновой, линолевой и α-линоленовой кислот в *sn*-2 ТАГ приходилось 51,4, 41,4 % и 6,6 % соотв. Что касается насыщенных кислот, то в *sn*-2 также были отмечены их следовые количества, не превышающие в сумме 0,7 %.

Таблица 2 – ЖК-состав *sn*-1,2(2,3)-ДАГ и *sn*-2-МАГ, полученных в результате липазного гидролиза ТАГ зрелых семян лунника оживающего, и вычисленный состав ЖК *sn*-1,3- положений ТАГ

<i>sn</i> -поло- жения	Жирные кислоты, масс. % (n=9)						
	16:0	18:1 <i>n</i> -9	18:2 <i>n</i> -6	18:3 <i>n</i> -3	20:1 <i>n</i> -9	22:1 <i>n</i> -9	24:1 <i>n</i> -9
1,2,3	1,4 ± 0,1	18,4 ± 0,5	12,3 ± 0,3	1,6 ± 0,1	9,7 ± 0,1	48,2 ± 0,8	6,9 ± 0,1
1,2(2,3)	2,4 ± 0,6	30,8 ± 0,7	22,2 ± 1,1	3,3 ± 0,2	7,6 ± 0,3	28,9 ± 1,9	3,9 ± 0,3
2	0,6 ± 0,5	51,4 ± 3,3	41,4 ± 2,6	6,6 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
1,3**	1,7 ± 0,3	0,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,3 ± 0,2	71,1 ± 1,0	10,2 ± 0,3
1,3***	0,2 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	11,7 ± 0,8	73,9 ± 1,1	11,2 ± 0,5

** вычислены из *sn*-2-МАГ по формуле: $[a]_{1,3} = (3 \times [a]_{1,2,3} - [a]_2) \times 2^{-1}$, [10]

*** вычислены из *sn*-1,2(2,3)-ДАГ по формуле: $[a]_{1,3} = 3 \times [a]_{1,2,3} - 2 \times [a]_{1,2(2,3)}$, [7].

Так как при липазном гидролизе не образуется *sn*-1,3-ДАГ, то состав ЖК в этих *sn*-положениях может быть вычислен из состава *sn*-1,2,3-ТАГ и составов *sn*-2- или *sn*-1,2(2,3)-положений. В табл. 2. приведены результаты обоих методов вычисления. Можно видеть, что на долю МЖКОДЦ (гондоиновой, эруковой и нервоновой) приходилось 95,6–96,8 % от суммы ЖК в *sn*-1,3-положениях ТАГ, в то время как ненасыщенные C₁₈ ЖК в этих позициях практически полностью отсутствовали. Такое строго селективное распределение ЖК позволяет предположить, что запасные ТАГ зрелых семян лунника оживающего должны быть представлены главным образом симметричными двухкислотными молекулярными видами ТАГ вида АВА, где А – МЖКОДЦ, а В – ненасыщенные и полиненасыщенные C₁₈ ЖК. Их образование должно быть обусловлено присутствием в биосинтезе ТАГ по пути Кеннеди особых изоформ ферментов, ответственных за ацилирование *sn*-1 – глицеро-3-фосфат-ацилтрансфераза, (GPAT) и, как минимум, за *sn*-3-положение – *sn*-1,2-диацилглицерин-3-ацилтрансфераза (DGAT), имеющих субстратную специфичность к мононенасыщенным ЖК с очень длинной цепью. Установление позиционно-видового, позиционно-типового состава ТАГ, ЖК составов лизо-фосфатидной и фосфатидной кислоты, нативных ДАГ семян лунника оживающего станет предметом дальнейших исследований.

Финансирование: результаты исследований получены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации России (тема № 122042700043-9).

Список литературы

- 1 Dodos G.S. et al. Renewable fuels and lubricants from *Lunaria annua* L. // Industrial Crops and Products. 2015. Т. 75. С. 43–50.
- 2 Papini A., Simeone M.C. Forest resources for second generation biofuel production // Scandinavian Journal of Forest Research. 2010. V. 25. № . S8. P. 126–133.
- 3 Li Q. et al. A mini review of nervonic acid: Source, production, and biological functions // Food Chemistry. 2019. V. 301. P. 125286.

- 4 Su H. et al. High-level production of nervonic acid in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* by systematic metabolic engineering // *Communications Biology*. 2023. V. 6. № 1. P. 1125.
- 5 Kasai N. et al. Three-dimensional structural model analysis of the binding site of an inhibitor, nervonic acid, of both DNA polymerase β and HIV-1 reverse transcriptase // *The journal of biochemistry*. 2002. V. 132. № 5. P. 819–828.
- 6 More S.B., Gogate P.R., Waghmare J.S. Application of structured triacylglycerols in food products for value addition // *Heliyon*. 2020. V. 6. № 10.
- 7 Sidorov R.A. et al. Positional-Species Composition of Triacylglycerols from the Arils of Mature *Euonymus* Fruits // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2014. V. 91. № 12. P. 2053–2063.
- 8 Nosov A.V. et al. Callus and suspension cell cultures of *Sutherlandia frutescens* and preliminary screening of their phytochemical composition and antimicrobial activity // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2023. V. 45. № 3. P. 42.
- 9 El-Hamdy A.H., Christie W.W. Preparation of methyl esters of fatty acids with trimethylsulphonium hydroxide—an appraisal // *Journal of Chromatography A*. 1993. V. 630. № 1–2. P. 438–441.
- 10 Vander Wal R.J. Calculation of the distribution of the saturated and unsaturated acyl groups in fats, from pancreatic lipase hydrolysis data // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1960. V. 37. № 1. P. 18–20.

DOI 10.18699/GPB2024-79

Биоресурсная коллекция льна кафедры генетики, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Симагин А.Д.; Симагина А.С.; Захарова С.А.; Вертикова Е.А., д.с.-х.н., и.о. зав. каф.*

¹Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева, Москва, Россия

**email: alexander.d.simagin@yandex.ru*

На кафедре генетики, селекции и семеноводства в 2021 году развернуты исследования по изучению льна масличного и льна-долгунца. С целью реализации селекционных программ по данной культуре активно начали формировать биоресурсную коллекцию льна, которая на данный момент насчитывает более 45 образцов различного происхождения.

Ключевые слова: лен масличный, лен-долгунец, биоресурсная коллекция, дикие виды, генофонд.

Bioresource collection of flax of the Department of Genetics, Breeding and Seed Production of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Russian Academy of Agriculture named after K.A. Timiryazev

Simagin A.D.; Simagina A.S.; Zakharova S.A.; Vertikova E.A., Doctor of Agricultural Sciences, Acting Head of the Department*

Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev, Moscow, Russia

**email: alexander.d.simagin@yandex.ru*