

пигмента. Максимумы поглощения 430,1 и 662 нм.

Для выделения фикобилипротеинов был использован метод, предложенный F.W. J. Teale и R.E. Daled Бирмингемского университета. При идентификации фикобилипротеинов спектрофотометрическим методом получили спектр с максимумом поглощения фикоцианина 620, фикоэритрина – 565, аллофикоцианина – 654 нм.

Нами также разработан оптический экспресс-метод определения содержания хлорофилла в биомассе цианобактерий с использованием авторской компьютерной программы, позволяющей быстро и точно обрабатывать фотоданные.

Таким образом, исходя из особенностей пигментного состава синезеленых водорослей, их метаболизма, скорости прироста биомассы, их можно использовать как сырье для выделения хлорофилла *a*, фикобилипротеинов как пищевых красителей и биологически активных веществ.

Работа выполнена при поддержке гранта фундаментальных исследований ДВО РАН на 2006-2008 гг. «Микроорганизмы Дальнего Востока России: систематика, экология, биотехнологический потенциал».

ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ФИКОЦИАНИНА ИЗ СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ КАК ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ

Ефимов А.А.

*Камчатский государственный технический
университет*

Петропавловск-Камчатский, Россия

Целью проведенной работы являлось определение способов, технологических режимов выделения фотопигмента фикоцианина из синезеленых водорослей и получения из него пищевой добавки – пищевого красителя.

В качестве сырья использовали биомассу термофильных синезеленых водорослей рода *Phormidium*, культивированных в искусственных условиях.

Биомассу промывали для удаления загрязнений, компонентов среды культивирования. Промывание производили на сите с размером ячеек 1,0x1,0 мм пресной питьевой водой, соответствующей требованиям СанПиН 2.1.4.1074, температурой не выше 20°C, расход воды 10:1.

Размер ячеек оказывает влияние на потери биомассы за счет потери отдельных клеток, целых трихомов с промывными водами. Для выбора размера ячеек сита промывание проводили на ситах с размером ячеек 1,5x1,5, 1,0x1,0, 0,5x0,5 мм. Синезеленые водоросли рода *Phormidium* образуют длинные нити (трихомы), связанные между собой полисахаридной слизью. Такие структуры хорошо задерживаются на сите с крупной (1,5x1,5 мм) ячейей. Минимальные потери – 0,5%

от массы исходного сырья получили при использовании сита с размером ячеек 0,5x0,5 мм. Однако при этом из-за забивания ячеек сита биомассой резко возросла продолжительность промывания. Оптимальным оказалось промывание биомассы на сите с размером ячеек 1,0x1,0 мм.

Промывание вели до исчезновения в промывной воде следов сульфат-ионов, определяемых реакцией с ионами бария, т. е. содержание сульфат-ионов в питательной среде при культивировании синезеленых водорослей наибольшее. Для равномерности протекания процесса промывание проводили при перемешивании. При медленном, осторожном перемешивании клеточные стенки не повреждаются, не происходит их вымывания и потерь внутриклеточного содержимого.

После промывания биомассу хранили до дальнейшей переработки. Условия хранения оказывают значительное влияние на состояние и выход целевых веществ. Фикоцианин по своей химической природе – белок, характеризующийся, как и все белки, химической и микробиологической лабильностью. Фикоцианин в синезеленых водорослях является фотопигментом и изменяет свои свойства при воздействии света. При хранении биомассы необходимо обеспечить такие условия, которые предотвращают изменения фикоцианина, обеспечивают его максимальный выход как готового продукта.

Исследовали такие способы хранения до обработки как охлаждение, замораживание, сушка. Изменения в биомассе определяли по содержанию небелкового азота как показателю порчи белка и по содержанию фикоцианина. Для предотвращения изменений фотопигментов хранение проводили в темноте. Предельный срок хранения без охлаждения при температуре 20°C определяли по органолептическим показателям и по содержанию небелкового азота; он составил не более 6 ч. При хранении в охлажденном до 4-9°C состоянии в течение 5 сут. содержание фикоцианина не изменялось, однако уже через 3 сут. повышение содержания небелкового азота и появление неприятного запаха свидетельствовало о начальной стадии порчи. Предельный срок хранения при температуре 4-9°C – до 48 ч.

При хранении биомассы в замороженном состоянии при температуре минус 18°C не только не снизилось содержание фикоцианина, но и увеличился его выход до 84% от начального содержания в биомассе за счет дезинтеграции субклеточных чехлов и клеточных стенок при замораживании-размораживании. Тем не менее, увеличение выхода пигмента при такой дезинтеграции оказалось незначительно большим, чем при проведенной на дальнейших этапах технологии механической гомогенизации. С учетом значительных энергетических затрат на замораживание и длительное хранение замораживание биомассы не имеет преимуществ перед охлаждением. Сушка

биомассы потоком воздуха температурой 35°C приводила к снижению последующего выхода фикоцианина до 56%.

Оптимальным вариантом с точки зрения предотвращения порчи, сохранения нативных свойств фикоцианина, снижения затрат является хранение биомассы до обработки в охлажденном до 4-9°C состоянии в течение 48 ч.

После промывки биомассы содержание влаги в ней достигает 95%, что требует на дальнейших операциях повышенного расхода компонентов (буферного раствора, реагентов для фракционирования). Значительная часть влаги является свободной, находится на поверхности водорослевой массы и легко удаляется отстаиванием, фильтрованием, центрифугированием. Фильтрование и отстаивание проводили на сите с размером ячеек 1,0x1,0 мм до прекращения отделения воды. Продолжительность процесса составила 35-40 мин. При таком способе отделения влаги содержание сухих веществ в массе составило около 15%, что недостаточно для проведения дальнейших операций. Более полного отделения влаги достигали центрифугированием. Центрифугирование производили при режимах 400, 600, 800, 1000 об/мин. При частоте вращения 800 об/мин обнаруживали признаки разрушения клеточных оболочек и вытекания внутриклеточного содержимого – промывная вода приобретала синевато-фиолетовый цвет. Скорость отделения влаги при увеличении продолжительности центрифугирования уменьшалась и после 2 мин центрифугирования при 600 об/мин становилась незначительной. Оптимальным режимом центрифугирования определили частоту вращения 600 об/мин, продолжительность 2 мин. При этом остаточное содержание сухих веществ составило 20%.

После отделения влаги проводили дезинтеграцию клеток водорослей. Дезинтеграция должна обеспечивать оптимальную степень разрушения клеточных стенок и сохранение нативных свойств выделяемых компонентов. Дезинтеграция необходима для оптимизации дальнейших экстракционных процессов. Экстрагирование водорастворимого белка фикоцианина происходит и при не разрушенных клеточных стенках – через 4-5 сут. экстракт приобретает синевато-фиолетовый цвет. При получении пигмента в промышленных масштабах такая скорость экстракции недостаточна. Необходимо разрушить клеточные стенки и чехлы трихомов, отделить фикобилипротеиновые «антенные» комплексы от наружной поверхности тилакоидных мембран клеток и перевести их в раствор. При этом нежелательно дальнейшее измельчение дезинтеграта, разрушение тилакоидных мембран и хлорофилловых комплексов, агрегированных внутри и на поверхности мембран. При чрезмерной дезинтеграции раствор билипротеинов загрязнялся очень тонкой взвесью органелл, хлорофилловых комплексов, проходящих через тонкие фильтры,

практически не отделяющихся отстаиванием, а при центрифугировании разделяющихся только на очень высоких оборотах. Отделение таких компонентов при фракционировании билипротеинов требует введения дополнительной операции – предварительного осаждения загрязняющих компонентов, высокого расхода реагентов. Выход фикоцианина при неполной дезинтеграции снижался на 2,5%, т.к. часть белков оставалась связанной с не разрушенными тканями. Однако при этом не наблюдали потерь хлорофилла, не требовалось проведение дополнительных технологических операций, не требовался дополнительный расход реагентов.

Ферментативные и химические методы дезинтеграции клеток сопровождаются изменением фикобилипротеинов, и поэтому нами не рассматривались.

Применение замораживания-размораживания, как показало микроскопирование, не обеспечивает достаточной степени разрушения клеточных стенок. Кроме того, процесс замораживания-размораживания длителен и энергоемок. Этот способ дезинтеграции целесообразно применять как дополнительный при использовании мороженого сырья.

Механическую дезинтеграцию проводили в блендере ножевого типа при минимальных скоростях во избежание нагрева продукта – 1000 об/мин в течение 15, 30, 45, 60 с. Продолжительность измельчения устанавливали исходя из требуемой степени измельчения – разрушение трихома и, частично, клеточных стенок контролировали микроскопированием. При продолжительности измельчения менее 45 с в образцах обнаруживали многочисленные не разрушенные трихомы. При продолжительности дезинтеграции свыше 45 с в растворе присутствовала трудноотделяемая взвесь. Оптимальным режимом механической дезинтеграции определили частоту вращения 1000 об/мин, продолжительность 45 с.

Затем проводили экстрагирование комплекса фикобилипротеинов, одним из компонентов которого является фикоцианин. Фикобилипротеины – водорастворимые белки, поэтому экстракцию проводили водой. В целях повышения концентрации растворенных компонентов и снижения расхода реагентов использовали растворы, извлеченные из дезинтегрированной массы, которые составляли 80% от массы исходного продукта. Разбавление водой не ускоряло процесс экстрагирования. Для ускорения процесса, особенно без добавления экстрагента, применяли перемешивание при частоте 60 об/мин. Продолжительность процесса определяли по скорости накопления продуктов экстракции – водорастворимых фотопигментов. Скорость накопления пигментов контролировали по оптической плотности раствора и по достижению равновесной концентрации в жидкой фазе. При температуре 4°C и скорости перемешивания 60 об/мин равно-

весную концентрацию достигали через 1,25 ч. Для извлечения остаточных фикобилипротеинов из твердой фазы использовали повторную экстракцию свежей порцией растворителя в соотношении 1:1 в течение 30 мин и затем объединяли полученные экстракты. Применение двухступенчатой экстракции позволило увеличить выход фикобилипротеинов на операции на 4%.

После экстрагирования в жидкой фазе содержался комплекс водорастворимых фотопигментов (в т.ч. фикоцианин), в твердой фазе – хлорофилл. Полного осаждения твердой фазы и получения плотного осадка без потерь фикоцианина достигли при факторе разделения не менее 900 г и 4 мин центрифугирования.

Фракционирование фикобилипротеинов производили высаливанием сульфатом аммония в присутствии фосфатного буфера при pH 7. В исходном растворе, по результатам спектральных анализов, присутствовали фикоцианин и фикоэритрин. При добавлении 80% насыщенного раствора сульфата аммония в осадок выпадал фикоцианин. Процесс проводили при температуре 4°C в темноте. Полное выпадение осадка фикоцианина наблюдали через 2- 3 ч. Отделение осадка производили при значении фактора разделения 1240 г в течение 10 мин. При меньших значениях фактора разделения и продолжительности осаждения получили неполное осаждение и неплотный, сильно загрязненный растворенным фикоэритрином осадок.

Выделившийся осадок фикоцианина из-за соосаждения примесей содержал значительное, до 20%, количество фикоэритрина. Очистку фикоцианина производили методом переосаждения. Осадок суспендировали в равном количестве буферного раствора и при добавлении 80% насыщенного раствора сульфата аммония осаждали повторно.

Полученный осадок имел синюю, характерную для фикоцианина окраску, слабую красную флуоресценцию, содержал незначительное количество фикоэритрина и был загрязнен неорганическими солями, в основном сульфатом аммония. Для удаления низкомолекулярных примесей использовали процесс диализа через полупроницаемые мембраны – целлофан и пергамент. В качестве чистого растворителя использовали питьевую воду. Конструкция лабораторной установки для диализа предусматривала создание постоянного притока чистого растворителя в камеру пермеата и постоянный отвод отработанного пермеата. Содержащиеся в растворе низкомолекулярные вещества за счет диффузии через поры мембраны проходили в зону пермеата, через которую непрерывно протекала чистая вода. Фикоцианин как высокомолекулярное соединение оставался в растворе. Таким образом достигали обессоливания. Процесс перехода сульфата аммония в пермеат, а также остаточное количество сульфата аммония в растворе контролировали

качественной реакцией на ионы аммония с реактивом Несслера. Отсутствие белков в пермеате проверяли биуретовой реакцией. Более быстро – в течение 4 ч – полной очистки раствора достигали при использовании пергамента в качестве полупроницаемой мембраны.

Полученный осадок фикоцианина содержал 70% влаги. Для получения готового продукта – порошкообразного фикоцианина применяли процесс сушки осадка в потоке воздуха. Оптимальные результаты были достигнуты при температуре сушки 35°C. При более высокой температуре функциональные свойства фикоцианина, в т.ч. его растворимость, снижались. Полученный после высушивания порошок синего цвета полностью растворялся в воде.

Таким образом, на основе лабораторных методов обоснована технология получения пигмента фикоцианина из биомассы синезеленых водорослей – естественного богатого источника этого вещества. По полученным ранее данным, скорость прироста биомассы термофильных синезеленых водорослей рода *Phormidium* при их искусственном культивировании достигает 50 мг сухого вещества в час с 1 м² поверхности, что позволяет рассматривать этот объект как сырье для промышленного получения ценных компонентов, в том числе фикоцианина.

ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА ИЗ СИНЕЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ КАК ПИЩЕВОЙ ДОБАВКИ

Ефимов А.А.

*Камчатский государственный технический
университет*

Петропавловск-Камчатский, Россия

Целью проведенной работы являлось определение способов, технологических режимов выделения фотопигмента хлорофилла из синезеленых водорослей и получения из него пищевой добавки – пищевого красителя.

В качестве сырья использовали биомассу термофильных синезеленых водорослей рода *Phormidium*, культивируемых в искусственных условиях. В отличие от других фотосинтезирующих организмов синезеленые водоросли содержат только хлорофилл *a*. Для получения хлорофилла использовали промежуточный продукт, полученный на начальной стадии переработки биомассы синезеленых водорослей при выделении фикоцианина – дезинтегрированный осадок от первичной экстракции.

Хлорофилл – фотопигмент, изменяющий свои свойства при воздействии света. Хлорофилл характеризуется лабильностью к действию различных физических и химических факторов, в том числе повышенной температуры, света. В