



СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СТРАТЕГИИ ПОЛУЧЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ ИЗ *DUNALIELLA SALINA* ДЛЯ ПИЩЕВЫХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Мамаджанова Мария Сарваровна

магистрант кафедры «Химия и биология»

mamadzenova01@mail.ru

+998935139854

Мирзарахметова Дилбар Тохтамуртовна

д.т.н., профессор, заведующая кафедрой «Химия и биология»

Ташкентский международный университет Кимё (KIUT), Ташкент,
Узбекистан

Аннотация. Предоставлен двухэтапный способ получения каротиноидов из *Dunaliella salina*: на первом этапе накопление биомассы происходило в стеклянном сосуде с прозрачными пластинками, на втором индуцируется каротиногенез. Максимальный рост отмечен на 3–8 сутки. Этанол обеспечил 33,3 мг/г каротиноидов, а ультразвуковая обработка повысила выход с 10,00 до 27,63 мг/г.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, микроводоросли, каротиноиды, β -каротин, биотехнология, экстракция

Введение. В последние десятилетия микроводоросли рассматриваются как один из ключевых биологических ресурсов устойчивой биоэкономики, способный обеспечивать производство высокоценных соединений при минимальной нагрузке на окружающую среду. Их фотосинтетическая природа, высокая скорость роста и способность к синтезу широкого спектра метаболитов делают их перспективной альтернативой традиционным источникам природных биологически активных веществ [1–3].

Особый интерес представляет микроводоросль *Dunaliella salina*, являющаяся одним из наиболее эффективных природных продуцентов каротиноидов, прежде всего β -каротина. В условиях стрессового воздействия (высокая освещённость, солёность, ограничение питательных веществ)

данный организм способен накапливать каротиноиды в концентрациях, значительно превышающих аналогичные показатели у других фототрофных микроорганизмов [4–6]. Каротиноиды выполняют ключевую защитную функцию, предотвращая фотоокислительное повреждение клеток за счёт нейтрализации активных форм кислорода, что обуславливает их высокую биологическую и фармакологическую ценность [6].

Несмотря на значительный прогресс в области микроводорослевой биотехнологии, остаются актуальными задачи повышения продуктивности биомассы, оптимизации условий культивирования и увеличения выхода целевых метаболитов. Современные исследования демонстрируют, что наиболее перспективным подходом является использование двухфазных биотехнологических систем, в которых стадия активного роста (green phase) сменяется стадией стресс-индуцированного накопления каротиноидов (red phase) [7–8]. Однако эффективность таких систем во многом определяется конструктивными особенностями фотобиореакторов, параметрами светораспределения, гидродинамики и массообмена.

Дополнительной проблемой остаётся разработка эффективных методов экстракции каротиноидов, обеспечивающих высокий выход продукта при сохранении его биологической активности. Традиционные методы экстракции часто ограничены низкой эффективностью разрушения клеточных структур, что стимулирует поиск технологий интенсификации, включая ультразвуковую обработку и использование селективных растворителей [12–13].

В данном контексте особую актуальность приобретает разработка интегрированных биотехнологических решений, сочетающих оптимизацию условий культивирования, управление метаболическими переключениями и эффективные методы извлечения целевых соединений.

Целью настоящего исследования является разработка и экспериментальное обоснование комплексной двухстадийной биотехнологической системы получения каротиноидов из *Dunaliella salina*, включающей интенсификацию роста за счёт увеличения рабочей поверхности фотобиореактора, оптимизацию параметров стресс-индукции и применение методов усиленной экстракции.

Научная новизна работы заключается в комбинировании геометрической интенсификации культивирования (пластинчатые системы) с двухфазной регуляцией метаболизма; определении оптимальной глубины слоя суспензии как критического параметра каротиноидогенеза; экспериментальном подтверждении синергетического эффекта ультразвуковой экстракции и полярных растворителей.

Объекты и методы исследования: Объектом исследования являлся аральский штамм *Dunaliella salina* AR-1.

Культивирование проводили в закрытых системах с варьированием площади рабочей поверхности (0–25 пластин). Контролировались следующие параметры: концентрация CO₂, освещённость, температура, минерализация среды, pH с помощью сенсоров (ООО “Swetherland Group”, Узбекистан).

Рост культуры определяли методом микроскопического подсчёта клеток, концентрацию биомассы — по оптической плотности [9].

В работе использовали традиционные методы культивирования микроводорослей. Ростовую плотность культуры определяли путём микроскопического подсчёта клеток и их учёта на пластинах. Биологическую чистоту культуры оценивали с применением микробиологических методов [9-10]. Концентрацию суспензии устанавливали по величине оптической плотности, а содержание биомассы — с помощью инструментальных аналитических методов [11]. Для индукции синтеза каротиноидов использовали стрессовые условия: повышение освещённости, увеличение минерализации, испарение среды. Экстракцию каротиноидов и их определение осуществляли по методу [10].

Результаты и их обсуждение.

Влияние геометрии культивационной системы на рост культуры.

Установлено, что рост *Dunaliella salina* существенно зависит от совокупности факторов среды. В экспериментальных сосудах были помещены прозрачные полиуретановые пластинки (10, 15, 20, 25 шт) с диаметром 7 см. Так в первом сосуде - 10 пластин, во втором - 15 пластин, в третьем - 20 пластин, в четвертом - 25 пластин. Расстояние между пластинками составляло 10, 9, 8, 7 см соответственно. В контроле не использованы пластинки.

Максимальный титр культуры наблюдался в интервале 3–8 суток в сосуде с 10 пластинами, что соответствует фазе активного метаболизма (рис.1). Увеличение количества пластин в дальнейшем не влияло на титр клеток.

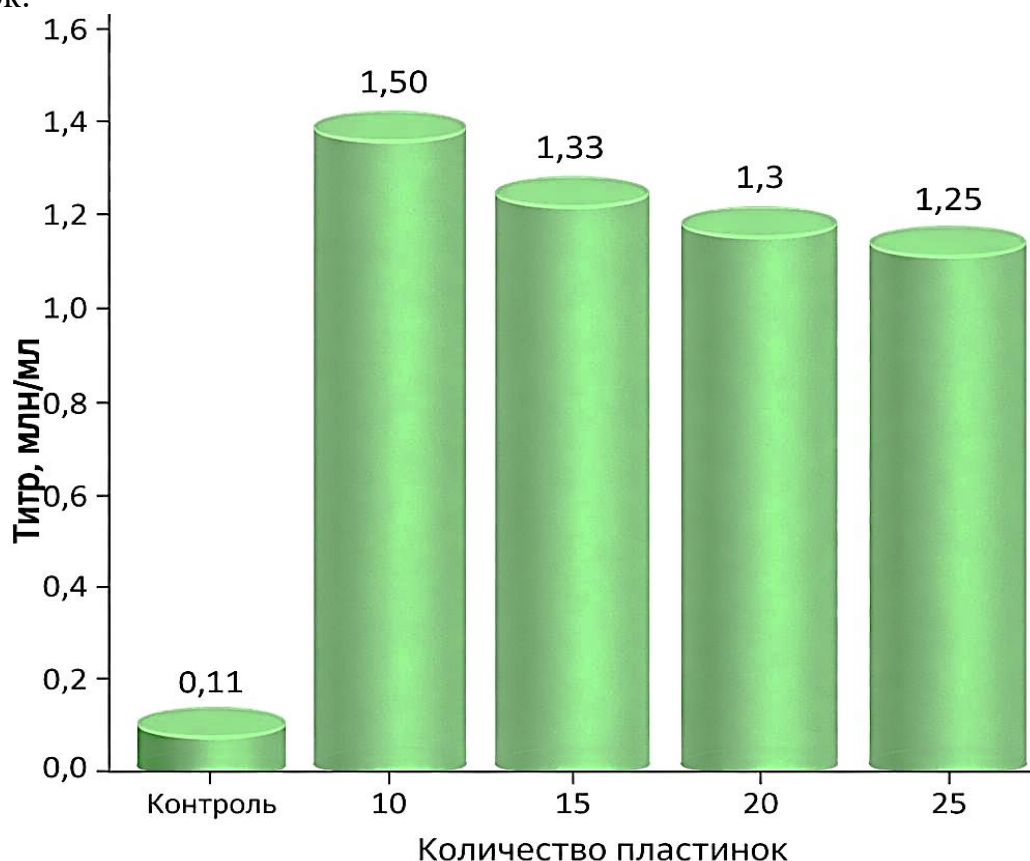


Рис.1. Влияние количества пластинок на титр клеток.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение эффективной площади поверхности фотобиореактора является значимым фактором интенсификации роста *Dunaliella salina*. Введение внутренних пластин обеспечило улучшение светораспределения и увеличение межфазного контакта в 4 раза, что привело к росту биомассы в 1,7 раза по сравнению с контролем.

Данный эффект согласуется с литературными данными, указывающими на ключевую роль светового градиента и гидродинамики в фотобиореакторах [7,8]. При этом установлено, что оптимальным является использование 10 пластин, тогда как дальнейшее увеличение их количества приводит к снижению плотности клеток. Это может быть связано с формированием зон светового затенения и ухудшением конвективного переноса. Таким образом, выявлена нелинейная зависимость между геометрией реактора и ростом культуры, что подтверждает необходимость оптимизации конструктивных параметров при масштабировании.

Кинетика роста и переход к стресс-индуцированному метаболизму.

При переводе культуры в стрессовые условия наблюдался переход от зелёной к оранжевой фазе, сопровождающийся интенсивным накоплением каротиноидов. Эксперимент состоял в определении минимальной и максимальной глубины питательной среды, обеспечивающей эффективный переход культуры в стрессовую, каротиноидонакопительную фазу. Для этого суспензию зеленой биомассы микроводорослей поместили в стеклянные сосуды, объемом 250 мл с различной высотой слоя суспензии микроводорослей: 2 см (50 мл), 3,5 см (100 мл), 5 см (150 мл), 6,5 см (200 мл), 8 см (250 мл). Все емкости размещали в условиях прямого освещения (121660 люкс) и мониторили основные параметры среды: содержание CO₂, освещенность (Lux meter), температуру и минерализацию (TDS) с помощью соответствующих сенсоров (Switzerland Group, Узбекистан). Значение pH во всех образцах составляло 6,34.

Таблица 1

Параметры среды при культивировании микроводорослей

С O ₂ , ppm/m3	Освещен ие, лкс	Минерализация,×1 000, ppm/m3	Температу ра, °C	Исходн ый титр клеток млн, мл
27	121660	81	35,01	1,129
0				

Через сутки после начала эксперимента во всех пяти сосудах наблюдалось изменение окраски зеленой биомассы и превращение в желтый цвет. Объем суспензии в каждой емкости уменьшился примерно на 25 мл. На пятые сутки окраска во всех сосудах стала отчетливо оранжевой. Эксперимент длился 10 дней, в течение которого особых изменений в окраске больше не наблюдалось, только количество солевых кристаллов на дне увеличилось.

Максимальная концентрация клеток наблюдалась в интервале 3–8 суток, что соответствует экспоненциальной фазе роста. Снижение скорости роста на

последующих этапах обусловлено истощением питательной среды и накоплением метаболитов, ингибирующих клеточное деление.

Перевод культуры в стрессовые условия инициировал переход от первичного к вторичному метаболизму, сопровождающийся изменением окраски биомассы от зелёной к оранжевой. Этот процесс отражает активацию каротиноидогенеза как защитного механизма против окислительного стресса, что соответствует концепции фотопротекторной адаптации микроводорослей [6].

Особый интерес представляет выявленная зависимость между глубиной слоя суспензии и эффективностью каротиноидонакопления. Установлено, что диапазон 3–7 см обеспечивает оптимальный баланс между интенсивностью освещения и тепломассопереносом, что способствует максимальному накоплению каротиноидов. Данный параметр редко рассматривается как ключевой фактор, что подчёркивает новизну полученных результатов.

Полученную суспензию микроводорослей в дальнейшем отцентрифугировали (6000 об/мин, 10 мин), лиофильно высушили и получили 4,5 г красной биомассы микроводорослей.

С целью выбора наиболее эффективного растворителя для экстракции β -каротина из красной (бурой) биомассы *Dunaliella salina* были исследованы три растворителя: ацетон, этанол, гексан (Рис.2).

Сравнительный анализ растворителей показал, что наибольший выход каротиноидов достигается при использовании этанола (33,3 мг/г), что связано с его промежуточной полярностью и способностью эффективно проникать через клеточные структуры.

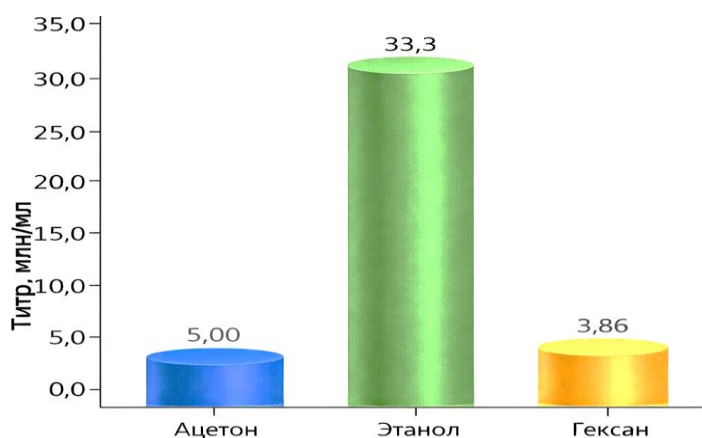


Рис.2. Влияние экстрагента на выход каротиноидов.

Применение ультразвуковой обработки позволило увеличить выход каротиноидов более чем в 2,7 раза (с 10,00 до 27,63 мг/г), что обусловлено кавитационным разрушением клеток и интенсификацией массопереноса. Аналогичные эффекты описаны в работах по интенсификации экстракции биологически активных соединений [13], однако в данной работе впервые показана эффективность сочетания ультразвука с оптимизированной системой культивирования. Таким образом, продемонстрирована синергия между биотехнологическими и физико-химическими методами повышения выхода целевого продукта.

В экспериментах с подбором оптимальной высоты слоя суспензии микроводорослей, в полученных биомассах микроводорослей количественно определяли каротиноиды. Результаты представлены на Рис.3. Как видно из рисунка наилучший результат представлен в условиях, когда превращение зеленой формы микроводоросли в красную форму осуществляли в сосуде с высотой слоя суспензии микроводорослей от 3 до 7 см в течение 5 суток при 38 ± 2 °С.

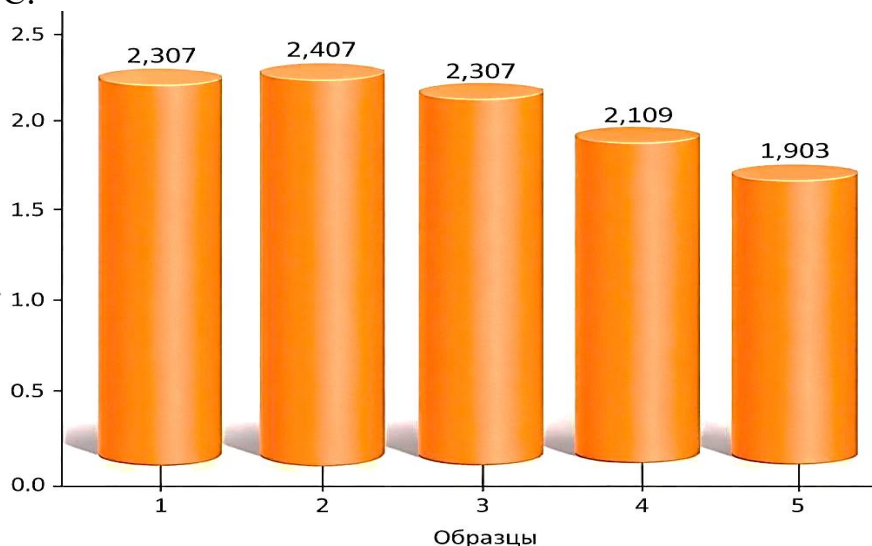


Рис.3. Содержание каротиноидов в красной биомассе *Dunaliella salina*

Применение ультразвука (частоте 20 кГц, 60 минут, 56 °С) привело к дополнительному увеличению выхода каротиноидов до 27,63 мг/г (контроль 10,00 мг/г) за счёт разрушения клеточных стенок и интенсификации массопереноса [13].

Полученные результаты подтверждают концепцию двухфазной регуляции метаболизма микроводорослей, включающей: фазу роста (накопление зеленой биомассы) и фазу стресса (образование красной биомассы и синтез вторичных метаболитов).

Интеграция процессов и технологическая значимость.

На основе полученных данных предлагается технология получения красной биомассы микроводорослей и из них каротиноидов (Рис.4).

По данной технологии сначала в резервуаре для питательной среды (1) подготавливают жидкую питательную среду, необходимую для роста микроводоросли *Dunaliella salina*. В этой среде содержатся вода, минеральные соли и все компоненты, обеспечивающие развитие культуры.

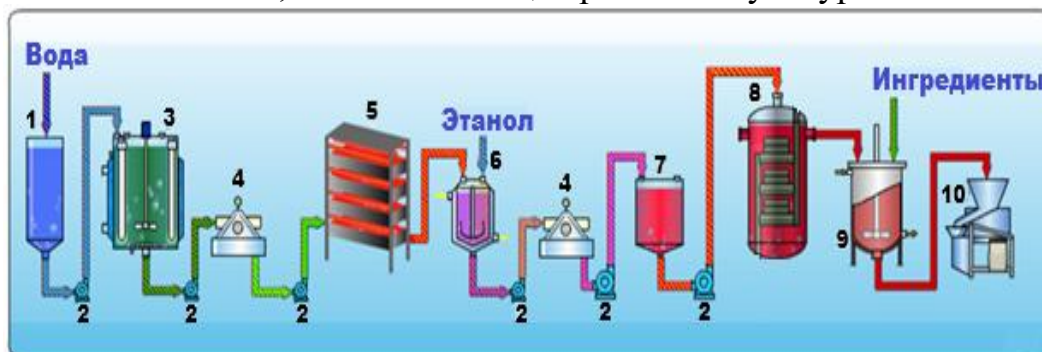


Рис.4. Технология культивирования микроводорослей

Dunaliella salina и получение каротиноидов. 1-резервуар для питательной среды, 2-насос, 3- фотобиореактор N1 для зеленой формы микроводоросли, 4- сепаратор, 5-пластинчатый фотобиореактор для красной формы микроводоросли, 6- реактор для экстракции каротиноидов. 7-сборник для жидкости с каротиноидами, 8-лиофильная сушка, 9- приемный резервуар, 10- аппарат для упаковки в саше.

Из резервуара среда с помощью насоса (2) подается в фотобиореактор №1 (3), в которой осуществляется первый этап культивирования — получение зеленой формы микроводоросли. Здесь создаются благоприятные условия для интенсивного роста клеток и накопления биомассы. После завершения первого этапа культура направляется в сепаратор (4), где происходит отделение жидкой части среды от биомассы микроводорослей.

Затем сгущенная биомасса поступает в пластинчатый фотобиореактор №2 (5), где проходит второй этап технологии — получение красной формы микроводоросли. В этом фотобиореакторе создаются стрессовые условия, при которых клетки начинают активно синтезировать каротиноиды. Пластинчатая конструкция увеличивает площадь освещаемой поверхности, улучшает доступ света к клеткам и тем самым способствует более эффективному переходу зеленой формы в красную.

После накопления каротиноидов красная биомасса подается в реактор для экстракции каротиноидов (6). Здесь каротиноиды переходят из клеточной биомассы в жидкую фазу. Далее полученная смесь снова проходит через сепаратор (4), где отделяют твердые остатки биомассы от жидкого экстракта. После разделения жидкость, содержащая каротиноиды, направляется в сборник (7). В этом сборнике накапливается экстракт, готовый к последующей обработке.

Из сборника экстракт поступает на лиофильную сушку (8). После сушки продукт поступает в приемный резервуар (9). Сюда также могут подаваться ингредиенты, если требуется изготовление конечной формы продукта, например смеси с наполнителями или вспомогательными веществами. В приемном резервуаре происходит сбор и подготовка продукта к фасовке.

На заключительном этапе готовый продукт направляется в аппарат для упаковки в саше (10), где расфасовывается в индивидуальные упаковки. Это обеспечивает удобство хранения, транспортировки и дальнейшего применения каротиноидного продукта.

Данный подход соответствует современным биотехнологическим стратегиям управления метаболизмом микроорганизмов [7,14].

Результаты исследования подтверждают эффективность интегрированного подхода, основанного на управлении фазами метаболизма культуры, оптимизации геометрии фотобиореактора, применении интенсифицированных методов экстракции.

Предложенная технологическая схема обеспечивает последовательную трансформацию зелёной биомассы в каротиноидсодержащую красную биомассу с последующим эффективным извлечением целевых соединений.

С точки зрения промышленной биотехнологии, данный подход обладает рядом преимуществ: масштабируемость за счёт модульной конструкции фотобиореакторов, возможность интеграции в непрерывные производственные линии, использование относительно безопасных растворителей (этанол), снижение энергетических затрат за счёт оптимизации стадий процесса. В совокупности это позволяет рассматривать предложенную технологию как перспективную платформу для промышленного получения каротиноидов.

Выводы. Разработан двухэтапный биотехнологический подход к получению каротиноидов из *Dunaliella salina*. Установлено, что оптимальный рост культуры происходит в интервале 3–8 суток; увеличение площади поверхности повышает продуктивность биомассы; стрессовые условия эффективно индуцируют синтез каротиноидов; этанол является наиболее эффективным экстрагентом; ультразвуковая обработка повышает выход каротиноидов. Предложенная технология обладает высоким потенциалом масштабирования и может быть использована в пищевой и фармацевтической промышленности.

Научный анализ. Проведённые исследования позволили системно оценить влияние ключевых технологических параметров на рост и метаболическую активность микроводоросли *Dunaliella salina*. Установлено, что динамика накопления биомассы определяется комплексным воздействием факторов среды, включая концентрацию CO₂, уровень освещённости, минерализацию и температурный режим. Максимальная интенсивность роста наблюдается в интервале 3–8 суток, что соответствует экспоненциальной фазе развития культуры и характеризуется высокой метаболической активностью клеток.

Показано, что увеличение эффективной площади культивационной поверхности за счёт введения внутренних пластин приводит к интенсификации массообменных и светораспределительных процессов, что способствует увеличению выхода биомассы. Однако дальнейшее увеличение плотности пластин вызывает ограничение роста, вероятно вследствие ухудшения гидродинамических условий и локального светового затенения.

Анализ перехода культуры в стресс-индуцированное состояние показал, что экстремальные параметры среды инициируют перестройку клеточного метаболизма, сопровождающуюся переходом от первичного к вторичному метаболизму и накоплением каротиноидов. Установлена оптимальная глубина слоя суспензии (3–7 см), обеспечивающая эффективную индукцию каротиноидогенеза.

Дополнительно выявлено, что эффективность экстракции каротиноидов определяется как природой растворителя, так и применением методов интенсификации массопереноса. Наиболее высокий выход достигнут при использовании этанола, тогда как ультразвуковая обработка существенно повышает степень разрушения клеточных структур и увеличивает выход целевых метаболитов.

Таким образом, полученные результаты подтверждают концепцию управляемой двухфазной регуляции метаболизма микроводорослей и демонстрируют возможность направленной оптимизации биотехнологических процессов получения каротиноидов.

Решения. На основе проведённого исследования предложена интегрированная биотехнологическая стратегия получения каротиноидов из *Dunaliella salina*, основанная на принципах фазового управления ростом и метаболизмом культуры. Ключевым технологическим решением является реализация двухстадийного процесса: первая стадия — направленное культивирование в оптимальных условиях с целью максимального накопления зелёной биомассы; вторая стадия — индуцирование стрессовых факторов (высокая освещённость, минерализация, изменение водного баланса), стимулирующих биосинтез каротиноидов. В качестве конструктивного решения предложено использование фотобиореакторов с увеличенной рабочей поверхностью (пластинчатые системы), обеспечивающих улучшение светового режима и массообмена.

Для повышения эффективности извлечения каротиноидов обосновано применение: этанола как селективного и технологически приемлемого экстрагента; ультразвуковой обработки как метода интенсификации разрушения клеток и повышения выхода целевого продукта.

Предложенная схема технологического процесса включает последовательные стадии культивирования, сепарации, стресс-индукции, экстракции и сушки, что обеспечивает комплексную переработку биомассы и получение стабильных каротиноидов.

Ожидаемые результаты. Реализация разработанного биотехнологического подхода позволит увеличить продуктивность биомассы *Dunaliella salina* за счёт оптимизации условий культивирования и геометрии системы; повысить выход каротиноидов благодаря контролируемой стресс-индукции метаболизма; интенсифицировать процесс экстракции с использованием ультразвуковых технологий; формировать технологическую платформу для получения β -каротина с высокой степенью извлечения и сохранением биологической активности. Ожидается, что предложенная технология будет обладать высокой степенью масштабируемости и адаптивности к промышленным условиям. Это создаёт предпосылки для её внедрения в производство функциональных пищевых ингредиентов, фармацевтических субстанций и биологически активных добавок.

Предложения и рекомендации. Полученные результаты углубляют представления о росте и метаболической регуляции *Dunaliella salina* и подтверждают эффективность двухфазного культивирования для интенсификации биосинтеза каротиноидов.

Разработанный подход может служить основой промышленной технологии получения каротиноидсодержащего сырья. Показано, что пластинчатые фотобиореакторы, стресс-индукция, этанол и ультразвук повышают эффективность культивирования и выход β -каротина.

Рекомендации для дальнейших исследований и внедрения

Оптимизировать параметры двухэтапного культивирования с учётом масштабирования (интенсивность света, газообмен, гидродинамика).

Разработать промышленные модели фотобиореакторов с регулируемой геометрией рабочей поверхности.

Исследовать кинетику каротиноидогенеза в условиях различных стресс-факторов для повышения селективности накопления β -каротина.

Расширить спектр методов экстракции (включая сверхкритическую CO₂-экстракцию) для повышения экологичности процесса.

Провести технико-экономическую оценку (ТЕА) и анализ жизненного цикла (LCA) предложенной технологии.

Разработать стандарты качества и стабилизации каротиноидных продуктов для пищевых и фармацевтических применений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Borowitzka M.A. High-value products from microalgae—Their development and commercialisation // *Journal of Applied Phycology*. — 2013. — Vol. 25. — P. 743–756.
2. Panis G., Carreon J.R. Commercial astaxanthin production derived by green algae // *Algal Research*. — 2016. — Vol. 15. — P. 325–330.
3. Markou G., Nerantzis E. Microalgae for high-value compounds // *Biotechnology Advances*. — 2013. — Vol. 31. — P. 1532–1542.
4. Ben-Amotz A. New mode of β -carotene production // *Journal of Phycology*. — 1996. — Vol. 32. — P. 920–927.
5. Del Campo J.A., García-González M., Guerrero M.G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production // *Biotechnology Advances*. — 2007. — Vol. 25. — P. 294–306.
6. Solovchenko A. Physiological role of carotenoids in microalgae // *Russian Journal of Plant Physiology*. — 2015. — Vol. 62. — P. 1–12.
7. Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C.H., Bino R.J., Wijffels R.H. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in microalgae // *Trends in Biotechnology*. — 2010. — Vol. 28. — P. 631–639.
8. Richmond A., Hu Q. *Handbook of Microalgal Culture*. — Wiley, 2013.
9. Шевцов А.А., Дранников А.В., Пономарев А.В., Шабунина Е.А., Коптев Д.В. Способ управления процессом культивирования фотоавтотрофных микроорганизмов // Патент РФ № 2622081. — 2017.
10. Нурмухамедова Х., Верушкина О., Тонких А.К., Мавжудова А., Мирзарахметова Д.Т. Разработка методов культивирования местных штаммов *Dunaliella salina* для получения β -каротинов // *Вестник НУУз. АСТА NUUz. Серия: Биология*. 2020. № 3/2. С. 33–36.
11. Шабунина Е.А. Научное обоснование режимов массообмена при автотрофном биосинтезе Дуналиеллы и ее применение в технологии мучных кондитерских изделий: автореф. дис. ... канд. техн. наук. — Воронеж, 2018.
12. Kim S.M., Kang S.W., Kwon O.N., Chung D., Pan C.H. Solvent extraction of carotenoids // *Process Biochemistry*. — 2012. — Vol. 47. — P. 1812–1818.

13. Plaza M., Herrero M., Cifuentes A., Ibáñez E. Innovative extraction technologies for carotenoids from microalgae // Trends in Analytical Chemistry. — 2009. — Vol. 28. — P. 653–660.

14. Gong M., Bassi A. Carotenoids from microalgae // Biotechnology Advances. — 2016. — Vol. 34. — P. 1396–1408.