



Оценка стабильности фикобилипротеинов оптическим методом при их хранении в водно-спиртовом растворе

И.Н. Гудвилевич✉, А.Б. Боровков

Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Российская Федерация

Аннотация. Целью работы являлась оценка стабильности пигментов, относящихся к группе фикобилипротеинов, выделенных из биомассы цианобактерии *Spirulina (Arthrospira) platensis* и красной микроводоросли *Porphyridium purpureum*. Водные экстракты фикобилипротеинов получали после двукратного замораживания сырой биомассы *Arthrospira platensis* и *Porphyridium purpureum*, экстракцию проводили фосфатным буфером (0,05 М, pH = 7) на холоде (5 °С) в течение 24 часов. К полученным экстрактам добавляли 96%-й этанол до его концентрации в растворе 20%. Хранение водно-спиртовых экстрактов фикобилипротеинов осуществляли 3 месяца, контроль концентраций пигментов проводили оптическим методом. Наибольшую стабильность при хранении продемонстрировал пигмент аллофикоцианин. Самая высокая скорость деструкции фикобилипротеинов наблюдалась при их хранении на свету при комнатной температуре. Скорость деградации пигментов в этих условиях в 9 и в 80 раз (для В-фикоэритрина и С-фикоцианина соответственно) превышала аналогичные показатели при их хранении в темноте и на холоде. Наименее стойким, по сравнению с другими исследованными фикобилипротеинами, оказался С-фикоцианин. Скорость его деградации при всех вариантах хранения была от 5 до 10 раз выше, чем В-фикоэритрина в аналогичных условиях. Обязательным условием сохранения С-фикоцианина и В-фикоэритрина в водно-спиртовых растворах являлось отсутствие света, а в случае С-фикоцианина и пониженная температура. Допустимо также хранение В-фикоэритрина в темноте при комнатной температуре. Такой режим может обеспечить сохранность до 86% пигментов в водно-спиртовых растворах на протяжении 25–30 суток.

Ключевые слова: фикобилипротеины, С-фикоцианин, В-фикоэритрин, скорость деградации, *Spirulina platensis*, *Porphyridium purpureum*

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда «Разработка научного обоснования промышленного производства функциональных продуктов питания, включающих экстракты микроводоросли порфиридиум» (№ 24-26-20131).

Для цитирования: Гудвилевич И.Н., Боровков А.Б. Оценка стабильности фикобилипротеинов оптическим методом при их хранении в водно-спиртовом растворе // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 362–370. DOI: 10.21285/achb.927. EDN: TQPEED.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Storage stability of phycobiliproteins in a hydroalcoholic solution evaluated by an optical method

Irina N. Gudvilovich✉, Andrei B. Borovkov

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS, Sevastopol, Russian Federation

Abstract. The aim was to evaluate the stability of pigments of the phycobiliprotein group extracted from the biomass of the *Spirulina (Arthrospira) platensis* cyanobacterium and the *Porphyridium purpureum* red microalgae. Water

extracts of phycobiliproteins were obtained following a double freezing of the raw biomass of *Arthrospira platensis* and *Porphyridium purpureum*. An extraction was carried out with a phosphate buffer (0.05 M, pH = 7) in the cold (5 °C) for 24 hours. To the extracts obtained, 96% ethanol was added until its concentration in the solution was 20%. The hydroalcoholic extracts of phycobiliproteins were stored for three months. Pigment concentrations were monitored by an optical method. The allophycocyanin pigment demonstrated the highest storage stability. The highest degradation rate of phycobiliproteins was observed during their storage in the light at room temperature. The degradation rate of pigments under these conditions was 9- and 80-fold higher (for B-phycoerythrin and C-phycoerythrin, respectively) than similar indices during their storage in the dark and in the cold. C-phycoerythrin was the least stable, compared to other studied phycobiliproteins. Its degradation rate under all storage options was 5- to 10-fold higher than that of B-phycoerythrin under similar conditions. An essential conservation requirement for C-phycoerythrin and β -phycoerythrin in hydroalcoholic solutions was the absence of light. For C-phycoerythrin, a low temperature was necessary as well. Storage of B-phycoerythrin in the dark at room temperature is acceptable. These conditions can ensure the conservation of up to 86% of pigments in hydroalcoholic solutions for 25–30 days.

Keywords: phycobiliproteins, C-phycoerythrin, B-phycoerythrin, degradation rate, *Spirulina platensis*, *Porphyridium purpureum*

Funding. Russian Science Foundation supported this work (project “Development of scientific substantiation of industrial production of functional food products including extracts of *Porphyridium microalgae*” no. 24-26-20131).

For citation: Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Storage stability of phycobiliproteins in a hydroalcoholic solution evaluated by an optical method. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):362-370. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.927. EDN: TQPEED.

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли являются одним из важнейших источников натуральных красителей, интерес к которым в последнее время значительно возрос [1–4].

В состав светособирающих антенных комплексов, обычно присутствующих у цианобактерий (синезеленых водорослей), красных водорослей, некоторых криптозоидов, входят пигменты, относящиеся к группе фикобилипротеинов (ФБП), которые представляют собой ярко окрашенные и сильно флуоресцирующие белково-пигментные компоненты [1, 3, 5–7]. ФБП являются ценными природными продуктами биотехнологии с реальным и/или потенциальным применением в нутрицевтике и фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике [1, 3, 4, 6]. Наиболее широкое практическое применение находят такие представители этой группы, как синий пигмент С-фикоцианин (С-ФЦ) и красный пигмент В-фикоэритрин (В-ФЭ) [2, 3, 5, 6, 8].

Потенциальное применение ФБП определяется чистотой получаемого продукта. Считается, что ФБП являются пригодными для пищевых целей, когда $D_{max} \text{ ФБП} / D_{280} \leq 0,7$, химически чистыми – когда $D_{max} \text{ ФБП} / D_{280}$ находится в диапазоне от 0,7 до 3,9, и аналитически чистыми – когда $D_{max} \text{ ФБП} / D_{280} \geq 4,0$ (где D – оптическая плотность) [2, 5].

Благодаря своей белковой природе, водорастворимости и красивой окраске ФБП вызывают интерес прежде всего как натуральные пищевые красители [4, 5, 9]. Из-за определенной токсичности синтетических красящих веществ спрос на природные красители в производстве пищевых продуктов, детских игрушек, косметологии, фармацевтике только увеличивается [1, 3, 5]. Кроме того, благодаря высокому биологическому потенциалу ФБП, в том числе проявляемым антиоксидантным, противовоспалительным, гепатопротекторным и противоопухолевым свойствам, эти пигменты оказывают положительное влияние на здоровье человека [1–3, 6, 10].

ФБП высокой степени очистки благодаря их флуоресцентным свойствам широко применяют при проведении флуоресцентных анализов высокого разрешения в гистохимии, проточной цитофлуориметрии, клеточном флуоресцентном сортинге (сортировке разнородных клеток), флуоресцентной иммунодиагностике и в детектировании макромолекул [4]. Фикоэритрин в комплексе с флуоресцеином применяют для двойного мечения антител, что находит использование при диагностике онкологических заболеваний и синдрома приобретенного иммунодефицита [5].

Коммерческий интерес к этим соединениям обусловлен их высоким содержанием в биомассе водорослей и цианобактерий, а также достаточно простыми технологическими процедурами, позволяющими разрушить клеточные стенки и получить водные экстракты соединений, которые приобретают красивую синюю или розовую окраску [2, 4, 6, 11].

Тем не менее применение ФБП в пищевых продуктах ограничено их невысокой стабильностью. Процессы деструкции этих пигментов в водных растворах протекают под воздействием света и многих других физико-химических факторов, таких как низкие или высокие значения pH, высокая ионная сила раствора, высокие температуры [2, 4, 9, 12–14]. Кроме того, водные растворы белковых соединений являются хорошей средой для размножения микрофлоры. При высушивании получаемой биомассы также наблюдается частичная денатурация ФБП, несмотря на это, характерный цвет и биологическая активность высушенных препаратов при условии соблюдения режимов хранения сохраняются годами [15].

Дегградация белковой фракции оказывает значительное влияние на сохранность цвета ФБП [10, 11]. Для защиты структурного порядка белковых цепей в качестве консервантов часто используются стабилизирующие агенты (глюкоза, сахароза, лимонная кислота, сорбиновая кислота, хлорид натрия, аскорбиновая кислота и азид натрия [2, 5, 9, 10, 13], которые позволяют сохранить цвет пигмента и избежать его денатурации.

В то же время применение ряда добавок для стабилизации ФБП, таких как азид натрия и дитиотреитол, неприемлемо в случае их применения в медицине и пищевой промышленности.

Стабильность ФБП крайне важна для расширения их использования в различных прикладных направлениях. Поскольку пищевые красители могут подвергаться воздействию неблагоприятных условий как на этапах производства, так и при хранении, важно оценить их стабильность под воздействием светового и температурного факторов, а также при добавлении консерванта, пригодного для пищевого использования, для разработки технологических режимов хранения продуктов [9, 11, 14]. В связи с этим проблема подбора условий для сохранения их структуры остается достаточно актуальной.

Использование достаточно широкого спектра консервантов повышает стабильность ФБП и является эффективным способом увеличить сроки их хранения. Ранее было показано, что в качестве консерванта при хранении фикоцианина и фикоэритрина в водных растворах может быть использован этанол с концентрацией до 20% [12, 16, 17]. Целью этой работы была оценка стабильности ФБП, выделенных из биомассы цианобактерии *Arthrospira platensis* и красной микроводоросли *Porphyridium purpureum*, при их хранении в водно-спиртовом растворе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Водный экстракт С-ФЦ получали из биомассы цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont, а В-ФЭ – из красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (семейство Bangiales, класс Rhodophyta). Культуры *A. platensis* и *P. purpureum* из коллекции Научно-образовательного центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» «Коллекция гидробионтов Мирового океана» выращивали в лабораторных условиях на питательных средах состава:

NaNO_3 – 1,2 г \times л $^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,45 г \times л $^{-1}$, Na_2EDTA – 0,037 г \times л $^{-1}$, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,0265 г \times л $^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,004 г \times л $^{-1}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0031 г \times л $^{-1}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0009 г \times л $^{-1}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,0017 г \times л $^{-1}$ – для *P. purpureum* [18];

NaHCO_3 – 16,8 г \times л $^{-1}$, K_2HPO_4 – 0,5 г \times л $^{-1}$, NaNO_3 – 2,5 г \times л $^{-1}$, K_2SO_4 – 1,0 г \times л $^{-1}$, NaCl – 1,0 г \times л $^{-1}$, Na_2EDTA – 0,08 г \times л $^{-1}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г \times л $^{-1}$; CaCl_2 – 0,04 г \times л $^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г \times л $^{-1}$ – для *A. platensis* [8].

Биомассу заливали небольшим количеством воды, двукратно замораживали и размораживали с целью разрушения клеточных оболочек для быстрого извлечения ФБП. Далее проводили экстракцию фосфатным буфером (0,05 М, рН = 7) на холоде (5 °С) в течение 24 часов. Полученный экстракт центрифугировали при 3000 об. \times мин $^{-1}$ в течение 15 минут. Образцы экстрактов доводили 96%-м этанолом до конечной концентрации этанола в растворе 20%. Хранение экстрактов осуществляли в следующих условиях: в темноте при температуре 5 °С; в темноте при температуре 18–20 °С; при естественной освещенности и температуре 18–20 °С. Хранение водно-спиртовых экстрактов ФБП в этих условиях проводили на протяжении 3 месяцев, кон-

троль концентраций пигментов осуществляли оптическим методом. Спектры экстрактов ФБП промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0,1 нм. Регистрировали оптическую плотность полученных экстрактов в области характеристических максимумов поглощения В-ФЭ (545 нм), R-фикоцианина (R-ФЦ) (615 нм), С-ФЦ (620 нм) и аллофикоцианина (АФЦ) (650 нм), а также при 750 нм (для учета неспецифического поглощения раствора). Концентрацию пигментов в водных экстрактах рассчитывали по [19].

Для *P. purpureum*:

$$\text{В-ФЭ} = 0,1 \times D_{545} - 0,063 \times D_{615} + 0,023 \times D_{650};$$

$$\text{R-ФЦ} = 0,154 \times D_{615} - 0,080 \times D_{650};$$

$$\text{АФЦ} = 0,147 \times D_{650} - 0,020 \times D_{615}.$$

Для *A. platensis*:

$$\text{С-ФЦ} = 0,166 \times D_{620} - 0,091 \times D_{650};$$

$$\text{АФЦ} = 0,159 \times D_{650} - 0,041 \times D_{620},$$

где D – значения оптической плотности для соответствующих длин волн.

Скорость деструкции пигментов в растворах k , сут. $^{-1}$, рассчитывали аппроксимацией полученных эмпирических данных по концентрации соответствующих пигментов, используя уравнение

$$C = C_0 \times \exp(-k \times t), \quad (1)$$

где C – концентрация пигмента; C_0 – концентрация пигмента в начальный момент времени; t – время, сут.

Рассчитывали средние арифметические \bar{x} , стандартные отклонения S , основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних $\Delta\bar{x}$. Все расчеты проводили в программах Libre Office и Scidavis для уровня значимости $\alpha = 0,05$. В таблице и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) для трех повторностей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синий пигмент фикоцианин и красный фикоэритрин находят наибольшее практическое применение; другие ФБП, содержащиеся в биомассе клеток микроводорослей и цианобактерий, производятся в ультрамалых количествах в основном для исследовательских целей [5]. Как показано ранее, эти пигменты весьма чувствительны к условиям окружающей среды, а деградация белковой фракции существенно влияет на стабильность окраски и биоактивность фикоцианина и фикоэритрина [13, 20], то есть на параметры, являющиеся основными для практического применения этих пигментов.

Отсутствие консервантов при хранении ФБП значительно сокращает сроки их хранения, особенно в случае воздействия светового и температурного факторов [16, 21]. Высокую скорость деструкции пигментов в этом случае, вероятно, можно объяснить разрушением пигмента под действием негативных факторов, а также сопутствующим размножением микрофлоры в экстракте [16].

В связи с этим часто рассматривают применение стабилизаторов для сохранения цвета и предотвращения процессов окисления [9, 10, 13]. Некоторые вещества исключаются из соображений безопасности, например азид натрия и дитиотреитол [13], кроме того, консерванты и стабилизаторы не должны денатурировать белок или изменять его оптические и антиок-

сидантные свойства. Так, использование 5% хлорида натрия индуцировало белковое осаждение [13], а его эффективность как стабилизатора фикоцианина была отмечена при более низком содержании соли в растворе (2,5–20 г·л⁻¹), причем с увеличением концентрации NaCl сохранность пигмента при хранении повышалась [10]. Использование лимонной кислоты в качестве консерванта позволило сохранить 67% фикоцианина от его первоначального количества, в то время как без использования консервантов после 45 дней хранения в растворе оставалось менее 3% пигмента [13].

На рис. 1 показан характер изменения концентраций ФБП в водно-спиртовом растворе при их хранении в различных условиях.

За 3 месяца хранения водно-спиртовых растворов пигментов концентрации С-ФЦ и В-ФЭ снизились при всех вариантах хранения экстрактов. Так, концентрация С-ФЦ существенно снизилась даже при хранении его в темноте и на холоде: снижение составило 14 и 44% за 27 и 90 суток соответственно от его первоначального содержания в растворе (см. рис. 1, а). При аналогичных условиях хранения концентрация В-ФЭ на протяжении 27 суток существенно не изменилась, а существенное снижение концентрации пигмента отмечено после этого периода (см. рис. 1, б). Таким образом, общее снижение концентрации В-ФЭ за 3 месяца составило 17% по сравнению с первоначальными значениями.

Следует отметить, что экстракты В-ФЭ при хранении в темноте сохраняли интенсивную розовую окраску в течение 3 месяцев.

При хранении экстрактов при комнатной температуре в темноте концентрация С-ФЦ снижалась значительно быстрее, чем в первом варианте. Так, за 27 суток содержание этого пигмента в растворе уменьшилось в 2,5 раза, а за 90 суток – в 6 раз. Снижение концентрации В-ФЭ при аналогичных условиях хранения также было более четко выражено: за 27 суток содержание пигмента в растворе уменьшилось на 11%, а за 90 суток – на 29% по сравнению с первоначальными значениями (см. рис. 1, а, б).

Самая высокая скорость деструкции С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах наблюдалась при хранении их на свету при комнатной температуре: в этих условиях концентрация С-ФЦ уже через 5 суток была близка к нулевым значениям, а концентрация В-ФЭ снизилась до минимальных значений за 27 суток (см. рис. 1, а, б).

Характер изменения динамики концентрации R-ФЦ в основном совпадал с изменением концентрации В-ФЭ при аналогичных условиях хранения (см. рис. 1, с). Что касается изменения концентрации АФЦ в водно-спиртовом растворе, то этот пигмент был наиболее стабилен: даже при хранении на свету при комнатной температуре его концентрация за 27 суток снизилась на 13% от пер-

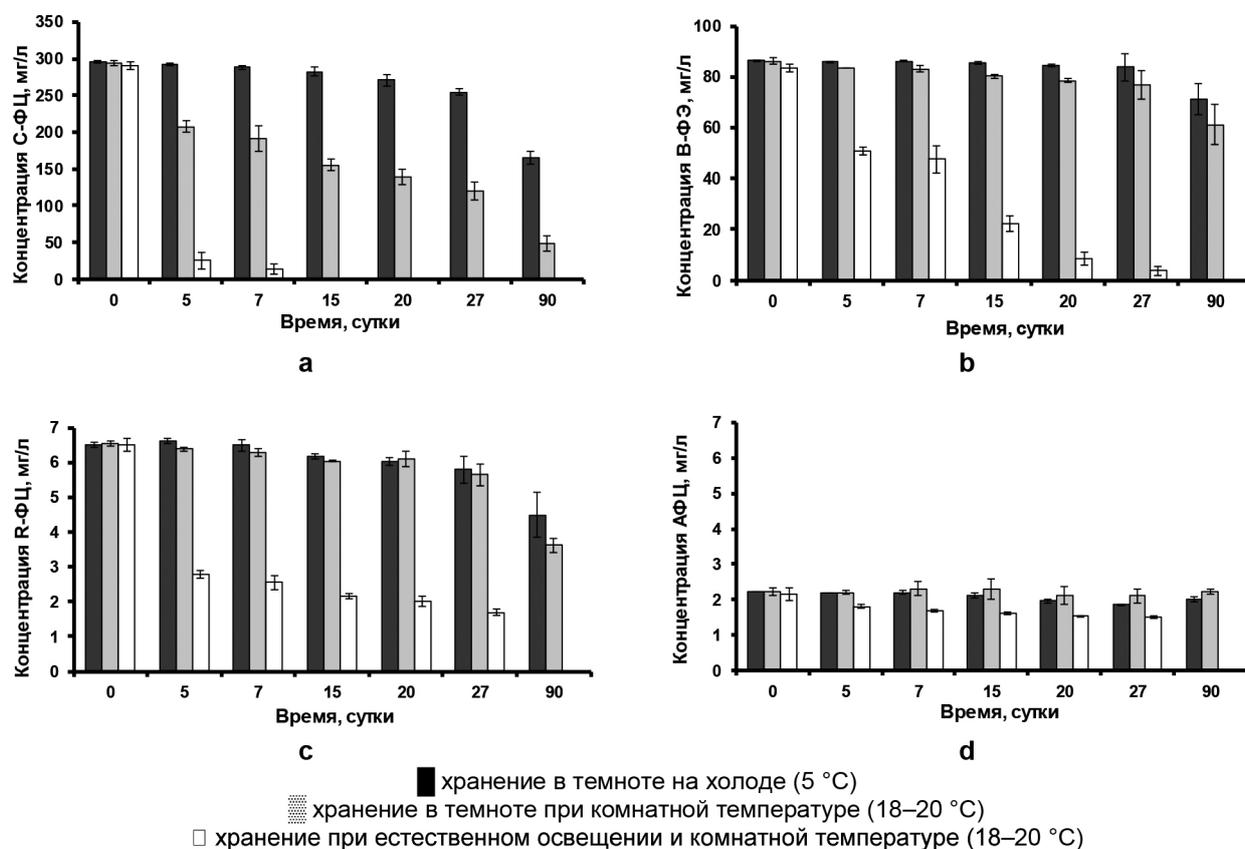


Рис. 1. Динамика концентраций фикобилипротеинов в водно-спиртовых растворах: а – С-фикоцианина; б – В-фикоэритрина; с – R-фикоцианина; д – аллофикоцианина

Fig. 1. Dynamics of phycobiliprotein concentrations in water-alcohol solution: a – C-phycoerythrin; b – B-phycoerythrin; c – R-phycoerythrin; d – allophycocyanin

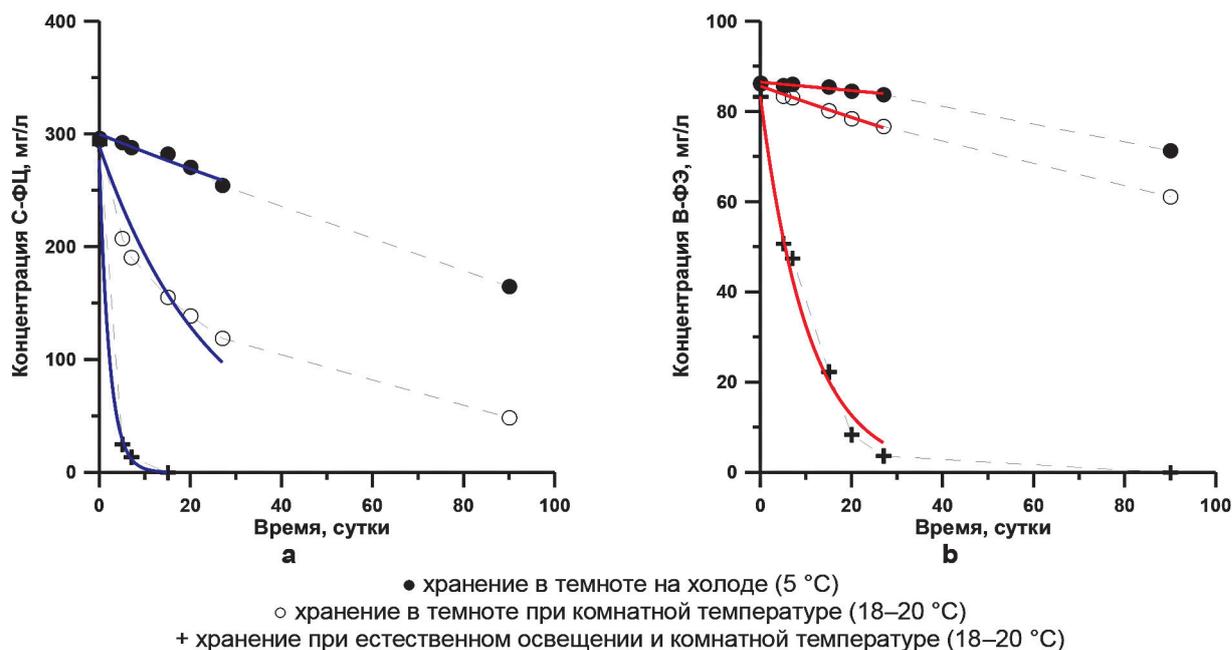


Рис. 2. Изменение концентраций С-фикоцианина (а) и В-фикоэритрина (b) в водно-спиртовых растворах (сплошные линии – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1); значения коэффициентов (скорости деградации пигментов) приведены в таблице)

Fig. 2. Degradation of C-phycoerythrin (a) and B-phycoerythrin (b) in water-alcohol solution (solid lines are approximation of experimental data by equation (1); the values of coefficients (pigments degradation rates) are given in Table)

Скорость деградации фикобилипротеинов в водно-спиртовых растворах при различных условиях хранения

Degradation rate of phycobiliproteins in water-alcohol solutions under different storage conditions

| Условия хранения | С-фикоцианин | | В-фикоэритрин | |
|---|---|----------------|---|----------------|
| | Скорость деградации, сут. ⁻¹ | R ² | Скорость деградации, сут. ⁻¹ | R ² |
| В темноте при температуре 5 °C | 0,0054 | 0,94 | 0,0011 | 0,93 |
| В темноте при температуре 18–20 °C | 0,0400 | 0,89 | 0,0042 | 0,99 |
| При естественном освещении и температуре 18–20 °C | 0,4466 | 0,99 | 0,094 | 0,99 |

воначальной, а при хранении в темноте существенно не изменилась за 90 суток хранения (см. рис. 1, d).

На основании полученных экспериментальных данных были рассчитаны скорости деградации В-ФЭ и С-ФЦ в водно-спиртовых растворах (рис. 2, таблица).

Таким образом, наименее стойким при хранении в водно-спиртовом растворе оказался пигмент С-ФЦ: скорость его деградации даже при наиболее благоприятных условиях хранения (темнота, холод) была в 5 раз выше, чем скорость деградации В-ФЭ при аналогичных условиях (см. рис. 2, а, таблицу).

Повышение температуры от 5 до 18–20 °C существенно повлияло на процессы деградации С-ФЦ, увеличив ее скорость более чем в 7 раз (см. рис. 2, а, таблицу). В случае В-ФЭ аналогичное изменение условий также оказало влияние на процессы деструкции пигмента: скорость его деградации увеличилась в 4 раза (см. рис. 2, b, таблицу). Наиболее неблагоприятными условиями, при которых отмечена наиболее высокая скорость деградации пигментов в растворах, является комбинация освещенности и повышенной температуры. В таких условиях скорости деградации В-ФЭ и С-ФЦ в проведенном эксперименте были максимальными и в

9 и 80 раз соответственно превышали аналогичные показатели при хранении этих пигментов в темноте и на холоде (см. рис. 2, таблицу).

В процессе хранения также изменялись значения соотношений ФБП (рис. 3).

Значения соотношения В-ФЭ/Р-ФЦ на протяжении эксперимента снижались только для варианта хранения на свету при комнатной температуре (см. рис. 3, а). При хранении водно-спиртовых растворов ФБП в темноте численное значение этого соотношения увеличивалось на 10 и 20% за 1 и 3 месяца соответственно. Изменение динамики значений соотношений В-ФЭ/АФЦ и Р-ФЦ/АФЦ имело однонаправленный характер для каждого из вариантов эксперимента: снижалось за 3 месяца хранения на 31–36% и 46–49% для первого и второго вариантов соответственно и за 1 месяц более чем на 75% для третьего варианта (см. рис. 3, b, c). Это свидетельствует о преимущественной деградации В-ФЭ и Р-ФЦ по сравнению с АФЦ.

В современных исследованиях уделяется большое внимание кинетике деградации ФБП в растворах, а также способам снижения скорости протекания этих процессов. Так, установлено, что концентрация пигментов,

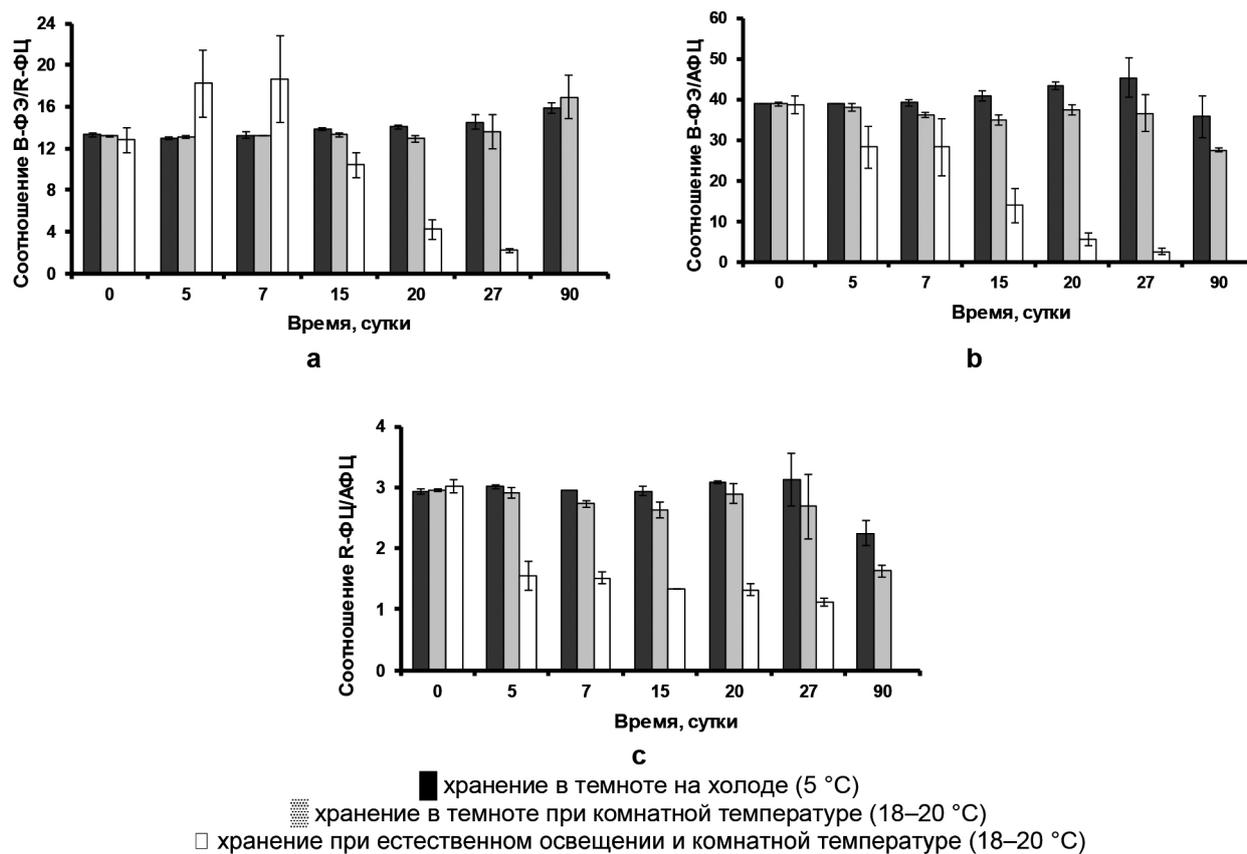


Рис. 3. Динамика соотношений фикобилипротеинов в водно-спиртовом растворе: а – В-фикоэритрин/R-фикоцианин; б – В-фикоэритрин/аллофикоцианин, в – R-фикоцианин/аллофикоцианин

Fig. 3. Dynamics of phycobiliprotein ratios in water-alcohol solution: а – B-phycoerythrin/R-phycoerythrin; б – B-phycoerythrin/allophycocyanin, в – R-phycoerythrin/allophycocyanin

контролируемая по значениям спектров поглощения, снижалась в зависимости от времени, температуры и интенсивности светового воздействия [7, 11, 13]. При более низкой температуре процесс деградации ФБП в растворе протекал значительно медленнее, чем при повышенной [10, 11, 13, 14]. Показано, что при воздействии света концентрация фикоцианина в растворе снижалась дозозависимым образом как функция времени, а совместное воздействие повышенной температуры и света приводило как к снижению относительной концентрации фикоцианина, так и к уменьшению периода его полураспада [10, 13].

Согласно предыдущим исследованиям, оптимальными условиями, необходимыми для поддержания стабильности ФБП в водных растворах, являются: pH от 5,5 до 7,5, низкая температура и хранение в темноте [10, 11, 13]. Так, было отмечено, что наиболее яркая окраска водных растворов фикоэритрина и фикоцианина наблюдалась в диапазоне pH от 6,5 до 7,5, а увеличение кислотности или щелочности среды вызывало резкое снижение максимума поглощения пигментов, что приводило к изменениям в характере кривой поглощения [7, 11, 20]. При существенном отклонении значений pH от оптимального диапазона наблюдалась коагуляция и осаждение ФБП в растворе, что приводило к обесцвечиванию пигмента и в целом к снижению качества экстрактов [7, 11, 12, 14, 20].

Кроме того, отмечено, что растворы фикоцианина, имеющие пищевую чистоту, демонстрировали более высокую стабильность по сравнению с растворами очищенного пигмента. По-видимому, многоступенчатый процесс очистки и стабилизации белка, включая лиофилизацию, оказывает влияние на нативную структуру белка, чувствительную к такому воздействию [13].

Несмотря на то что полученные в эксперименте растворы пигментов не проходили стадии дополнительной очистки, а pH экстрактов находился в оптимальном для хранения диапазоне, экспериментальные данные подтвердили неустойчивость С-ФЦ в водно-спиртовом растворе: даже при хранении в темноте через 27 суток в растворе оставалось менее 50% от его первоначального содержания. Световой фактор являлся наиболее неблагоприятным и определяющим сроки хранения исследованных пигментов в растворе, особенно в комбинации с повышением температуры хранения. Самые высокие темпы деградации С-ФЦ, R-ФЦ и В-ФЭ отмечены при их хранении на свету при комнатной температуре. В этих условиях практически полная деградация С-ФЦ в растворе отмечена после 1 недели, а R-ФЦ и В-ФЭ – после 4 недель хранения. В целом при хранении в водно-спиртовом растворе отмечена высокая стабильность АФЦ: даже при воздействии света на протяжении 90 суток хранения при комнатной температуре его концентрация в растворе существенно не изменялась.

Полученные экспериментальные данные в целом соответствуют общей тенденции по исследованиям, представленным в литературе: основными физико-химическими параметрами, определяющими стабильность ФБП в растворах, являются световые и температурные условия, а также pH [2, 4, 9, 12–14]. Рассчитанные скорости деградации С-ФЦ и В-ФЭ в проведенном эксперименте (см. таблицу) соответствуют данным, представленным в работах [7, 11, 14] и полученным при аналогичных условиях хранения ФБП. При хранении С-ФЦ в темноте на холоде в течение 15 суток стабильность пигмента в водном растворе без консерванта и в водно-спиртовом растворе была сопоставима, что подтверждается полученными экспериментальными данными [16, 21]. При повышении температуры до комнатной скорость деструкции С-ФЦ в случае хранения его в водно-спиртовом растворе в 3 раза ниже, чем в растворе без консервантов [16, 21].

Все вышеизложенное подтверждает возможность использования этилового спирта в качестве консерванта водных экстрактов ФБП, при этом скорость деструкции пигментов будет определяться условиями их хранения. Обязательным условием сохранения наиболее используемых пигментов С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах является отсутствие света, а в случае С-ФЦ и пониженная температура, что согласуется с данными, представленными в литературе [2, 10, 13]. Допустимым также является хранение В-ФЭ в темноте при комнатной температуре. Такой режим может обеспечить сохранность до 86% пигментов в водно-спиртовом растворе: С-ФЦ на срок до 30 суток, а В-ФЭ – до 90 суток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе осуществленной работы определен характер изменения концентрации С-ФЦ, В-ФЭ, R-ФЦ и АФЦ в водно-спиртовом растворе в зависимости от световых и температурных условий. Концентрации всех пигментов, за исключением АФЦ, снижались при хранении на свету при комнатной температуре. В проведенном исследовании световой фактор оказывал более негативное влияние на стабильность пигментов по сравнению с температурным, именно он определял скорость деструкции пигментов и сроки хранения ФБП в водно-спиртовых растворах. В целом наибольшую стабильность при хранении продемонстрировал АФЦ, а пигмент С-ФЦ в водно-спиртовом растворе оказался наименее стойким по сравнению с другими исследованными ФБП.

Хранение водно-спиртовых экстрактов пигментов в темноте на холоде является предпочтительным; допустимо хранение В-ФЭ в темноте при комнатной температуре. Такие условия хранения обеспечивают сохранность не менее 85% пигментов С-ФЦ и В-ФЭ в водно-спиртовых растворах на протяжении 25–30 суток. Полученные результаты демонстрируют относительную стабильность ФБП, что позволяет вводить их в рецептуру косметических препаратов, продуктов питания и напитков в качестве альтернативы химическим пигментам. Кроме того, существует еще ряд консервантов, признанных безопасными для человека, что является базой для продолжения исследований в этом направлении ввиду широких перспектив применения этой группы пигментов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent // *Biochemical Engineering Journal*. 2016. Vol. 109. P. 282–296. DOI: 10.1016/j.bej.2016.01.025.
2. Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M.A., Mojica L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability // *Algal Research*. 2019. Vol. 42. P. 101600. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101600.
3. Dagnino-Leone J., Figueroa C.P., Castañeda M.L., Youlton A.D., Vallejos-Almirall A., Agurto-Muñoz A., et al. Phycobiliproteins: structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022. Vol. 20. P. 1506–1527. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.02.016.
4. Kovaleski G., Kholany M., Dias L.M.S., Correia S.F.H., Ferreira R.A.S., Coutinho J.A.P., Ventura S.P.M. Extraction and purification of phycobiliproteins from algae and their applications // *Frontiers in Chemistry*. 2022. Vol. 10. P. 1065355. DOI: 10.3389/fchem.2022.1065355.
5. Stadnichuk I.N., Tropin I.V. Phycobiliproteins: structure, functions and biotechnological applications // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017. Vol. 53. P. 1–10. DOI: 10.1134/S0003683817010185.
6. Pagels F., Guedes A.C., Amaro H.M., Kijjoa A., Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: chemistry and biotechnological applications // *Biotechnology Advances*. 2019. Vol. 37, no. 3. P. 422–443. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.010.
7. Nath P.C., Bandyopadhyay T.K., Mahata N., Tiwari O.N., Bobby M.N., Indira M., et al. C-phycoerythrin production from *Anabaena* sp. BTA 903: optimization, production kinetics, thermodynamic and stability analysis // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024. Vol. 14. P. 19739–19751. DOI: 10.1007/s13399-023-04109-9.
8. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology / ed. A. Vonshak. London: Taylor & Francis, 1997. 235 p.
9. Nowruzi B., Konur O., Anvar S.A.A. The stability of the phycobiliproteins in the adverse environmental conditions relevant to the food storage // *Food and Bioprocess Technology*. 2022. Vol. 15. P. 2646–2663. DOI: 10.1007/s11947-022-02855-8.
10. Wu H.-L., Wang G.-H., Xiang W.-Z., Li T., He H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis* // *International Journal of Food Properties*. 2016. Vol. 19, no. 10. P. 2349–2362. DOI: 10.1080/10942912.2015.1038564.
11. Pereira T., Barroso S., Mendes S., Gil M.M. Stability, kinetics and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis* // *Journal of Food Science*. 2020. Vol. 85, no. 10. P. 3400–3405. DOI: 10.1111/1750-3841.15422.
12. Marraskuranto E., Raharjo T.J., Kasiamdari R.S., Nuringtyas T.R. Color stability of phycoerythrin crude extract (PECE) from *Rhodomonas salina* toward physicochemical factors // *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 2019. Vol. 14, no. 1. P. 21–31. DOI: 10.15578/squalen.v14i1.379.

13. Adjali A., Clarot I., Chen Z., Marchioni E., Boudier A. Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: a short review // Journal of Pharmaceutical Analysis. 2022. Vol. 12, no. 3. P. 406–414. DOI: 10.1016/j.jpha.2021.12.005.

14. Shkolnikov Lozober H., Okun Z., Parvari G., Shpigelman A. The effect of storage and pasteurization (thermal and high-pressure) conditions on the stability of phycocyanobilin and phycobiliproteins // Antioxidants. 2023. Vol. 12, no. 3. P. 568. DOI: 10.3390/antiox12030568.

15. De Morais M.G., da Silva Vaz B., de Morais E.G., Vieira Costa J.A. Biological effects of spirulina (*Arthrospira*) biopolymers and biomass in the development of nanostructured scaffolds // BioMed Research International. 2014. Vol. 2014, no. 1. P. 1–9. DOI: 10.1155/2014/762705.

16. Береговая Н.М. Особенности хранения водного экстракта R-фикоэритрина // Экология моря. 2010. Т. 81. С. 13–16. EDN: ULDZYV.

17. Береговая Н.М., Гудвиллович И.Н. Хранение водно-спиртового экстракта С-фикоцианина, полученного из микроводоросли *Spirulina platensis* // Экология моря. 2010. Т. 81. С. 17–22. EDN: ULDZZF.

18. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей // Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук. 1981. Т. 5. N 1. С. 75–82.

19. Стадничук И.Н. Фикобиблипротеины. М.: Мир, 1990. 196 с.

20. Лось С.И. Биохимические основы получения фикоэритрина из морских водорослей // Альгология. 2008. Т. 18. N 4. С. 375–385. EDN: JVOIFR.

21. Mishra S.K., Shrivastav A., Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis* // Process Biochemistry. 2008. Vol. 43, no. 4. P. 339–345. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.12.012.

REFERENCES

1. Manirafasha E., Ndikubwimana T., Zeng X., Lu Y., Jing K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*. 2016;109:282-296. DOI: 10.1016/j.bej.2016.01.025.

2. Hsieh-Lo M., Castillo G., Ochoa-Becerra M.A., Mojica L. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*. 2019;42:101600. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101600.

3. Dagnino-Leone J., Figueroa C.P., Castañeda M.L., Youlton A.D., Vallejos-Almirall A., Agurto-Muñoz A., et al. Phycobiliproteins: structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022;20:1506-1527. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.02.016.

4. Kovaleski G., Kholany M., Dias L.M.S., Correia S.F.H., Ferreira R.A.S., Coutinho J.A.P., Ventura S.P.M. Extraction and purification of phycobiliproteins from algae and their applications. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10:1065355. DOI: 10.3389/fchem.2022.1065355.

5. Stadnichuk I.N., Tropin I.V. Phycobiliproteins: structure, functions and biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2017;53:1-10. DOI: 10.1134/S0003683817010185.

6. Pagels F., Guedes A.C., Amaro H.M., Kijjoa A., Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2019;37(3):422-443. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.010.

7. Nath P.C., Bandyopadhyay T.K., Mahata N., Tiwari O.N., Bobby M.N., Indira M., et al. C-phycoerythrin production from *Anabaena* sp. BTA 903: optimization, production kinetics, thermodynamic and stability analysis. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024;14:19739-19751. DOI: 10.1007/s13399-023-04109-9.

8. Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis; 1997, 235 p.

9. Nowruzzi B., Konur O., Anvar S.A.A. The stability of the phycobiliproteins in the adverse environmental conditions relevant to the food storage. *Food and Bioprocess Technology*. 2022;15:2646-2663. DOI: 10.1007/s11947-022-02855-8.

10. Wu H.-L., Wang G.-H., Xiang W.-Z., Li T., He H. Stability and antioxidant activity of food-grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Properties*. 2016;19(10):2349-2362. DOI: 10.1080/10942912.2015.1038564.

11. Pereira T., Barroso S., Mendes S., Gil M.M. Stability, kinetics and application study of phycobiliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis*. *Journal of Food Science*. 2020;85(10):3400-3405. DOI: 10.1111/1750-3841.15422.

12. Marraskuranto E., Raharjo T.J., Kasiamdari R.S., Nuringtyas T.R. Color stability of phycoerythrin crude extract (PECE) from *Rhodomonas salina* toward physicochemical factors. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 2019;14(1):21-31. DOI: 10.15578/squalen.v14i1.379.

13. Adjali A., Clarot I., Chen Z., Marchioni E., Boudier A. Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: a short review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2022;12(3):406-414. DOI: 10.1016/j.jpha.2021.12.005.

14. Shkolnikov Lozober H., Okun Z., Parvari G., Shpigelman A. The effect of storage and pasteurization (thermal and high-pressure) conditions on the stability of phycocyanobilin and phycobiliproteins. *Antioxidants*. 2023;12(3):568. DOI: 10.3390/antiox12030568.

15. De Morais M.G., da Silva Vaz B., de Morais E.G., Vieira Costa J.A. Biological effects of spirulina (*Arthrospira*) biopolymers and biomass in the development of nanostructured scaffolds. *BioMed Research International*. 2014;2014(1):1-9. DOI: 10.1155/2014/762705.

16. Beregovaya N.M. Particularity of water R-phycoerythrin extract keeping. *Ekologiya morya*. 2010;81:13-16. (In Russian). EDN: ULDZYV.

17. Beregovaya N.M., Gudvilovich I.N. C-phycoerythrin water extract keeping from microalgae *Spirulina platensis*. *Ekologiya morya*. 2010;81:17-22. (In Russian). EDN: ULDZZF.

18. Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sid'ko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Izvestiya Sibirskogo otdeleniya Akademii nauk SSSR. Seriya biologicheskikh nauk*. 1981;5(1):75-82. (In Russian).

19. Stadnichuk I.N. Phycobiliproteins. Moscow: Mir; 1990, 196 p. (In Russian).

20. Los' S.I. Biochemical principles for phycoerythrin production from marine algae. *Algologia*. 2008;18(4):375-385. (In Russian). EDN: JVOIFR.

21. Mishra S.K., Shrivastav A., Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*. 2008;43(4):339-345. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.12.012.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гудвилевич Ирина Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник,
Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН,
299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Российская Федерация,
✉ gudirina2008@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7412-8283>

Боровков Андрей Борисович,
к.б.н., ведущий научный сотрудник,
Институт биологии южных морей
имени А.О. Ковалевского РАН,
299011, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2,
Российская Федерация,
spirit2000sev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6612-491X>

Вклад авторов

И.Н. Гудвилевич – проведение экспериментов, обработка полученных данных, обсуждение результатов, осуществление расчетов, написание текста статьи.
А.Б. Боровков – разработка концепции Исследования, обсуждение результатов, осуществление расчетов, подготовка иллюстративного материала.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 21.05.2024.
Одобрена после рецензирования 14.06.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina N. Gudvilovich,
Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher,
A.O. Kovalevsky Institute of Biology
of the Southern Seas, RAS,
2, Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011,
Russian Federation,
✉ gudirina2008@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7412-8283>

Andrei B. Borovkov,
Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher,
A.O. Kovalevsky Institute of Biology
of the Southern Seas, RAS,
2, Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011,
Russian Federation,
spirit2000sev@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-6612-491X>

Contribution of the authors

Irina N. Gudvilovich – conducting experiments, processing the data obtained, discussion results, calculations, writing the text of manuscript.
Andrei B. Borovkov – research concept development, results discussion, calculations, preparation of illustrative material.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 21.05.2024.
Approved after reviewing 14.06.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.