

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ БИОМАССЫ *SPIRULINA PLATENSIS*

А.А. Косенко, С.В. Первушкин, Н.Н. Желонкин, А.В. Куркина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, Россия

Как цитировать: Косенко А.А., Первушкин С.В., Желонкин Н.Н., Куркина А.В. Актуальные аспекты стандартизации биомассы *Spirulina platensis* // Аспирантский вестник Поволжья. 2021. № 5–6. С. 112–117. DOI: <https://doi.org/10.55531/2072-2354.2021.21.3.112-117>

Поступила: 14.07.2021

Одобрена: 19.08.2021

Принята: 06.09.2021

■ Спирулина пищевая [*Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl.] — сине-зеленая многоклеточная нитчатая микроскопическая водоросль, широко культивируемая во многих странах мира, в том числе в Российской Федерации. Цель настоящего исследования — разработка подходов к стандартизации биомассы спирулины пищевой. В результате проведенных исследований разработаны подходы к стандартизации спирулины пищевой, заключающиеся в определении содержания β -каротина, фикоцианина и белков с использованием тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Определено, что содержание β -каротина в образцах биомассы спирулины в пересчете на абсолютно сухое сырье варьирует от 63,0 до 94,0 мг%, фикоцианина — от 3,50 до 4,30 % и белка — от 53,50 до 61,09 %. Установлено, что β -каротин, С-фикоцианин и белок являются важнейшими диагностически значимыми биологически активными соединениями биомассы спирулины пищевой. Рассмотренные в настоящей работе аналитические аспекты исследования биомассы спирулины пищевой могут быть использованы как обоснование производства лекарственных препаратов на ее основе.

■ **Ключевые слова:** спирулина пищевая; *Spirulina platensis*; биомасса; каротиноиды; фикоцианин; белок; тонкослойная хроматография; спектрофотометрия; стандартизация.

CURRENT ASPECTS OF STANDARDIZATION OF *SPIRULINA PLATENSIS* BIOMASS

A.A. Kosenko, S.V. Pervushkin, N.N. Zhelonkin, A.V. Kurkina

Samara State Medical University, Samara, Russia

To cite this article: Kosenko AA, Pervushkin SV, Zhelonkin NN, Kurkina AV. Current aspects of standardization of *Spirulina platensis* biomass. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhiya*. 2021;(5-6):112–117. DOI: <https://doi.org/10.55531/2072-2354.2021.21.3.112-117>

Received: 14.07.2021

Revised: 19.08.2021

Accepted: 06.09.2021

■ The food spirulina [*Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl.] is a blue-green multicellular filamentous microscopic alga widely cultivated in many countries of the world, including the Russian Federation. The aim of this study is to develop approaches to the standardization of biomass of *Spirulina platensis*. As a result of the conducted research, approaches to the standardization of biomass of *Spirulina platensis* have been developed. It is aimed to determine the content of β -carotene, phycocyanin and proteins by using TLC and spectrophotometry. It was determined that the content of β -carotene in the samples of biomass of *Spirulina platensis* calculated on absolutely dry raw material varies from 63.0 mg% to 94.0 mg%, phycocyanin from 3.50% to 4.30% and protein from 53.50% to 61.09%. It was established that β -carotene, C-phycocyanin and protein were the most important diagnostically significant biologically active compounds of the biomass of *Spirulina platensis*. The analytical aspects of the study of *Spirulina platensis* biomass considered in this paper are the scientific basis for the substantiation of the creation of pharmaceuticals based on it.

■ **Keywords:** spirulina; *Spirulina platensis*; biomass; carotenoids; phycocyanin; protein; thin-layer chromatography; spectrophotometry; standardization.

Введение

Спирулина пищевая [*Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. = syn. *Arthrospira platensis*] — сине-зеленая многоклеточная нитчатая ми-

кроскопическая водоросль, древнейшее реликтовое растение (возраст около 500 млн лет). Следует отметить, что в литературе до сих пор не сложился русский эквивалент

видового наименования. Впервые видовое название «Спирулина пищевая» ввел профессор В.А. Куркин в 2009 г. на основе терминологического анализа французского слова *platensis* — пищевой [5].

Ареал спирулины — Африка (оз. Чад), Юго-Восточная Азия и Южная Америка, где местное население издавна употребляло ее в пищу. С 70-х годов XX в. эту водоросль широко культивируют во многих странах мира, в том числе в Российской Федерации (Москва, Самара, Сочи и др.) [1–4, 6–8].

Спирулина — необычное растение: она относится к прокариотам и подобно бактериям не имеет четко обособленного клеточного ядра, окруженного ядерной оболочкой. Метаболизм спирулины, как и других сине-зеленых водорослей, во многом аналогичен метаболизму бактерий, поэтому их часто называют цианобактериями. Уникально также сочетание в спирулине двух свойств: способности к фотосинтетической продукции кислорода и фиксации атмосферного азота [7].

Фитомасса спирулины содержит белки (около 60 %), каротиноиды (30–180 мг%), витамины С, Е, В₁, В₂, В₆, В₁₂, фолиевую кислоту, свободные аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, эссенциальные фосфолипиды, микро- и макроэлементы (калий, натрий, магний, кальций, железо, цинк, йод и др.), полисахариды (около 15 %), представленные гликогеном [7]. Интересно, что наличие гликогенподобного вещества подтверждает эволюционное родство спирулины с животным миром. Среди пигментов (кроме каротиноидов и хлорофилла) особое значение имеет уникальное вещество белковой природы — С-фикоцианин (9–15 %), с которым связывают антиоксидантные свойства и перспективу применения фитомассы спирулины для лечения онкологических заболеваний. Уникальный химический состав, включая высокое содержание белков (60 %), объясняет пищевую значимость спирулины, что, видимо, и нашло отражение в видовом латинском названии данной сине-зеленой микроводоросли.

Биомасса спирулины широко используется для производства различных БАДов, продуктов питания и лечебно-профилактических средств, однако, на наш взгляд, более актуальны исследования по созданию лекарственных растительных препаратов, отвечающих параметрам доказательной медицины. По нашим данным, в настоящее время доказательными целесообразно рассматривать регенерирующие и общеукрепляющие свойства. Фитомасса спирулины является перспективным лечебно-

профилактическим средством, однако популярность данной водоросли пока, к сожалению, не подкреплена надежными методами стандартизации, позволяющими оценивать подлинность и качество продукции.

Интересно, что в биомассе *S. platensis* представлены практически все водо- и жирорастворимые витамины, однако данные по их количественному содержанию довольно противоречивы, что связано с использованием различных методов определения, а также влиянием условий культивирования на биосинтетические процессы.

Цель исследования — разработка подходов к стандартизации биомассы спирулины пищевой.

Материалы и методы

Материалом исследования были образцы спирулины пищевой, культивируемой в ИП «Поиск» (г. Самара).

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) осуществляли с использованием хроматографических пластинок Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ и систем растворителей: хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3), *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2), хлороформ – этанол (19 : 1). Детекцию веществ на хроматограмме осуществляли при дневном свете, в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм (до и после проявления раствором алюминия хлорида), а также проявлением щелочным раствором диазобензолсульфокислоты. Регистрацию электронных спектров проводили с помощью спектрофотометра Sperecord 40 (Analytik Jena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190–700 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Результаты и их обсуждение

При разработке методик качественного и количественного анализа биомассы спирулины за основу взяты подходы к стандартизации, которые позволяют объективно оценивать подлинность и качество данного сырья.

На наш взгляд, к надежным диагностически значимым химическим показателям качества биомассы спирулины целесообразно относить содержание каротиноидов, фикоцианина и общего белка.

В результате проведенных исследований разработана методика ТСХ-анализа каротиноидов и хлорофилла: выбраны оптимальные условия хроматографирования, позволяющие эффективно разделять и идентифицировать данные соединения. В результате проведенных

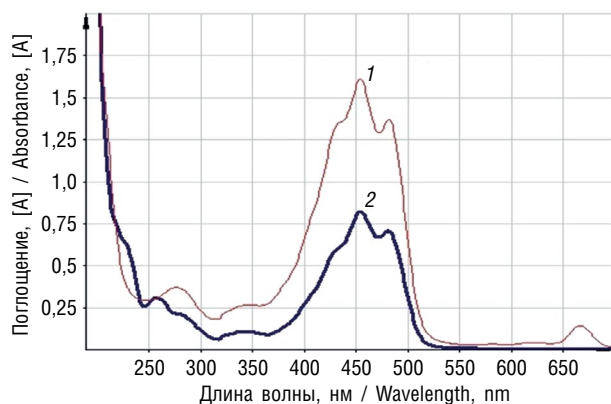


Рис. 1. Электронные спектры гексанового раствора суммы каротиноидов, полученных из биомассы спирулины (1), и испытуемого раствора после очистки на Al_2O_3 (2)

Fig. 1. Electronic spectra of the hexane solution of the total carotenoids obtained from the biomass of *Spirulina platensis* (1) and the test solution after the purification on Al_2O_3 (2)

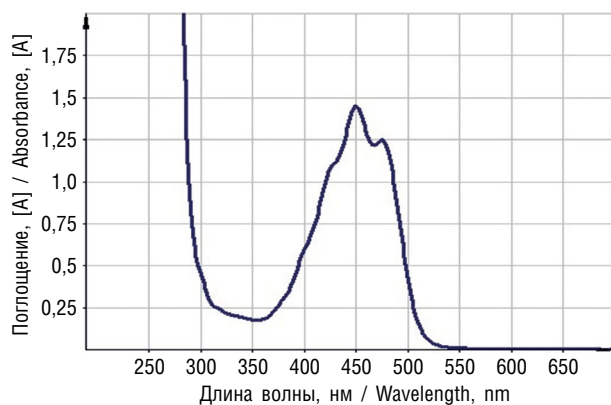


Рис. 2. Электронный спектр гексанового раствора β -каротина

Fig. 2. Electronic spectra of hexane solution of β -carotene

экспериментов с различными хроматографическими системами предпочтение было отдано системе хлороформ – этанол в соотношении 19 : 1. На хроматограммах обнаружены доминирующее пятно желтого цвета с величиной R_f около 0,8 (β -каротин) и пятно зеленого цвета с величиной R_f около 0,9 (хлорофилл А).

Доминирующий каротиноид биомассы *S. platensis* — β -каротин, содержание которого составляет от 30 до 60 % общей суммы всех каротиноидов [7]. В этой связи принципиально важным является определение в биомассе не суммы каротиноидов, а β -каротина.

В результате проведенных исследований определено, что оптимальным экстрагентом служит ацетон, обеспечивающий полноту извлечения каротиноидов из биомассы

спирулины и возможность последующей рекстракции в другой неполярный растворитель, например *n*-гексан.

В соответствии с этим в разработанной методике спектрофотометрического определения β -каротина экстракцию из биомассы *Spirulina platensis* проводили ацетоном, выделенные каротиноиды переводили в слой *n*-гексана. Полученный гексановый раствор подвергали хроматографической очистке на оксиде алюминия II степени активности по Брокману, обеспечивающей отделение β -каротина от сопутствующих пигментов, поглощающих при аналитической длине волны 450 нм. Объективным критерием полноты очистки испытуемого раствора считали схожесть электронных спектров поглощения гексанового раствора после очистки фильтрацией через слой алюминия оксида (рис. 1) и спектров поглощения рабочего стандартного образца β -каротина (рис. 2).

Расчет количественного содержания β -каротина проводили с использованием удельного показателя поглощения рабочего стандартного образца β -каротина (2773) в *n*-гексане при длине волны 450 нм.

Методика количественного определения β -каротина в биомассе спирулины. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 1,0 г измельченного сырья (точная навеска) тщательно перемешивают в течение 10 мин с 10 мл ацетона в стеклянной колбе со шлифом при комнатной температуре и центрифугируют в течение 15 мин при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость декантируют. Осадок ресуспендируют 10 мл ацетона, тщательно перемешивают и центрифугируют при 8000 об/мин (операции повторяют дважды). Ацетоновые экстракты объединяют, фильтруют под вакуумом через стеклянный фильтр ПОР-16. Фильтр промывают ацетоном, объединенный экстракт количественно переносят в делительную воронку, куда добавляют 10 мл воды очищенной. Каротиноиды из водно-ацетонового раствора извлекают последовательно 20, 10 и 10 мл *n*-гексана, каждый раз после встряхивания оставляя смесь до полного разделения слоев. После расслаивания нижний водно-ацетоновый слой сливают и отбрасывают.

Содержание β -каротина в пересчете на абсолютно сухое сырье в мг% (X) вычисляют по соответствующей формуле [7, 8].

Определено, что содержание β -каротина в образцах биомассы спирулины в пересчете на абсолютно сухое сырье варьирует от 63,0 до 94,0 мг%.

Наряду с анализом β -каротина важным является определение диагностически значимого биологически активного соединения — фикоцианина, представляющего собой водорастворимый фикобилипротеиновый пигмент. Следовательно, идентификация и количественное определение специфического пигмента фикоцианина в биомассе спирулины — один из ключевых моментов в определении ее подлинности.

Для определения содержания фикоцианина предложен спектрофотометрический метод — обнаружение характерного максимума поглощения при 620 ± 2 нм (рис. 3). Выбор данного максимума поглощения обусловлен способом выделения фикоцианина, так как присутствующие в водном извлечении спирулины водорастворимые белки значительно поглощают в УФ-области (около 270 и 360 нм), максимум при 620 нм, и не являются характерными для фикоцианина (рис. 4). В качестве экстрагента нами предложен фосфатный буфер (рН 7,0), позволяющий, с одной стороны, исчерпывающе извлекать фикоцианин (рис. 5), а с другой — обеспечивать его стабильность.

Некоторые авторы отмечают наличие у фикоцианина двух максимумов в спектре поглощения — 360 и 620 нм, другие — только один при 620 нм. В отдельных исследованиях указывается также на существование максимума при 278 нм [7]. Данные различия, очевидно, обусловлены использованием различных методических подходов к выделению фикоцианина, характером экстрагента, а также условиями культивирования спирулины.

По калибровочному графику был определен удельный показатель поглощения 8,97, который в дальнейшем использовался при расчетах результатов количественного определения.

Методика количественного определения фикоцианина в биомассе спирулины. Аналитическую пробу сырья экстрагируют ацетоном в аппарате Сокслета до прекращения окрашивания последнего. Затем пробу высушивают в вытяжном шкафу при комнатной температуре до постоянной массы, измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Около 0,5 г сырья (точная навеска) перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин с 30 мл фосфатного буферного раствора и центрифугируют в течение 15 мин при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Осадок ресуспендируют 10 мл фосфатного буферного раствора, тщательно перемешивают и центрифугируют при 8000 об/мин (операцию повторяют). Надосадочную жидкость переносят в мерную

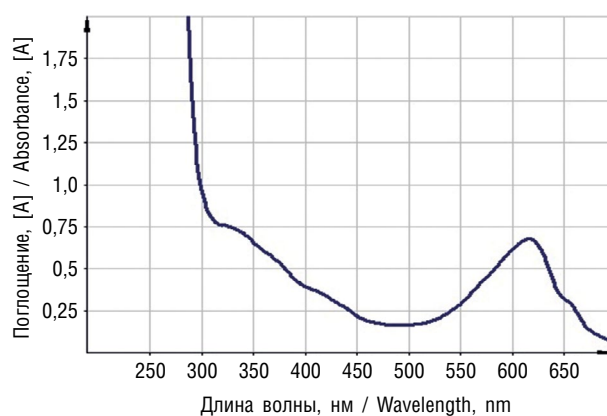


Рис. 3. Электронный спектр раствора фикоцианина, полученного из биомассы *Spirulina platensis*

Fig. 3. Electronic spectra of phycocyanin solution, obtained from *Spirulina platensis* biomass

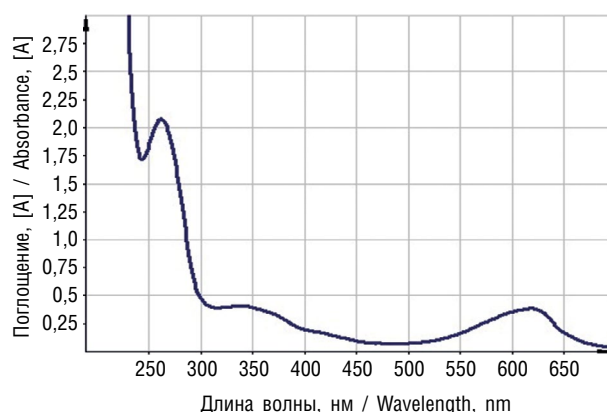


Рис. 4. Электронный спектр растворов водного извлечения из биомассы *Spirulina platensis*

Fig. 4. Electronic spectrum of solutions of water extraction from *Spirulina platensis* biomass

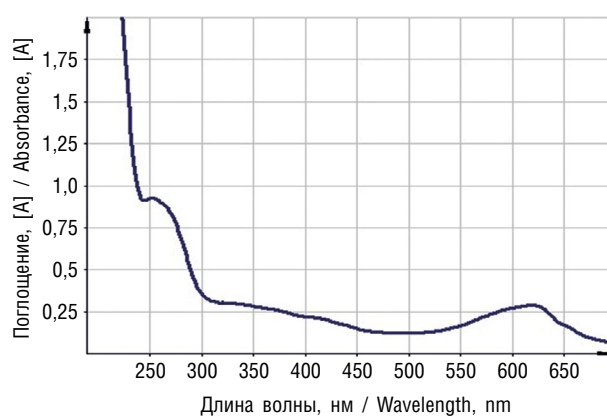


Рис. 5. Электронный спектр испытуемого раствора, полученного с использованием фосфатного буфера из биомассы *Spirulina platensis*

Fig. 5. Electronic spectrum of the test solution obtained with the use of phosphate buffer from *Spirulina platensis* biomass

колбу, доводят объем фосфатным буферным раствором до 50 мл и перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 620 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют фосфатный буферный раствор.

Содержание фикоцианина в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по соответствующей формуле [7, 8].

Определено, что содержание фикоцианина в образцах биомассы спирулины в пересчете на абсолютно сухое сырье варьирует от 3,50 до 4,30 %.

На наш взгляд, в плане стандартизации биомассы спирулины, а также лекарственных препаратов на ее основе актуальным также является необходимость количественного определения не только β -каротина и фикоцианина, но и общего белка. В этой связи нами предложена методика количественного определения в биомассе спирулины общего белка [7].

Методика количественного определения белка в биомассе спирулины. Осадок после центрифугирования, полученный в методике количественного определения β -каротина, высушивают в вытяжном шкафу при комнатной температуре в течение 20–30 мин. Около 0,1 г (точная навеска) осадка ресуспендируют с помощью 10 мл воды очищенной при комнатной температуре. Гомогенат центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость декантируют. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 4 мл биуретового реактива, перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь 1 мл воды очищенной и 4 мл биуретового реактива. Калибровочный график строят в пределах концентрации от 1 до 10 мг/мл стандартного образца белка используют сывороточный альбумин человека.

Содержание белка в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по соответствующей формуле [7]. Определено, что содержание белка в образцах биомассы спирулины в пересчете на абсолютно сухое сырье варьирует от 53,50 до 61,09 %.

Заключение

В результате проведенных исследований разработаны подходы к стандартизации спирулины пищевой, заключающиеся в опреде-

лении содержания β -каротина, фикоцианина и белков с использованием ТСХ и спектрофотометрии.

Установлено, что β -каротин, С-фикоцианин и белок служат важнейшими диагностически значимыми биологически активными соединениями биомассы спирулины пищевой. Рассмотренные в настоящей работе аналитические аспекты исследования биомассы спирулины пищевой могут быть использованы как обоснование производства лекарственных препаратов на ее основе.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Береговая Н.М. Способы получения и использования С-фикоцианина (обзор) // Экология моря. 2010. Т. 80. С. 12–16.
2. Воронин А.В., Первушкин С.В., Шаталаев И.Ф. Влияние различных источников углерода на рост культуры *Spirulina platensis* // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. 2006. № 2(42). С. 161–167.
3. Вимер И., Вайнтрауб И.А. Фикобилипротеины из сине-зеленых водорослей // Известия АН МССР. 1987. № 4. С. 20–23.
4. Кедик С.А., Ярцев Е.И., Панов А.В. Спирулина — пища XXI века. М., 2010.
5. Куркин В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие. Самара, 2009.
6. Парчевская Д.С., Дробецкая И.В., Минюк Г.С. Системные характеристики *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler в промышленных условиях // Экология моря. 2002. Т. 60. С. 71–74.
7. Первушкин С.В., Воронин А.В., Сохина А.А. Биомасса спирулины: исследования и перспективы использования. Самара, 2004.
8. Первушкин С.В., Маркова И.И., Куркин В.А., Желонкин Н.Н. Разработка методик количественного определения содержания β -каротина и фикоцианина в биомассе спирулины пищевой (*Spirulina platensis*) // Фундаментальные исследования. 2013. № 8–6. С. 1426–1429.

References

1. Beregovaya NM. Methods of C-phycocyanin receiving and its use (review). *Ecologiya moray*. 2010;80:12–16. (In Russ.)
2. Voronin AV, Pervushkin SV, Shatalaev IF. Vliianie razlichnykh istochnikov ugleroda na rost kultury *Spirulina platensis*. *Vestnik of Samara University. Natural Science*. 2006;(2(42)):161–167. (In Russ.)
3. Vimer I, Weintraub IA. Fikobiliproteiny iz sine-zele-nykh vodoroslei. *Izvestiya. AN MSSR*. 1987;(4):20–23. (In Russ.)

4. Kedik SA, Yartsev EI, Panov AV. *Spirulina – pishcha XXI veka*. Moscow; 2010. (In Russ.)
5. Kurkin VA. *Fundamentals of phytotherapy: textbook*. Samara; 2009. (In Russ.)
6. Parchevskaya DS, Drobetskaya IV, Minyuk GS. System characteristics of *Spirulina platensis* (nordst.) geitler under industrial conditions. *Ecologiya morya*. 2002;60:71–74. (In Russ.)
7. Pervushkin SV, Voronin AV, Sokhina AA. *Spirulina biomass: research and prospects of use*. Samara; 2004. (In Russ.)
8. Pervushkin SV, Markova II, Kurkin VA, Zhelonkin NN. The development of the methodics of the quantitative determination of content of β -carotene and phycocyanin in the biomass of *spirulina platensis*. *Fundamentalnye issledovaniia*. 2013;(8–6):1426–1429. (In Russ.)

■ Информация об авторах

Анна Александровна Косенко — аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия. E-mail: a.a.kosenko@samsmu.ru

Сергей Васильевич Первушкин — доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия. E-mail: texnologi-samgmu@yandex.ru

Николай Николаевич Желонкин — кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия. E-mail: texnologi-samgmu@yandex.ru

Анна Владимировна Куркина — доктор фармацевтических наук, заведующая кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологий. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара, Россия. E-mail: a.v.kurkina@samsmu.ru

■ Information about the authors

Anna A. Kosenko — Postgraduate student, Department of Pharmaceutical Technology with the Course of Biotechnologies. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: a.a.kosenko@samsmu.ru

Sergey V. Pervushkin — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Professor of the Department of Pharmaceutical Technology with the Course in Biotechnologies. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: texnologi-samgmu@yandex.ru

Nikolai N. Zhelonkin — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Technology with the Course in Biotechnologies. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: texnologi-samgmu@yandex.ru

Anna V. Kurkina — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Head of the Department of Pharmaceutical Technologies with the Course of Biotechnologies. Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: a.v.kurkina@samsmu.ru