

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.124.67>

ВЫБОР ЭКСТРАГЕНТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ БИОМАССЫ ХЛОРЕЛЛЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Научная статья

Митишева Н.В.¹, Альшина А.И.², Ханбекова Д.С.³, Павленко В.И.⁴, Морозова А.С.⁵, Митишев А.В.^{6,*}⁶ORCID : 0000-0002-3327-9744;¹Основная общеобразовательная школа имени Станислава Степановича Лёвина, Вадинск, Российская Федерация^{2, 3, 4, 5, 6} Пензенский государственный университет, Пенза, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (span2361[at]rambler.ru)

Аннотация

Экстракты из биомассы *Chlorella vulgaris* C-2019, полученные с использованием экстрагентов различной природы, отличаются компонентным составом БАС и их содержанием, что подтверждается УФ-спектральными характеристиками. Водные экстракты биомассы хлореллы характеризовались высоким содержанием экстрактивных веществ (39,7%), низким содержанием пигментов (0,19%) и флавоноидов (0,01%). В спиртовых экстрактах обнаружены пигменты, флавоноиды. При увеличении концентрации этилового спирта с 30 до 95% снижается концентрация экстрактивных веществ (с 16,74% до 7,83%), концентрация пигментов (с 0,19% до 1,6%) и флавоноидов (с 0,09% до 0,83%) увеличивается. Экстракты неполярных экстрагентов отличались высоким содержанием флавоноидов.

Ключевые слова: микроводоросли, *Chlorella vulgaris* C-2019, экстракция, флавоноиды, пигменты.

CHLORELLA BIOMASS EXTRACTANTS WITH HIGH CONTENT OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Research article

Mitisheva N.V.¹, Alshina A.I.², Khanbekova D.C.³, Pavlenko V.I.⁴, Morozova A.S.⁵, Mitishev A.V.^{6,*}⁶ORCID : 0000-0002-3327-9744;¹Basic secondary school named after Stanislav Stepanovich Levin, Vadinsk, Russian Federation^{2, 3, 4, 5, 6} Penza State University, Penza, Russian Federation

* Corresponding author (span2361[at]rambler.ru)

Abstract

Extracts from the biomass of *Chlorella vulgaris* C-2019 obtained with extractants of different nature differ in the component composition of BAS and their content, which is confirmed by UV-spectral characteristics. The aqueous extracts of chlorella biomass are characterized by high content of extractives (39.7%), low content of pigments (0.19%) and flavonoids (0.01%). Pigments and flavonoids were found in alcohol extracts. Increasing the concentration of ethyl alcohol from 30 to 95% decreased the amount of extractive substances (from 16.74% to 7.83%), the concentration of pigments (from 0.19% to 1.6%) and flavonoids (from 0.09% to 0.83%) increased. Extracts of nonpolar extractants were distinguished by a high content of flavonoids.

Keywords: microalgae, *Chlorella vulgaris* C-2019, extraction, flavonoids, pigments.**Введение**

В современном мире применение микроводорослей в различных областях становится все шире: в сельском хозяйстве, в пищевой промышленности, в медицине и косметологии, для очистки сточных вод, для производства кислорода и биотоплива. Они являются возобновляемыми, устойчивыми и экономически выгодными источниками, подходящими для производства лекарственных препаратов, в том числе рекомбинантных белков/пептидов, таких как моноклональные антитела, вакцины и пищевых продуктов. Метаболиты микроводорослей обладают многими фармакологическими эффектами, а именно: антиоксидантными, противовоспалительными, противогрибковыми, антимикробными, антиферментативными, противовирусными, противоопухолевыми, антикоагулянтными и иммунодепрессивными.

Важность открытия новых соединений с антимикробной активностью обусловлена развитием антибиотикорезистентности у человека вследствие постоянного клинического применения антибиотиков. Микроводоросли являются важным источником антибиотиков с широкой и эффективной антибактериальной активностью [1].

Одной из разновидностей активно используемых водорослей является *Chlorella vulgaris*. Работы со штаммами этой культуры активно велись на протяжении последних десятилетий, но, тем не менее, не утратили своей актуальности [1].

Хлорелла (*Chlorella spp.*) – представитель многочисленного типа одноклеточных зеленых водорослей. Богатый состав объясняет возможность широкого использования в фармацевтической и клинической практике микроводоросли хлореллы. В биомассе хлореллы содержится комплекс БАС: аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, пигменты: хлорофиллы α и β , каротиноиды, витамины группы В, А, С, Е, а также ароматические соединения [2]. Биологически активные вещества биомассы хлореллы оказывают противовоспалительное, антиоксидантное,

противомикробное и ранозаживляющее действие [3], [4], [5]. Антимикробная активность обусловлена способностью синтезировать такие соединения, как жирные кислоты, акриловые кислоты, галогенированные алифатические соединения, терпеноиды, стерины, серосодержащие гетероциклические соединения, углеводы, ацетогенины и фенолы [5].

Полярность структур природных соединений определяет их физико-химические свойства. Неполярные вещества (липиды, алифатические соединения, каротиноиды) хорошо экстрагируются из сырья неполярными растворителями (нефрас, гексан, петролейный эфир, ацетон), а полярные (флавоноиды, фенолкислоты, иридоиды) – полярными [6]. Меняя полярность экстрагента, можно программировать спектр извлекаемых веществ, тем самым достигая оптимального фармакологического эффекта лекарственных средств на их основе.

Например, этанольный экстракт *Chlorella* был активен к *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* [7], водный [8], метанольный и гексанольный экстракты [4], [9] оказывали воздействие на *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*. Также полярные экстракты микроводорослей продемонстрировали значительную антибактериальную активность в отношении шести штаммов *Vibrio*: *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. scophthalmi*, *V. alginolyticus* и *V. lentus* [8]. Ряд исследователей идентифицировали соединения, оказывающие противогрибковый эффект. Pradhan et al (2014) [9] показали противогрибковую активность метанольных экстрактов *Chlorella*.

В связи с этим, целью настоящего исследования явился выбор оптимального экстрагента для получения извлечений с высоким содержанием БАС из биомассы *Chlorella vulgaris* Beyerinck IPPAS C-2019.

Методы и принципы исследования

Объектом исследования являлась воздушно-сухая биомасса штамма *Chlorella vulgaris* Beyerinck ИФР C-2019, выращенная глубинным методом на среде Тамия. Влажность, экстрактивные вещества лекарственного растительного сырья определяли фармакопейным методом ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». [10]. Экстракцию сырья проводили методом мацерации, при температуре 40±2°C. В качестве экстрагентов использовались: вода очищенная, спирт этиловый (в концентрациях 30, 40, 50, 70, 80, 90, 95%), гексан, нефрас. Соотношение сырье:экстрагент составляло 1:30 (по массе). Количественное содержание хлорофиллов, каротиноидов и флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом на Спектрофотометре СФ-201 (ЗАО "НПКФ Аквилон", Россия) [10]. Статистическую обработку результатов исследования выполняли согласно ГФ XIV, т.1 ОФС.1.1.0013.15 с использованием программ Microsoft Excel.

Основные результаты

В результате проведенной экстракции методом мацерации были получены 10 экстрактов хлореллы. Качественные реакции и спектрофотометрическое исследование свидетельствуют о различии состава извлечений, полученных с использованием полярных и неполярных экстрагентов (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние экстрагента на концентрацию БАС биомассы хлореллы

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.124.67.1>

Экстрагент	Соотношение сырье: экстрагент	Экстрактивные вещества, %	Сумма хлорофиллов, %	Сумма каротиноидов, %	Сумма флавоноидов, %
Вода	1:30	39,7	0,099	0,09	0,01
Этиловый спирт 30%	1:30	16,74	0,11	0,08	0,09
Этиловый спирт 40%	1:30	12,65	0,095	0,052	0,19
Этиловый спирт 50%	1:30	12,9	0,12	0,052	0,22
Этиловый спирт 70%	1:30	10,6	0,279	0,176	0,31
Этиловый спирт 80%	1:30	11,4	0,476	0,169	0,43
Этиловый спирт 90%	1:30	10,2	0,621	0,185	
Этиловый спирт 95%	1:30	7,83	1,01	0,247	0,83
Гексан	1:30	3,07	0,10	0,5	0,79
Нефрас	1:30	0,16	0,59	0,19	0,9

Полученные экстракты различались по цвету, запаху и консистенции (таблица 2).

Таблица 2 - Результаты органолептического анализа экстрактов хлореллы

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.124.67.2>

Экстракт	Характеристика экстракта
Вода	Густая масса светло-зеленого цвета с характерным запахом
Этиловый спирт 30%	Густая масса светло-зеленого цвета с характерным запахом
Этиловый спирт 40%	Аморфная масса светло-зеленого цвета с травянистым запахом
Этиловый спирт 50%	Густая масса зеленого цвета с травянистым запахом
Этиловый спирт 70%	Густая масса коричнево-зеленого цвета с травянистым запахом
Этиловый спирт 80%	Густая вязкая масса коричнево-зеленого цвета с травянистым запахом
Этиловый спирт 90%	Густая вязкая масса черно-зеленого цвета с травянистым запахом
Этиловый спирт 95%	Густая вязкая масса черно-зеленого цвета с травянисто-табачным запахом
Гексан	Зеленовато-коричневый аморфный порошок с характерным запахом
Нефрас	Коричневый аморфный порошок с характерным запахом

Заключение

При использовании экстрагентов разной полярности в экстракции биомассы хлореллы позволяют получить извлечения, содержащие различные концентрации основных биологически активных соединений. Полученные экстракты различались по органолептическим характеристикам (цвет, запах, консистенция). Насыщенность цвета и выраженность запаха увеличивались от водного экстракта (светло-зеленый) к спиртовому 95% (черно-зеленый). Гексановые и нефрасовые экстракты представляли собой аморфные порошки с характерным запахом. Водные экстракты биомассы хлореллы характеризовались высоким содержанием экстрактивных веществ (39,7%), низким содержанием пигментов (0,19%) и флавоноидов (0,01%). В спиртовых экстрактах обнаружены хлорофиллы, каротиноиды, флавоноиды. При увеличении концентрации этилового спирта с 30 до 95% снижается концентрация экстрактивных веществ (с 16,74% до 7,83%), а концентрация хлорофиллов (с 0,11% до 1,01%), каротиноидов (0,08% до 0,247%) и флавоноидов (с 0,09% до 0,83%) увеличивается. Экстракты неполярных экстрагентов (нефрас, гексан) отличались высоким содержанием флавоноидов 0,79% и 0,9 соответственно, с преобладанием кверцетина (0,57%).

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Геворгиз Р.Г. Предельная оценка продуктивности микроводорослей в условиях естественного и искусственного освещения. / Р.Г. Геворгиз, С.Г. Щепачёв // Экология моря. – 2010. – № 80. – с. 29-33.
2. Митишев А.В. Фармакотехнологические исследования биомассы *Chlorella vulgaris* C-2019. / А.В. Митишев, Е.Е. Курдюков, Е.Ф. Семенова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – № 2. – с. 53-58.
3. Markou G. Microalgae for high-value compounds and biofuels production. / G. Markou, E. Nerantzis // Biotechnology Advances. – 2013. – № 8. – p. 1532–1542.
4. Bhagavathy S. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. / S. Bhagavathy, P. Sumathi // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2011. – №1. – p. 1-7.
5. Barkia I. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. / I. Barkia, N. Saari // Marine Drugs. – 2019. – №17(5).
6. Сухина Т.В. Влияние экстрагентов на состав БАВ, спектральные характеристики и антимикробную активность извлечений из травы Очанки коротковолосистой. / Т.В. Сухина, Т.С. Шестакова, В.М. Петриченко // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – № 12(44). – с. 35-39.

7. Marrez D.A. Biological activity of the cyanobacterium *Oscillatoria brevis* extracts as a source of nutraceutical and biopreservative agents. / D.A. Marrez, Y.Y. Sultan, M.A. Embaby // *Int. J. Pharmacol.* – 2017. – №17. – p. 1010-1019.
8. Ramaraj S. Microalgae metabolites. / S. Ramaraj, R. Ramalingam, H. Abeer // *Journal of Biological Sciences*. – 2019. – №26. – p. 709-722.
9. Pradhan J. Antibacterial activity of freshwater microalgae. / J. Pradhan, B. Sachidananda // *African journal of pharmacy and pharmacology*. – 2014. – №8. – p. 809-818.
10. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. – М., 2018. – Т. 2. – 3262 с.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Gevorgiz R.G. Predel'naya ocenka produktivnosti mikrovodoroslej v usloviyax estestvennogo i iskusstvennogo osveshheniya [Marginal Evaluation of Microalgae Productivity under Natural and Artificial Light Conditions]. / R.G. Gevorgiz, S.G. Shhepachyov // *E'kologiya morya [Sea Ecology]*. – 2010. – № 80. – p. 29-33. [in Russian]
2. Mitishev A.V. Farmakotekhnologicheskie issledovaniya biomassy' Chlorella vulgaris C-2019 [Pharmacotechnological Studies of Biomass of *Chlorella vulgaris* C-2019]. / A.V. Mitishev, E.E. Kurdyukov, E.F. Semenova // *Razrabotka i registraciya lekarstvenny'x sredstv [Drug Development and Registration]*. – 2022. – № 2. – p. 53-58. [in Russian]
3. Markou G. Microalgae for high-value compounds and biofuels production. / G. Markou, E. Nerantzis // *Biotechnology Advances*. – 2013. – № 8. – p. 1532–1542.
4. Bhagavathy S. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. / S. Bhagavathy, P. Sumathi // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. – 2011. – №1. – p. 1-7.
5. Barkia I. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. / I. Barkia, N. Saari // *Marine Drugs*. – 2019. – №17(5).
6. Suxina T.V. Vliyanie e'kstragentov na sostav BAV, spektral'ny'e xarakteristiki i antimikrobnuyu aktivnost' izvlechenij iz travy' Ochanki korotkovolosistoj [Influence of Extractants on the Composition of BAS, Spectral Characteristics and Antimicrobial Activity of Extracts from the Herb *Lupus Shortiflorum*]. / T.V. Suxina, T.S. Shestakova, V.M. Petrichenko // *Ximiko-farmaceuticheskij zhurnal [Chemical-Pharmaceutical Journal]*. – 2010. – № 12(44). – p. 35-39. [in Russian]
7. Marrez D.A. Biological activity of the cyanobacterium *Oscillatoria brevis* extracts as a source of nutraceutical and biopreservative agents. / D.A. Marrez, Y.Y. Sultan, M.A. Embaby // *Int. J. Pharmacol.* – 2017. – №17. – p. 1010-1019.
8. Ramaraj S. Microalgae metabolites. / S. Ramaraj, R. Ramalingam, H. Abeer // *Journal of Biological Sciences*. – 2019. – №26. – p. 709-722.
9. Pradhan J. Antibacterial activity of freshwater microalgae. / J. Pradhan, B. Sachidananda // *African journal of pharmacy and pharmacology*. – 2014. – №8. – p. 809-818.
10. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. Izd. XIV [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition]. – М., 2018. – Vol. 3. – 3262 p. [in Russian]