

УДК 577.19

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СБОРА БИОМАССЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ *Arthrospira platensis* ОТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИСПОЛЬЗУЕМОГО ХИТОЗАНА

© 2024 г. Д. В. Сухинов¹*, А. А. Захаревич¹, Я. Э. Сергеева^{1, 2}¹ФГБУ Национальный исследовательский центр “Курчатовский Институт”, Москва, 123182 Россия²Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия

*e-mail: sukhinov.dv@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 07.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Проведена оценка эффективности использования хитозанов с различными характеристиками (молекулярная масса, вязкость и степень деацетилирования), при сборе биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* методом флокуляции. Показано, что молекулярная масса полимера является основной характеристикой, влияющей на данный процесс. Эффективность флокуляции для всех испытанных образцов хитозана достигла 90% в течение часа после начала процесса. При использовании в качестве флокулянта хитозанов с молекулярной массой 250 ± 50 кг/моль и степенью деацетилирования $65 \pm 5\%$ для достижения эффективности флокуляции 95% потребовалось не более 5 мин. Из полученной в результате флокуляции биомассы проводили одностадийную экстракцию фикобилипротеинов – С-фикоцианина и аллофикоцианина. Применение хитозана в процессе сбора биомассы не повлияло на степень извлечения фикобилипротеинов, однако повысило чистоту и антиоксидантную активность первичного экстракта на 41–50% и 30% соответственно относительно контроля в зависимости от характеристик хитозана. Таким образом, использование природного биополимера хитозана в процессе флокуляции суспензии клеток цианобактерии *A. platensis* значительно сокращает время сбора биомассы и повышает чистоту первичных экстрактов фикобилипротеинов, что позволяет использовать их в пищевой и косметической промышленности, минуя дополнительную стадию очистки.

Ключевые слова: С-фикоцианин, *Arthrospira platensis*, хитозан, флокуляция

DOI: 10.56304/S0234275824010101

Сегодня промышленное производство микроводорослей и цианобактерий сталкивается с крайне актуальной проблемой – проблемой эффективного сбора накопленной биомассы. В первую очередь это связано с расширяющимися перспективами применения биомассы фототрофных микроорганизмов и ее компонент в производстве продуктов питания, кормов для животноводства, биологически активных добавок, различных видов биотоплива, биоудобрений, биополимеров, биостимуляторов, биопестицидов, а также веществ с высокой добавленной стоимостью [1–3]. В то же время сбор биомассы микроводорослей и цианобактерий затруднен из-за низкой концентрации клеток в культуральной среде (0.5–5 г/л), а также их небольшого размера (3–20 мкм) [4, 5]. В связи с

этим именно на эту стадию приходится до 30% общих затрат на производство биомассы микроорганизмов [3, 6, 7]. На данный момент ни один из существующих методов, применяемых для фототрофных микроорганизмов нельзя считать экономически целесообразным и в то же время эффективным [8, 9]. Поэтому текущая исследовательская деятельность в этой области в основном направлена на разработку таких технологий, которые могут максимизировать количество биомассы, собираемое с литра питательной среды, при минимизации связанных с этим материальных затрат и потребления энергии.

При масштабном культивировании в открытых прудах, каскадных системах или промышленных фотобиореакторах сбор биомассы микроводорослей и цианобактерий обычно зависит от свойств используемого организма. Так, микроорганизмы, демонстрирующие естественную способность к осаждению (автофлокуляции), можно

Список сокращений: СД – степень деацетилирования, ФБП – фикобилипротеины, АОА – антиоксидантная активность.

относительно дешево осаждают в простых отстойниках, что, однако, сопряжено с длительным простаиванием оборудования из-за ненадежности и продолжительности процесса автофлокуляции, ограничено случаем суспензий высокой плотности, а также низким выходом биомассы [9, 10]. Для других микроорганизмов подбирается оптимальный вариант из следующего списка наиболее часто используемых методов: центрифугирование, фильтрация, флотация, коагуляция, флокуляция, а также электрофоретические и магнитофоретические методы [9–12]. Подбор конкретного метода основан на необходимой эффективности сбора, допустимых капитальных и эксплуатационных затратах, а также конечной цели использования собранной биомассы [9].

В качестве наиболее перспективных методов отделения биомассы фототрофных микроорганизмов от культуральной жидкости рассматриваются процессы коагуляции и флокуляции [3, 9, 13, 14]. Основа этих двух методов крайне схожа и заключается в добавлении к суспензии клеток фототрофных микроорганизмов химических реагентов (коагулянтов или флокулянтов), адсорбирующихся на поверхности клеток, нейтрализуя их отрицательный поверхностный заряд, и способствующих образованию клеточных агрегатов. При этом флокуляция рассматривается как более совершенная технология сбора биомассы микроорганизмов, поскольку кроме нейтрализации поверхностного заряда флокулянта в основном за счет длинных полимерных цепей способствуют связыванию клеток микроводорослей и цианобактерий между собой в крупные спутанные агрегаты (механизмы *patching* и *bridging*) [9, 14]. Со временем агрегаты увеличиваются в размерах и, в итоге в зависимости от их плотности либо оседают под действием силы тяжести, либо всплывают на поверхность осветленной культуральной жидкости. Широкая распространенность применения процессов коагуляции и флокуляции как при мелко-, так и при крупномасштабном производстве биомассы объясняется применимостью к различным видам фототрофных микроорганизмов и условиям культивирования, эффективностью отделения биомассы от культуральной жидкости, относительно низкими капитальными и эксплуатационными затратами, энергоэффективностью, а также неразрушающим воздействием на клетки микроорганизмов [9, 10, 14].

В качестве химических реагентов, способствующих флокуляции, могут использоваться органические и неорганические соединения. Среди последних чаще всего используются сульфаты и хлориды железа и алюминия, а также другие соли мультивалентных металлов [9, 15]. В случае органических флокулянтов выбирают между натуральными и синтетическими полимерными соединениями. В идеале флокулянт должен надежно и предсказуемо работать, добываться из возобновляемых

ресурсов, исключать загрязнение биомассы и извлекаемых из нее целевых веществ, допускать свое повторное использование и повторное использование культуральной жидкости, а также быть дешевым, нетоксичным, эффективным в низких концентрациях [14]. Так, для многих конечных продуктов недопустима контаминация металлами или синтетическими полимерами. Это означает, что либо после процесса флокуляции необходимо предусматривать стадию очистки биомассы, что может повысить стоимость производства продукта, либо использовать нетоксичный и биосовместимый натуральный флокулянт [9, 15].

Таким флокулянтом является хитозан – один из наиболее перспективных биоразлагаемых натуральных полимеров, который получают путем частичного деацетилирования распространенного природного полисахарида хитина. Хитозан широко применяется в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицинских технологиях, биоинженерии, пищевой промышленности и т.д. [15–17]. Эффективность его применения как флокулянта объясняется наличием длинных полимерных цепей и возможностью создания положительного заряда высокой плотности (особенно при величине рН в диапазоне 6–7), что позволяет ему собирать большие агрегаты клеток микроорганизмов (флокулы) и способствовать быстрому и эффективному сбору биомассы [18]. Положительный заряд макромолекул хитозана обусловлен наличием в цепи полимера первичных аминогрупп, которые высвобождаются в процессе деацетилирования. Этот тип функциональных групп в кислых средах присоединяет протоны, что придает хитозану свойства поликатиона [19]. Такие заряженные макромолекулы способны образовывать ионные комплексы с широким спектром природных и искусственных объектов, в том числе, с отрицательно заряженными клеточными мембранами. Поэтому важнейшей характеристикой биополимера, наряду с молекулярной массой, является степень деацетилирования, которая показывает отношение числа деацетилированных звеньев к общему числу элементарных звеньев в цепи. С повышением степени деацетилирования не только улучшается растворимость полимера, но также более ярко проявляются биологические эффекты. Молекулярная масса хитозана тоже влияет на его сорбционную активность, но большую роль в сорбции-десорбции тех или иных биологических объектов будут играть гидрофильно-гидрофобные взаимодействия, поэтому зависимость от молекулярной массы не столь однозначна, как в случае степени деацетилирования [20].

Производство биомассы цианобактерий рода *Arthrospira* составляет свыше 30% от общемирового производства биомассы фототрофных микроорганизмов [21]. Следует отметить, что согласно прогнозам [3] к 2026 году мировые продажи продук-

тов на основе биомассы цианобактерий рода *Arthrospira* составят 2 миллиарда долларов США. В последние годы коммерциализации *Arthrospira* во многом способствует особо ценный компонент ее биомассы – С-фикоцианин (С-ФЦ), пигмент-белковый комплекс, выполняющий светособирающую и антиоксидантную функции в клетке [21]. Рыночный спрос на С-ФЦ в последние несколько лет постоянно растет, что вызвано возможностями его применения в пищевой, косметической, фармацевтической промышленности, медицинской диагностике и терапии, лабораторных исследованиях и некоторых других областях в качестве красителя, действующего вещества или флуоресцентной метки [22, 23]. В частности фармакологическая и физиологическая активность С-ФЦ, заключающаяся в антиоксидантном, противовоспалительном, гепатопротекторном, нейропротекторном, противоопухолевом, иммуномодулирующим действиях, потенциально позволяет применять его при лечении ряда заболеваний [24]. Таким образом, исходя из востребованности и широкой применимости этого вещества, с 2020 по 2030 год ожидается рост мирового рынка С-ФЦ более чем в 2.5 раза, до 0.4 миллиарда долларов США [23]. При этом крайне важным параметром, влияющим на область применения и стоимость С-ФЦ, является чистота (индекс чистоты) конечного вещества [23, 24]. Так, индекс чистоты менее 0.7 позволяет применять С-ФЦ лишь в пищевой промышленности, выше 1.5 – в косметической, до 3.9 – как реагент, а С-ФЦ с чистотой выше 4.0 уже применяется в фармацевтических и аналитических целях [18].

Целью настоящей работы стало изучение зависимости эффективности процесса флокуляции цианобактерии *Arthrospira platensis*, а также свойств первичных экстрактов фикобилипротеинов, включающих С-фикоцианин и получаемых из сфлюккулированной биомассы, от физико-химических свойств хитозана, используемого в качестве флокулянта.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

Объектом исследования был выбран штамм В-12619 нитевидной алкалифильной цианобактерии *Arthrospira platensis* (Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов). Культивирование проводили согласно [18], на модифицированной питательной среде Заррука (компонентный состав аналогичен [18]) в колбах Эрленмейера объемом 2 л с 1 л суспензии клеток в шейкере-инкубаторе Innova 42R (Eppendorf New Brunswick, Германия) (30°C, 140 об/мин, плотностью потока фотосинтетически активного излучения (PAR)

14–16 мкМ/(м² с)). Контроль роста и накопления биомассы проводили измерением оптической плотности (OD) при 680 и 750 нм с использованием спектрофотометра Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США).

В работе в качестве флокулянтов использовали 5 образцов хитозана с различными характеристиками (Primex ChitoClear, Сиглюфьордюр, Исландия).

Определение молекулярной массы и вязкости образцов хитозана

Молекулярную массу испытуемых образцов хитозана рассчитывали по уравнению Марка–Куна–Хаувинка (уравнение 1), при этом характеристическую вязкость растворов полимеров исследовали методом капиллярной вискозиметрии на вискозиметре Уббелоде. Измерения проводили при 25°C, в качестве растворителя использовали натрий-ацетатный буфер с pH = 4.5 ($K = 1.38 \times 10^{-4}$, $\alpha = 0.85$).

$$[\eta] = KM_{\eta}^{\alpha}, \quad (1)$$

где: $[\eta]$ – характеристическая вязкость раствора полимера (определяют путем экстраполяции на нулевую концентрацию), M_{η} – средневязкостная молекулярная масса полимера, K и α – константы, величина которых зависит от температуры и природы полимера.

Определение степени деацетилирования образцов хитозана

Степень деацетилирования (СД) хитозана определяли методом ЯМР спектроскопии и методом потенциометрического титрования.

При определении СД методом ЯМР спектроскопии концентрации исследованных растворов хитозана в смеси DCl/D₂O 1 : 99 (w/w) составили 1–2 мг/мл. Выбор концентрации обусловлен высокой вязкостью растворов, что вызывает затруднения при измерениях. Спектры были получены на спектрометре Bruker AVANCE™ 400 (Bruker, США) с рабочей частотой 400 МГц и внутренним стандартом Me₄Si. Измерения проводили при 40°C.

Степень деацетилирования рассчитывали по уравнению 2.

$$DD(\%) = \left(1 - \frac{\frac{1}{3} I(NH_{Ac})}{\frac{1}{6} I(H_{2-6})} \right) \times 100, \quad (2)$$

где:

$I(NH_{Ac})$ – интенсивность сигнала протонов, связанных с азотом в ацетилированных звеньях;

$I(H_{2-6})$ – интенсивность сигнала протонов 2–6 в глюкозаминном цикле.

Для определения СД методом потенциометрического титрования использовали разбавленные растворы хитозана в 0.1 М HCl (начальная концентрация хитозана 0.5% масс.). В качестве титранта применяли 0.1 М водный раствор NaOH, рН растворов определяли по показаниям рН-метра/ионометра Mettler-Toledo SevenCompact (Mettler-Toledo, Швейцария).

Степень деацетилирования хитозана после титрования определяли по уравнению 3.

$$\text{СД}(\%) = \frac{203.2 \times 100}{[42 + 1000m_0/K(V_2 - V_1)]}, \quad (3)$$

где:

K – коэффициент поправки титранта;

V_1 и V_2 – объем титранта израсходованный для достижения первой и второй точек эквивалентности соответственно, мл;

m_0 – масса навески хитозана;

203.2 – ММ (молекулярная масса) мономерного звена хитозана;

42 – разница между ММ мономерного звена хитина и хитозана;

100 и 1000 – коэффициенты пересчета [25].

Проведение процессов флокуляции биомассы цианобактерий и экстракции фикобилипротеинов

Общий ход экспериментов по флокуляции был построен аналогично описанному в работе [18]. Стоковые растворы исследуемых образцов хитозана концентрацией 3 г/л получали в 1%-ной уксусной кислоте. Флокуляцию проводили в лабораторных стаканах объемом 100 мл, содержащих 50 мл суспензии *A. platensis*, предварительно доводя величину рН от 9.93 ± 0.02 до 6.40 ± 0.05 добавлением к суспензии 9 мл 1N HCl. Затем, в полученную смесь вносили 2 мл базового раствора хитозана для достижения конечной концентрации 100 мг/л. Образцы перемешивали магнитной мешалкой в течение 1 мин для ускорения процесса растворения и оставляли при комнатной температуре для наблюдения за процессом флокуляции и определения ее эффективности (ЭФ), которую рассчитывали по оптической плотности аликвот флокулирующего образца (OD_{ϕ}) и контроля (OD_{κ}) по формуле:

$$\text{ЭФ}(\%) = \left(1 - \frac{OD_{\phi}}{OD_{\kappa}}\right) \times 100. \quad (4)$$

В качестве контроля использовали суспензию *A. platensis*, в которую добавляли дистиллированную воду объемом, аналогичным объему растворов, приливаемых в опытные образцы, для исключения влияния эффекта разбавления. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. После окончания эксперимента (спустя 1 ч после

начала процесса флокуляции) опытные образцы декантировали, в то время как контрольные центрифугировали при 6300 g (центрифуга Thermo Fisher Scientific SL40R,) в течение 10 мин. Затем биомассу всех образцов промывали дистиллированной водой от адсорбированных солей и снова центрифугировали (6300 g, 10 мин).

Из собранной влажной биомассы проводили ищераывающую экстракцию фикобилипротеинов путем трехкратного цикла замораживания/оттаивания при $-22^{\circ}\text{C}/25^{\circ}\text{C}$ и последующей инкубации при 4°C в течение ночи в 0.2 М натрий фосфатном буфере (рН 7.00 ± 0.02). После этого образцы центрифугировали (17500 g, 30 мин, 4°C , центрифуга Thermo Fisher Scientific SL40R,) для отделения остатков разрушенных клеток. Спектры поглощения полученного супернатанта (первичного экстракта) снимали на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific,) в диапазоне 190–700 нм.

Концентрацию и содержание фикобилипротеинов (С-фикоцианина и аллофикоцианина) в первичном экстракте рассчитывали по уравнениям (5), (6) [26]:

$$\text{С-PC}_{\nu} \text{ (мг/мл)} = \frac{(A_{620} - 0.474A_{650})}{5.34}, \quad (5)$$

$$\text{APC}_{\nu} \text{ (мг/мл)} = \frac{(A_{650} - 0.208A_{620})}{5.09}, \quad (6)$$

где:

A_{λ} – поглощение при длине волны λ нм;

Индекс чистоты (PI) определяли по уравнению (7) [27]:

$$\text{PI} = \frac{A_{620}}{A_{280}}, \quad (7)$$

где:

A_{λ} – поглощение при длине волны λ нм.

Антиоксидантная активность ФБП

Определение антиоксидантной активности (АОА) проводили измерением активности улавливания радикалов DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (Sigma-Aldrich, США) [18]. Экстракт или этанольный раствор антиоксидантного стандарта тролокса (Trolox, Sigma-Aldrich) смешивали с равным объемом 100 мкМ этанольного раствора DPPH. Полученные смеси инкубировали в темноте при 25°C в течение 30 мин. После чего измеряли поглощение при длине волны 517 нм против этанола. Процент ингибирования свободных радикалов рассчитывали по уравнению (8):

$$\text{Ингибирование}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{обр}}}{A_{\kappa}}\right) \times 100, \quad (8)$$

где:

$A_{обр}$ и A_k – поглощение исследуемого и контрольного образца соответственно. В качестве контроля использовался 50 мкМ этанольный раствор DPPH.

Эквивалентную антиоксидантную способность в единицах тролокса (ТЕАС) определяли количественно с использованием кривых ингибирования тролокса и ФБП, выражали в микромолях тролокс эквивалента (ТЕ) на грамм сухой массы образца (мкМ ТЕ/г).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение характеристик хитозана

Метод капиллярной вискозиметрии хорошо зарекомендовал себя как способ определения молекулярной массы хитозана, поскольку не только не требует сложного и дорогостоящего оборудования, но и позволяет исследовать образцы в широком диапазоне молекулярных масс, несмотря на их склонность к формированию агрегатов, а также позволяет исключить сорбцию части макромолекул на зернах сорбента, как это может происходить в случае гель-проникающей хроматографии [28, 29]. Применение буферного раствора позволяет точно определить молекулярную массу полиэлектролита за счет компенсации зарядов на макромолекуле и подавления эффекта полиэлектролитного набухания [30].

Типичный вид концентрационной зависимости приведенной вязкости раствора хитозана представлен на рис. 1.

Определение СД хитозана проводят различными методами, например, потенциометрическим титрованием, элементным анализом, а также с использованием различных видов спектроскопии, в том числе ЯМР ^1H -спектроскопии [25]. Эталон-

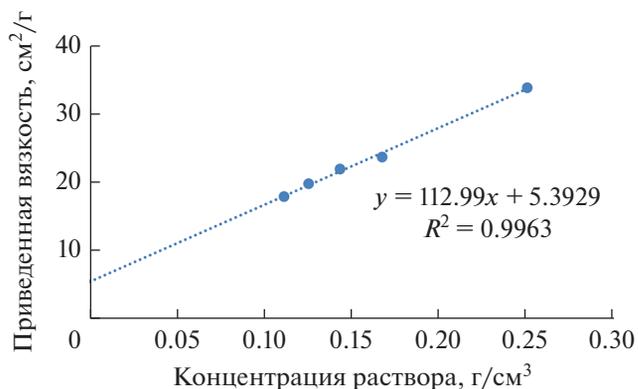


Рис. 1. Зависимость приведенной вязкости раствора хитозана от его концентрации в натрий-ацетатном буфере (pH 4.5).

Fig. 1. Dependence of the reduced viscosity of a chitosan solution on its concentration in sodium acetate buffer (pH 4.5).

ным принято считать метод ЯМР-спектроскопии, однако стоит учитывать, что конечный результат зависит не только от условий проведения эксперимента, но и от выбранной модели расчета. Также достоверные сведения о количестве первичных аминогрупп, а значит, и о степени деацетилирования, позволяет получить потенциометрическое титрование. Хотя этот метод уступает в точности ЯМР-спектроскопии, он не требует применения сложного дорогостоящего оборудования, но дает схожие результаты. В нашей работе СД определяли двумя методами: ЯМР ^1H -спектроскопией и потенциометрическим титрованием (ПТ).

В табл. 1 приведены результаты определения молекулярной массы, вязкости и СД исследуемых хитозанов.

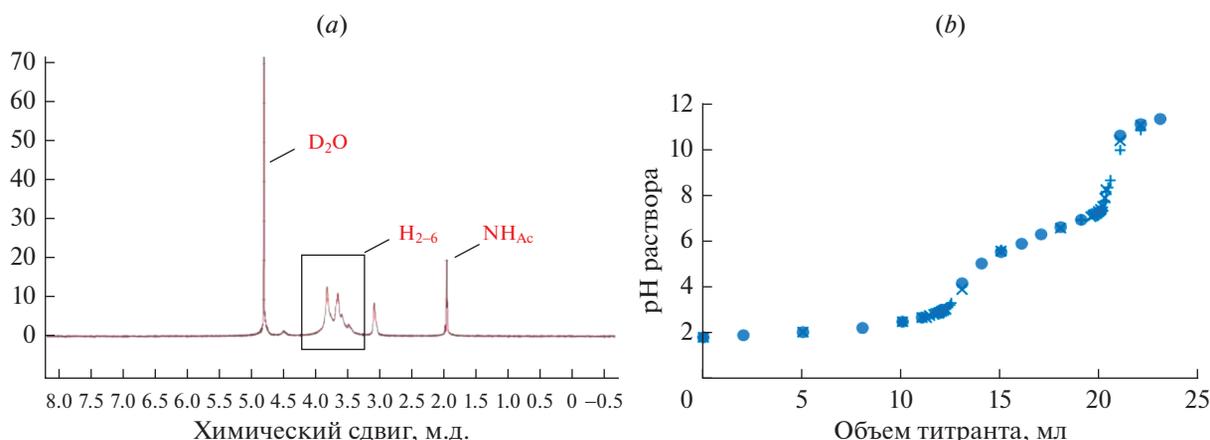


Рис. 2. Определение степени деацетилирования хитозана: типичный ^1H ЯМР спектр (a), кривая потенциометрического титрования (b).

Fig. 2. Determination of the deacetylation degree of chitosan: typical ^1H NMR spectrum (a), potentiometric titration curve (b).

Таблица 1. Основные характеристики исследуемых хитозанов
Table 1. Main characteristics of the studied chitosan samples

№ образца	M_w , кг/моль	Вязкость, сП (1%-ный р-р в 1%-ной CH_3COOH)	СД, %	
			ЯМР ^1H	ПТ
1	26	<20	78 ± 4	69
2	149	200–600	64 ± 4	56
3	313	200–600	68 ± 3	62
4	594	1200–2000	59 ± 1	59
5	253	1200–2000	66 ± 3	60

Культивирование *A. platensis* и определение содержания фикобиллипротеинов

Основываясь на результатах предыдущей работы [18], культивирование цианобактерии *A. platensis* проводили до начала фазы линейного роста (постоянная абсолютная скорость роста), достигнутой в указанных условиях на 7–8 сутки. На этой стадии концентрация биомассы достигала значений 0.50 ± 0.05 г/л, а суммарное содержание ФБП в биомассе $21 \pm 1\%$ (155 ± 5 и 54 ± 3 мг/г С-фикоцианина (С-РС) и аллофикоцианина (АРС) соответственно). При этом, согласно предыдущим исследованиям, С-РС, выделенный из биомассы этой стадии роста обладал, наибольшим индексом чистоты [18], поэтому в данном исследовании эксперименты по флокуляции проводи-

ли для суспензии цианобактерии *A. platensis* именно этой стадии роста.

Влияние характеристик хитозана на эффективность флокуляции

Ранее [18] нами было показано, что для эффективной флокуляции цианобактерии *A. platensis* и получения ФБП максимальной чистоты концентрация хитозана в конечном растворе должна составлять 100 мг/л.

Результаты изучения процессов флокуляции *A. platensis* при последующем добавлении стоковых растворов хитозана представлены на рис. 3 в виде тепловой карты зависимости ЭФ от молекулярной массы хитозана и времени, прошедшего с начала процесса.

Как видно из рис. 3, вне зависимости от характеристик использованного хитозана процесс флокуляции наблюдался для всех исследованных образцов. При этом спустя 60 мин после начала процесса ЭФ превысила 90% для всех использованных хитозанов. Однако в течение первых 10 мин, прошедших с момента добавления флокулянта, очевидно наличие области оптимальных молекулярных масс хитозана, а именно область средних молекулярных масс (150–250 кг/моль). Образцы хитозана с молекулярной массой, лежащей именно в этом диапазоне (№ 2 и 5), спустя буквально 5–10 мин после добавления стоковых растворов флокулянта показали эффективность сбора биомассы цианобактерии более 90%, а со временем превысили и величину в 95%.

Настолько же явной зависимости эффективности процесса флокуляции от других параметров используемых хитозанов (вязкость и СД) выявлено не было. Данный факт может указывать на следующее: 1) изучаемый процесс сбора биомассы слабо или вовсе не зависит от указанных характеристик флокулянта; 2) исследуемая выборка хитозанов недостаточна для выявления данной зависимости. Вязкость стокового раствора хитозана действительно не должна существенно влиять на результат флокуляции, поскольку стоко-

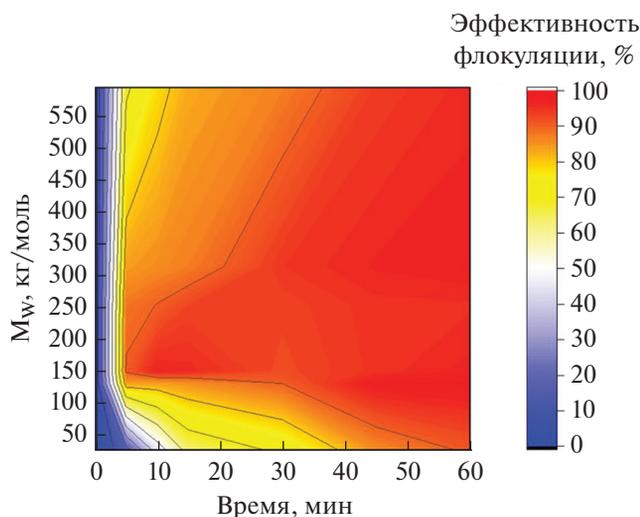


Рис. 3. Тепловая карта, демонстрирующая зависимость эффективности флокуляции суспензии цианобактерии *A. platensis* от молекулярной массы хитозана и времени, прошедшего с начала процесса.

Fig. 3. Heat map showing the dependence of the flocculation efficiency of cyanobacteria *A. platensis* suspension on the molecular weight of chitosan and the time elapsed from the beginning of the process.

Таблица 2. Зависимость индекса чистоты (PI) и антиоксидантной активности (АОА) первичных экстрактов фикобилипротеинов от характеристик используемых хитозанов
Table 2. Dependence of the primary phycobiliprotein extracts purity index (PI) and antioxidant activity (АОА) on the characteristics of the chitosan samples used

№ п/п	Mw, кг/моль	Вязкость, сП	СД, %	PI	АОА, мкмоль ТЕ/г
Контроль	—	—	—	1.27 ± 0.02	158.1 ± 2.6
1	26	<20	78 ± 4	1.90 ± 0.01	190.3 ± 1.5
2	149	200–600	64 ± 4	1.85 ± 0.02	187.3 ± 1.8
3	313	200–600	68 ± 3	1.84 ± 0.01	203.3 ± 2.7
4	594	1200–2000	59 ± 1	1.91 ± 0.01	181.5 ± 2.2
5	253	1200–2000	66 ± 3	1.79 ± 0.02	205.3 ± 1.8

вый раствор разбавляется примерно в 30 раз при добавлении к суспензии клеток. Что касается СД, то она напрямую влияет на заряд, который способна приобрести отдельная полимерная молекула хитозана, что теоретически должно влиять на процесс флокуляции. Для всех исследуемых образцов эта величина лежала в диапазоне 58–82%, что, по-видимому, было достаточно для крайне эффективной флокуляции, но недостаточно для выявления возможных различий.

Влияние характеристик хитозана на характеристики первичных экстрактов фикобилипротеинов

Из всех образцов, подвергнутых флокуляции, а также контрольных образцов была проведена экстракция ФБП. Аналогично работе [18], хитозан вне зависимости от характеристик, не оказал существенного статистически значимого влияния на степень извлечения С-фикоцианина и аллофикоцианина ($p < 0.05$). Так, количество С-фикоцианина и аллофикоцианина, полученных с контрольного образца составляло 4.05 ± 0.12 и 1.46 ± 0.07 мг соответственно, в то время как для сфлокулированных образцов суспензии эти значения составили 3.90 ± 0.15 и 1.40 ± 0.05 мг соответственно.

С другой стороны, чистота первичных экстрактов ФБП статистически значимо зависела от используемого хитозана (табл. 2). Так, наибольшие значения PI – 1.90 ± 0.01 – соответствуют флокулянтам с наибольшей и наименьшей молекулярной массой и СД (№ 1 и 4). Тем не менее, различия между значениями PI, достигнутыми при использовании разных хитозанов не превышают 7% (повышение чистоты на 41–50% относительно контроля), а значит полученный экстракт можно использовать в пищевой и косметической промышленности [18, 31].

Что касается АОА первичных экстрактов фикобилипротеинов, то наблюдалась общая тенденция к росту этого показателя у образцов, выделенных из биомассы, собранной с помощью процесса

флокуляции, от 15% у образца № 2 до 30% у образца № 5 относительно контроля (табл. 2). Кроме того, в имеющихся данных прослеживается зависимость – максимальная величина АОА, более 200 мкмоль ТЕ/г, наблюдалась для образцов, полученных при флокуляции хитозанами № 3 и 5, характеризующимися средней молекулярной массой (253–313 кг/моль) и средней же степенью деацетилирования ($67 \pm 4\%$).

Таким образом, на основании полученных данных, можно заключить, что использование природного биополимера хитозана в процессе флокуляции суспензии клеток цианобактерии *A. platensis* и дальнейшей экстракции фикобилипротеинов: значительно сокращает время сбора биомассы, способствует повышению величины антиоксидантной активности и индекса чистоты фикобилипротеинов, что позволяет использовать их в пищевой и косметической промышленности, минуя дополнительную стадию очистки. Из трех исследованных характеристик хитозана (молекулярная масса, вязкость и степень деацетилирования) именно молекулярная масса являлась основной характеристикой, влияющей на процесс флокуляции. Согласно полученным результатам применение в качестве флокулянта хитозана с молекулярной массой 250 ± 50 кг/моль и степенью деацетилирования $65 \pm 5\%$ обеспечивало наилучшие показатели, как в процессе сбора биомассы, так и при исследовании характеристик выделенных фикобилипротеинов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Masojídek J., Lhotský R., Štěrbová K., Zittelli G.C., Torzillo G. Solar Bioreactors Used for the Industrial Production of Microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,

- 2023, 292, 121946.
<https://doi.org/10.1007/s00253-023-12733-8>
2. *Tanvir R.U., Zhang J., Canter T., Chen D., Lu J., Hu Z.* Harnessing Solar Energy Using Phototrophic Microorganisms: A Sustainable Pathway to Bioenergy, Biomaterials, and Environmental Solutions. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2021, 146, 111181.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111181>
 3. *Loke Show P.* Global Market and Economic Analysis of Microalgae Technology: Status and Perspectives. *Bioresour. Technol.*, 2022, 357.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127329>
 4. *Alam A., Vandamme D., Chun W., Zhao X., Foubert I., Wang Z., Muylaert K., Yuan Z.* Bioflocculation as an Innovative Harvesting Strategy for Microalgae. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 2016, 15, 573–583.
<https://doi.org/10.1007/s11157-016-9408-8>
 5. *Matter I.A., Hoang Bui V.K., Jung M., Seo J.Y., Kim Y.E., Lee Y.C., Oh Y.K.* Flocculation Harvesting Techniques for Microalgae: A Review. *Appl. Sci.*, 2019, 9, 3069.
 6. *Fasaei F., Bitter J.H., Slegers P.M., van Boxtel A.J.B.* Techno-Economic Evaluation of Microalgae Harvesting and Dewatering Systems. *Algal Res.*, 2018, 31, 347–362.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.038>
 7. *Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F.* Dual Role of Microalgae: Phycoremediation of Domestic Wastewater and Biomass Production for Sustainable Biofuels Production. *Appl. Energy*, 2011, 88, 3411–3424.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
 8. *Iasimone F., Seira J., Panico A., De Felice V., Pirozzi F., Steyer J.P.* Insights into Bioflocculation of Filamentous Cyanobacteria, Microalgae and Their Mixture for a Low-Cost Biomass Harvesting System. *Environ. Res.*, 2021, 199, 111359.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111359>
 9. *Li S., Hu T., Xu Y., Wang J., Chu R., Yin Z., Mo F., Zhu L.* A Review on Flocculation as an Efficient Method to Harvest Energy Microalgae: Mechanisms, Performances, Influencing Factors and Perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2020, 131, 110005.
 10. *Shaikh S.M.R., Quadir M.A., Nasser M.S., Rekik H., Hassan M.K., Ayesh A.I., Sayadi S.* Investigation of Flocculation and Rheological Properties of Microalgae Suspensions Cultivated in Industrial Process Wastewater. *Sep. Purif. Technol.*, 2024, 328, 125016.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.125016>
 11. *Yin Z., Zhu L., Li S., Hu T., Chu R., Mo F., Hu D., Liu C., Li B.* A Comprehensive Review on Cultivation and Harvesting of Microalgae for Biodiesel Production: Environmental Pollution Control and Future Directions. *Bioresour. Technol.*, 2020, 301, 122804.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>
 12. *Liu Z., Hao N., Hou Y., Wang Q., Liu Q., Yan S., Chen F., Zhao L.* Technologies for Harvesting the Microalgae for Industrial Applications: Current Trends and Perspectives. *Bioresour. Technol.*, 2023, 387, 129631.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129631>
 13. *Elcik H., Karadag D., Kara A.I., Cakmakci M.* Microalgae Biomass Harvesting Using Chitosan Flocculant: Optimization of Operating Parameters by Response Surface Methodology. *Separations*, 2023, 10, 507.
<https://doi.org/10.3390/separations10090507>
 14. *Singh G., Patidar S.K.* Microalgae Harvesting Techniques: A Review. *J. Environ. Manage.*, 2018, 217, 499–508.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
 15. *Yin Z., Chu R., Zhu L., Li S., Mo F., Hu D., Liu C.* Application of Chitosan-Based Flocculants to Harvest Microalgal Biomass for Biofuel Production: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 2021, 145, 111159.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111159>
 16. *Liu X., Liao W., Xia W.* Recent Advances in Chitosan Based Bioactive Materials for Food Preservation. *Food Hydrocoll.*, 2023, 140, 108612.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108612>
 17. *Kayra N., Aytakin A.Ö.* Chitosan Nanogel for Drug Delivery and Regenerative Medicine. In *Polysaccharide Hydrogels for Drug Delivery and Regenerative Medicine*; 2024; pp. 215–232.
 18. *Sukhinov D.V., Gorin K.V., Romanov A.O., Gotovtsev P.M., Sergeeva Y.E.* Increased C-Phycocyanin Extract Purity by Flocculation of *Arthrospira Platensis* with Chitosan. *Algal Res.*, 2021, 58, 102393.
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102393>
 19. *Ruel-Gariépy E., Leroux J.C.* Chitosan: A Natural Polycation with Multiple Applications. In *Polysaccharides for Drug Delivery and Pharmaceutical Applications [ACS Symposium Series]*; Marchessault, R.H., Ravenelle, F., Zhu, X.X., Eds.; 2006; Vol. 934, pp. 243–259 ISBN 0841239606.
 20. *Bekale L., Agudelo D., Tajmir-Riahi H.A.* Effect of Polymer Molecular Weight on Chitosan-Protein Interaction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2015, 125, 309–317.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.037>
 21. *Lim H.R., Khoo K.S., Chew K.W., Chang C.K., Munawaroh H.S.H., Kumar P.S., Huy N.D., Show P.L.* Perspective of Spirulina Culture with Wastewater into a Sustainable Circular Bioeconomy. *Environ. Pollut.*, 2021, 284, 117492.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117492>
 22. *Seyedi S., Parvin P., Jafarholi A., Jelvani S., Shahabi M., Shahbazi M., Mohammadimatin P., Moafi A.* Fluorescence Properties of Phycocyanin and Phycocyanin-Human Serum Albumin Complex. *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2020, 239, 118468.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118468>
 23. *Thevarajah B., Nishshanka G.K.S.H., Premaratne M., Nimarshana P.H.V., Nagarajan D., Chang J.S., Ariyadasa T.U.* Large-Scale Production of Spirulina-Based Proteins and c-Phycocyanin: A Biorefinery Approach. *Biochem. Eng. J.*, 2022, 185, 108541.
<https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2022.108541>
 24. *Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K.* Phycobiliprotein: Potential Microalgae Derived Pharmaceutical and Biological Reagent. *Biochem. Eng. J.*, 2016, 109, 282–296.
 25. *Czechowska-Biskup R., Jarosińska D., Rokita B., Ulański P., Rosiak J.M.* Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparison of Methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv.*, 2012, 17, 5–20.
 26. *Bennett A., Bogorad L.* Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga. *J. Cell Biol.*, 1973, 58, 419–435.
 27. *Boussiba S., Richmond A.E.* Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga Spiru-

- lina *Platensis*. *Arch. Microbiol.*, 1979, 120, 155–159. <https://doi.org/10.1007/BF00409102>
28. Федосеева Е.Н., Смирнова Л.А., Федосеев В.Б. Вязкостные Свойства Растворов Хитозана И Его Реакционная Способность. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*, 2008, 59–64.
29. Costa C.N., Teixeira V.G., Delpech M.C., Souza J.V.S., Costa M.A.S. Viscometric Study of Chitosan Solutions in Acetic Acid/Sodium Acetate and Acetic Acid/Sodium Chloride. *Carbohydr. Polym.*, 2015, 133, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.094>
30. Кулиш Е.И., Туктарова И.Ф., Чернова В., Абзальдинов Х.С., Заиков Г.Е. Метод Вискозиметрии Как Способ Оценки Конформационного Состояния Хитозана в Растворе. *Вестник Казанского технологического университета*, 2013, 16, 140–143.
31. Sala L., Moraes C.C., Kalil S.J. Cell Pretreatment with Ethylenediaminetetraacetic Acid for Selective Extraction of C-Phycocyanin with Food Grade Purity. *Biotechnol. Prog.*, 2018, 34, 1261–1268. <https://doi.org/10.1002/btpr.2713>

Optimization of Cyanobacteria *Arthrospira platensis* Harvesting with Chitosan to Obtain Valuable Compounds of Increased Purity

D. V. Sukhinov^{a, #}, A. A. Zakharevich^a, and Ya. E. Sergeeva^{a, b}

^aNational Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^bMoscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

[#]e-mail: sukhinov.dv@yandex.ru

Abstract—The effectiveness of using chitosans with different characteristics (molecular weight, viscosity and degree of deacetylation) when harvesting the biomass of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* by flocculation was assessed. It has been shown that the molecular weight of the polymer is the main characteristic influencing the process of biomass harvesting. The flocculation efficiency for all tested chitosan samples reached 90% within an hour of starting the process. When using chitosans with a molecular weight of 250 ± 50 kg/mol and a deacetylation degree of $65 \pm 5\%$ as a flocculant, it took less than 5 minutes to achieve a flocculation efficiency of 95%. From the biomass obtained as a result of flocculation, a one-stage extraction of phycobiliproteins—C-phycocyanin and allophycocyanin—was carried out. The use of chitosan during biomass collection did not affect the extraction degree of phycobiliproteins, but increased the purity and antioxidant activity of the primary extract by 41–50% and 30%, respectively, relative to the control, depending on the characteristics of chitosan. Thus, the use of the natural biopolymer chitosan in the flocculation process of a suspension of cyanobacterium *A. platensis* cells significantly reduces the time of biomass harvesting and increases the purity of primary phycobiliprotein extracts, which allows their use in the food and cosmetic industries, bypassing an additional purification stage.

Keywords: C-phycocyanin, *Arthrospira platensis*, chitosan, flocculation