

УДК 573.4:54.056

КОНЦЕНТРАТЫ ФИКОЦИАНИНОВ ИЗ БИОМАССЫ ARTHROSPIRA PLATENSIS: ТЕХНОЛОГИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА**Н.А. Бирюлина, С.Н. Зорин, В.К. Мазо***Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, г. Москва, Россия*

Биомасса цианобактерии *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) обычно называемой в пищевой промышленности сине-зеленой микроводорослью-спирулиной, имеет длительную историю употребления человеком в пищу. Отличительной особенностью *A. platensis*, определяющей высокую пищевую и биологическую ценность её состава, является содержание белка, которое в высушенной биомассе спирулины может достигать 75 %. Около 50 % от общего содержания всех белков в составе биомассы *A. platensis* составляют фикоцианины (С-фикоцианин и аллофикоцианин) комплексы белков с фикоцианобилином – синим тетрапиррольным хромофором (элементный состав $C_{33}H_{38}N_4O_6$), обладающие выраженными антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами. Экстракты из биомассы спирулины, содержащие фикоцианины, используют как в качестве пищевой добавки – синего красителя (Е134), так и в составе биологически активных добавок к пище (БАД). Для пищевых целей степень чистоты экстрактов содержащих С-фикоцианин и аллофикоцианин (определяемая соотношением оптических плотностей экстракта при двух длинах волн, а именно ОП620/ОП280) должна быть выше 0,7.

Цель – охарактеризовать проводимые на протяжении многих лет работы по экстракции фикоцианинов из биомассы *A. platensis* и представить разработанный нами методический подход, позволяющий относительно просто получать концентраты фикоцианинов с чистотой необходимой для использования в специализированной пищевой продукции.

Экстракты. Методы получения экстрактов из биомассы *A. platensis* все так или иначе связаны с нарушением на первом этапе целостности клеточных стенок. Для этой цели применяют методы замораживания-оттаивания, механическую гомогенизацию, различные химические реагенты, воздействия ультразвуком, импульсным электрическим полем, микроволновое излучение и различные сочетания методов. На полноту «перехода» фикоцианинов в экстракт и чистоту получаемого препарата влияют многие факторы, такие как время экстракции, тип биомассы (лиофилизированная, высушенная распылением или влажная), тип растворителя, температура, соотношение биомасса/растворитель, физическая природа используемого воздействия. По результатам сравнительной оценки эффективности различных методов в работе [1] был предложен способ извлечения С-фикоцианина из влажной биомассы *A. platensis* с использованием ультразвукового воздействия и добавления в биомассу стеклянных шаров (для повышения эффективности разрушения клеток). Метод обеспечивал выход экстрагируемого продукта – 43,75 мг фикоцианина/г биомассы и содержание С-фикоцианина 0,21 мг/мл экстракта. В другой публикации этой группы исследователей приводятся данные о получении водного экстракта С-фикоцианина из высушенной, замороженной и измельченной биомассы *A. platensis* с выходом 82,5 мг фикоцианина/г биомассы [2]. В работе [3] показано, что использование 0,05 ммоль/л аммония хлорида вместо фосфата натрия в качестве экстрагента при четырех последовательных повторных стадиях замораживания-оттаивания биомассы *A. platensis* повышает в два раза чистоту экстракта фикоцианина. В последнее время на смену чисто механическому разрушению клеток биомассы *A. platensis* посредством трения приходят методы нетеплового нарушения клеточной стенки при воздействии импульсных электрических полей, ультразвукового и микроволнового воздействий. Преимущество использования для экстракции фикоцианина из свежей биомассы *A. platensis* воздействия импульсных электрических полей (ИЭП) по сравнению с механическим разрушением клеток в водной среде продемонстрировано в работе [4]. Экстракт С-фикоцианина, полученный при воздействии на биомассу ИЭП имел чистоту в 2,5 раза выше $0,51 \pm 0,021$, чем полученный с использованием метода полного механического разрушения клеток бисерной мешалкой: $(0,51 \pm 0,021)$ и $(0,21 \pm 0,013)$ соответственно. Ультразвуковое воздействие ускоряет разрыв клеточной стенки путем прямого осмоса, существенно сокращая время экстракции, и его использование вместе с другими методами предварительной обработки сопровождается синергетическим эффектом, приводящим к увеличению выхода экстрагируемого вещества.

Так ультразвуковое воздействие плюс замораживание и оттаивание привело к самой высокой эффективности экстракции фикоцианина (92,08 %), а сочетание обработки ультразвуком и мацерации привело к более чем 84 % выходу фикоцианина в экстракт [5]. В этом же исследовании было показано, что этап предварительного замачивания (120 минут) биомассы, значительно повышал эффективность всех использованных методов экстракции. В работе [6] проведена сравнительная оценка эффективности ультразвукового и микроволнового методов воздействия на биомассу *A. platensis* в процессе экстракции С-фикоцианина. При использовании микроволнового метода содержание С-фикоцианина в экстракте составило 4,54 мг/мл при чистоте 1,27, а при использовании ультразвукового воздействия содержание С-фикоцианина в экстракте было равным 2,84 мг/мл при чистоте 0,65 (то есть в 2 раза ниже).

Экстракция биомассы *A. platensis* является первой стадией концентрирования фикоцианинов, последующая стадия стандартно включает повторные сульфатно-аммонийные осаждения белкового материала [7]. Ниже представлены стандартный лабораторный метод концентрирования фикоцианинов (первый вариант) и разработанный нами лабораторный метод получения концентрата фикоцианинов, в котором стадии повторного сульфатно-аммонийного осаждения исключены (второй вариант).

Экспериментальная часть. В качестве исходного сырья использован образец сухой биомассы спирулины (*A. platensis*) предоставленный научно-производственным объединением «Биосоляр МГУ». Биомасса была получена культивированием в закрытой теплице под искусственным освещением, собрана, сконцентрирована, промыта и высушена до состояния порошка.

Первый эксперимент по получению концентрата С-фикоцианина и аллофикоцианина проведен нами стандартно следующим образом. Экстракция 60 г. биомассы спирулины 600 мл 0,1М калий фосфатного буфера pH 7,0, предварительно охлажденного до +4 °С, проведена в течение 8 часов при температуре +4 °С, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Затем образовавшуюся суспензию центрифугируют (центрифуга Beckman J-6В, США) при 4000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант отделяют от осадка методом декантирования, повторно экстрагируют осадок по аналогичной схеме и экстракты объединяют. Далее к объединенному экстракту добавляют ¼ объема насыщенного водного раствора сульфата аммония. Смесь выдерживают 1 ч при температуре +4 °С, после чего центрифугируют при +4 °С в течение 1 ч при 4000 об/мин. Осадок (зелено-желтого цвета) отбрасывают, а к супернатанту добавляют насыщенный раствор сульфата аммония в объеме, составлявшем 120 % от объема исходного объединенного экстракта. Смесь выдерживают 1 ч при температуре +4 °С, после чего центрифугируют при +4 °С в течение 1 ч при 4000 об/мин. Осадок растворяют в минимальном объеме дистиллированной воды и проводят ультрафильтрацию в тангенциальном потоке через мембрану с диаметром пор 30 кДа со сбором высокомолекулярной фракции и ее последующем обессоливании на этой же мембране на установке «МИНИТАН» (Производство Millipore, США). Полученный ультрафильтрат (высокомолекулярная фракция) дополнительно центрифугируют (1 ч, +4 °С при 4000 об/мин), супернатант лиофильно высушивали (лиофильная сушка ЛС-500, «ПРОИНТЕХ, РФ») и получали концентрат 1.

Во втором эксперименте экстракцию биомассы спирулины ведут также, как и в первом эксперименте затем, исключив стадию сульфатно-аммонийного осаждения, полученный после центрифугирования суспензии биомассы спирулины супернатант подвергают ультрафильтрации в тангенциальном потоке через мембрану с диаметром пор 30 кДа со сбором высокомолекулярной фракции и получают концентрат 2.

Анализ. В экстракте *A. platensis* и двух полученных концентратах количественно оценивали содержание С-фикоцианина (С-ФКЦ) и аллофикоцианина (А-ФКЦ), определяя оптическую плотность при длинах волн 620 нм и 655 нм и используя для расчета формулы 1 и 2 [8]:

$$C_{\text{фкц}} = \frac{(0,154 \cdot \text{ОП}_{620} - 0,1 \cdot \text{ОП}_{655})}{m \cdot (1-k) \cdot l} \cdot V \cdot 100 \% \quad (1)$$

$$C_{\text{афкц}} = \frac{(0,194 \cdot \text{ОП}_{655} - 0,034 \cdot \text{ОП}_{620})}{m \cdot (1-k) \cdot l} \cdot V \cdot 100 \% \quad (2),$$

где V – объем объединенного экстракта, мл; m – масса навески, мг; k – массовая доля воды в пробе; l – длина оптического пути, см.

Степень чистоты экстракта и полученных концентратов рассчитывали по соотношению оптических плотностей ОП620/ОП280.

С использованием эксклюзионной хроматографии характеризовали молекулярную массу экстрагируемого С-ФКЦ и его содержание относительно общего содержания белкового материала в экстракте. Экстракт элюировали через колонку TSK GEL 2000 SW_{1x} (0.8*30 см), предварительно откалиброванную по стандартным глобулярным водорастворимым белкам. В качестве элюента используют 0,2М NaCl с добавлением азида натрия, скорость элюирования 0,25 мл/мин. Оптическую плотность элюируемого раствора определяют при двух длинах волн: 280нм и 620 нм, используя спектрофотометрический однолучевой проточный детектор «UV/VIS-151» (GILSON, США). Соответствующая хроматограмма представлена на рисунке 1.

Результаты

В таблице приведены результаты определения содержания С-ФКЦ и А-ФКЦ в экстракте биомассы *A. platensis* и концентратах, и суммарного выхода (%) этих фикобиллипротеинов при обоих способах получения концентратов.

Таблица 1 Содержания С-ФКЦ и А-ФКЦ в экстракте и концентратах

Образец	С-ФКЦ вес. %	А-ФКЦ вес. %	Степень чистоты, ОП620/ОП280	Выход % Σ(С-ФКЦ + А-ФКЦ)
Экстракт	11,7±0,3	3,3±0,1	0,68	100 %
Концентрат1	38,6±0,5	4,1±0,3	1,10	63,2±1,1 %
Концентрат2	31,8±0,6	5,2±0,2	1,04	64,9±1,1 %

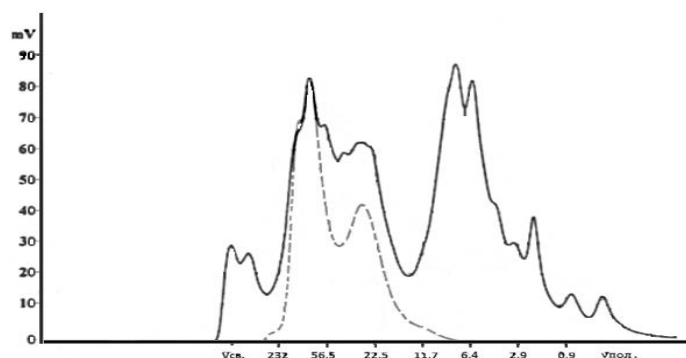


Рис. 1 Хроматограмма исходного экстракта спирулины. По оси абсцисс – молекулярная масса, кДа; По оси ординат – оптическая плотность при 280 нм и 620 нм, отн. ед.; — при длине волны 280 нм; — — — при длине волны 620 нм

Данные, полученные методом эксклюзионной хроматографии, качественно свидетельствуют о наличии в экстракте мономерной и ассоциированной формы С-ФКЦ. Содержание С-ФКЦ в экстракте относительно общего содержания белка дает значение 12,8 % (с учетом соответствующих коэффициентов удельной экстинкции), что хорошо согласуется со значением, представленным в таблице.

Сравнительная оценка полученных результатов свидетельствует о том, что исключение относительно не технологичных и достаточно трудоемких стадий сульфатно-аммонийного осаждения при применении разработанного нами метода, позволяет получать концентрат фикоцианина с чистотой достаточной для использования в пищевой продукции.

Работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы фундаментальных научных исследований (Тема № 0410–2022–0002).

Литература

1. C.C. Moraes, Luisa Sala, G.P. Cerveira and S.J. Kalil C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass Brazilian Journal of Chemical Engineering 2011; 28:45 – 49.
2. CC Moraes, JFD Burkert, SJ Kalil. C-phycocyanin extraction process for large-scale use. J Food Biochem. 2010; 34:133–148.
3. E. Manirafasha, T. Murwanashyaka, T. Ndikubwimana, Q Yue et.al Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. J Appl Phycol. 2017; 29.
4. J.M. Martínez, E. Luengo, G. Saldaña, I. Álvarez, J. Raso. C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. Food Research International. 2016.
5. II. A. Tavanandi, R. Mittal, J. Chandrasekhar. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. Algal Research, 2018, 31, 239–251.
6. R. Vali Aftari et al. The Optimized Concentration and Purity of *Spirulina platensis* C-Phycocyanin: A Comparative Study on Microwave-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction Methods. J. Food Proc. and Preserv., 2015, 39(6), 3080–3091.
7. C.C. Moraes et al. Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract // Bior. Technology 2009; 5312–5317.
8. Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В. Количественное определение массовой доли С фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* North. Geitl. Холодная экстракция. РАН, Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского, Севастополь, 2017. – 21 с.