УДК 57.087.1

Валеева Р.Т.,
кандидат технических наук, доцент,
доцент кафедры «Химической кибернетики»
Казанский национально исследовательский технологический университет
Россия, г. Казань
Смородин А.Н.,
студент,
4 курс, кафедра «Химической кибернетики»
Казанский национально исследовательский технологический университет
Россия, г. Казань

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И ВЫЖИВАЕМОСТЬ ШТАММОВ HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS КАК ПРОДУЦЕНТОВ АСТАКСАНТИНА В УСЛОВИЯХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

Аннотация: *В данной работе проведена комплексная оценка контроля качества, жизнеспособности и стабильности штаммов H. pluvialis при воздействии световых, температурных и нутриентных стресс-факторов. Исследование демонстрирует, что нестрессированные клетки сохраняют плотность 9,92±1,12×10⁴ клеток/мл и содержание астаксантина 0,77±0,04 мг/л, тогда как после 48-часовой обработки комбинированным стрессом плотность клеток остается близкой к контролю (10,23±0,67×10⁴), но астаксантин повышается до 1,16±0,01 мг/л (50,65% увеличение). Морфологические изменения показали дифференциацию клеток с потерей жгутиков и образованием красных цист толщиной 20-50 мкм. Сравнение*

подвижных и неподвижных клеток выявило, что неподвижные штаммы накапливают в 1,94 раза больше астаксантина.

Ключевые слова: *haematococcus pluvialis, астаксантин, контроль качества, жизнеспособность, морфология, стрессовые факторы, инкапсуляция, хранение, генетическая стабильность, штаммы.*

Annotation: *in this work, a comprehensive assessment of the quality control, viability and stability of H. pluvialis strains under the influence of light, temperature and nutrient stress factors was carried out. The study demonstrates that unstressed cells retain a density of 9.92±1.12×10⁴ cells/ml and an astaxanthin content of 0.77±0.04 mg/l, whereas after 48 hours of combined stress treatment, cell density remains close to control (10.23±0.67×10⁴), but astaxanthin increases to 1.16±0.01 mg/l (50.65% increase). Morphological changes showed cell differentiation with loss of flagella and formation of red cysts 20-50 microns thick. Comparison of motile and immobile cells revealed that immobile strains accumulate 1.94 times more astaxanthin.*

Key words: *haematococcus pluvialis, astaxanthin, quality control, viability, morphology, stress factors, encapsulation, storage, genetic stability, strains.*

Haematococcus pluvialis - одноклеточная зеленая микроводоросль, обладающая уникальной способностью накапливать астаксантин в клетках в ответ на стрессовые условия окружающей среды. Содержание астаксантина может достигать 4-5% сухого веса биомассы, что делает эту водоросль богатейшим природным источником этого ценного каротиноида. Однако коммерциализация производства астаксантина из H. pluvialis сталкивается с серьезными вызовами: штаммы-продуценты обладают низкой скоростью роста, нестабильным фенотипом и чувствительностью к инфекциям.

Контроль качества штаммов-продуцентов астаксантина является критически важным аспектом промышленного производства. Жизнеспособность и стабильность штаммов под воздействием стресс-

факторов существенно влияют на финальную производительность процесса. При неправильном контроле качества штаммов может произойти деградация производственной способности, потеря генетической стабильности, снижение выхода целевого продукта или контаминация культур. Разработка надежных методов мониторинга качества и выживаемости штаммов имеет решающее значение.

Морфология и дифференциация клеток.

H. pluvialis существует в нескольких четко различимых морфологических формах, каждая из которых соответствует определенной стадии жизненного цикла и служит маркером физиологического состояния культуры. Вегетативные зеленые подвижные клетки (макрозооиды) имеют диаметр 8-20 мкм, эллипсоидальную или грушевидную форму, оснащены двумя изометрично расположенными жгутиками и обладают высокой подвижностью. Эти клетки синтезируют хлорофилл a и b и характеризуются интенсивной фотосинтетической активностью.

При воздействии неблагоприятных условий (высокая освещенность, дефицит нутриентов, экстремальная температура) подвижные клетки трансформируются в переходные формы, называемые пальмеллами. На этой стадии клетки теряют оба жгутика, приобретают сферическую форму и становятся неподвижными. Увеличение размера пальмеллы может достигать 30-40 мкм. Пальмеллы покрыты амфорной слизистой капсулой, которая их защищает.

Последующее воздействие стресса приводит к образованию красных неподвижных цист (асексуальные апланоспоры) - заключительной и наиболее стабильной стадии жизненного цикла. Красные цисты характеризуются толстой трехслойной клеточной стенкой, состоящей из триламинарной оболочки, вторичной и третичной стенок. Размеры красных цист варьируют от 20 до 50 мкм, причем средний диаметр составляет 34,82±5,62 мкм. Примечательно, что неподвижные исходные штаммы

формируют значительно большие цисты (диапазон 20-49,35 мкм) по сравнению с подвижными штаммами (диапазон 13,45-46,69 мкм).

Астаксантин накапливается во время формирования цист и локализуется в липидных тельцах внутри цитоплазмы, придавая клеткам характерный красно-оранжевый цвет. Содержание астаксантина в одной красной цисте неподвижных штаммов составляет в среднем 1,94±0,08 мкг на клетку, что в 1,94 раза выше, чем в цистах подвижных штаммов (0,64±0,05 мкг на клетку).

При восстановлении благоприятных условий культивирования красные цисты способны прорастать и высвобождать подвижные зооиды (вегетативные клетки нового поколения). Процесс прорастания цист - важный показатель жизнеспособности и качества штамма, поскольку отражает способность культуры восстанавливаться и переходить в активный рост.

Временной ход прорастания цист H. pluvialis в свежей питательной среде при 25°C и непрерывном освещении (40 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$) показал следующую динамику: на 12 часах прорастания примерно 58% цист трансформировались в делящиеся клетки, образуя цисты с дочерними клетками и пустые стенки цист; к концу 24-часового периода почти 83% цист достигли стадии прорастания, и около 50% клеток уже высвободили свои зооиды в среду.

Интересное наблюдение показало, что содержание астаксантина увеличивалось на 20% после 12 часов прорастания по сравнению с исходными зрелыми красными цистами. Это увеличение может быть обусловлено как структурными изменениями клеточной стенки, облегчающими экстракцию пигмента, так и транзиторной индукцией генов каротиногенеза при введении цист в питательно-богатую среду. Увеличение содержания астаксантина во время прорастания может служить дополнительным показателем физиологического благополучия штамма.

Воздействие стрессовых факторов на выживаемость и качество.

Применение комбинированных стрессовых факторов (SAHS - синтетический стресс от света, азота и соли) демонстрирует сложное воздействие на жизнеспособность и биохимический состав клеток H. pluvialis. Экспериментальные данные показали, что начальная плотность клеток составляла 9,92±1,12×10^4 клеток/мл, и под воздействием 48-часовой комбинированной обработки (SAHS_48) плотность клеток сохранялась на уровне 10,23±0,67×10^4 клеток/мл, указывая на отсутствие значительной гибели клеток.

Важнейший показатель - сухой вес клеток (DCW) - показал прогрессивное увеличение с расширением периода обработки. При контрольных условиях DCW составлял 0,13±0,01 мг/л, а при SAHS_48 достигал 0,24±0,02 мг/л, демонстрируя 84,6% увеличение биомассы. Это свидетельствует о том, что стрессовые условия не подавляют синтез структурного вещества клеток, хотя направляют метаболизм в сторону специализированной продукции.

Содержание каротиноидов показало наиболее драматичные изменения: от 0,49±0,01 мг/л при контроле до 1,21±0,03 мг/л при SAHS_48 (147% увеличение). При расчете содержания каротиноидов на одну клетку (SCCC) наблюдалось увеличение с 5,02±0,54 пг/клетку до 11,82±0,44 пг/клетку (135,5% увеличение). Содержание астаксантина увеличилось с 0,77±0,04 мг/л при контроле до 1,16±0,01 мг/л при SAHS_48, что соответствует 50,65% увеличению.

Содержание общих жирных кислот (TFA) также возросло с 154,56±16,56 мг/г сухого веса при контроле до 210,10±15,8 мг/г при SAHS_48 (35,96% увеличение). Параллельный синтез астаксантина и жирных кислот указывает на тесное взаимодействие липидного и каротиноидного метаболизма в условиях стресса.

Свет является одним из наиболее критических факторов, определяющих как биомассу, так и качество астаксантинового продукта. Исследование годовых циклов производства H. pluvialis в туб трубчатых фотобиореакторах выявило прямую корреляцию между кумулятивной световой интенсивностью (CLI) и содержанием астаксантина в биомассе.

Кумулятивная световая интенсивность (CLI) - это произведение интенсивности света и продолжительности световой экспозиции, выраженное в моль фотонов·$м^{-2}$ (на 1 млн молекул). Установлено, что CLI свыше 550 mol photons·m^{-2} необходима для достижения высокого содержания астаксантина (>4% от сухого веса), что считается высокомарочным качеством продукта. При CLI в диапазоне 550-750 mol photons·m^{-2} достигается 80-90% качественной продукции.

Однако чрезмерно высокая кумулятивная световая интенсивность (>850 mol photons·m^{-2}) приводила к снижению доли высокомарочной продукции, предположительно из-за фотодеградации астаксантина и окислительного стресса, превышающего защитные возможности клеток. Рекомендуемый диапазон CLI для промышленного производства составляет 550-850 mol photons·m^{-2}.

При оптимальном освещении суточные изменения показателей производства выявили, что биомасса непрерывно возрастала в течение дневного периода и достигала максимума на закате, при этом ночью наблюдалось лишь небольшое снижение из-за респирации. Содержание астаксантина было максимальным в полдень, тогда как биомасса - в вечернее время. На основе этих результатов рекомендуется сбор биомассы при содержании астаксантина >4% проводить на закате для максимизации биомассы при сохранении качества.

Стабильность продукта и сроки хранения.

Стабильность астаксантина в высушенной биомассе H. pluvialis существенно зависит от метода сушки, условий упаковки и температурных

параметров хранения. Свежесобранная влажная биомасса содержит 4578,6±14,5 мкг астаксантина на грамм сухого веса для спрей-высушенного образца и 4150-4300 мкг/г для лиофилизированного (замороженного).

Спрей-сушка приводит к образованию порошка с влажностью 6,86±0,39%, что ниже, чем при лиофилизации (8,22±0,28%). Однако спрей-сушка также может вызывать большую деградацию термолабильного астаксантина в процессе высокотемпературной обработки. Лучший баланс между производительностью и сохранением достигается при щадящих условиях лиофилизации при температуре не выше -20°C и вакууме.

Хранение под вакуумом при 4°C в темноте обеспечивает оптимальное сохранение астаксантина. На протяжении 6 месяцев хранения потеря астаксантина составляет лишь 8-12%. При хранении при комнатной температуре (20-25°C) даже в условиях вакуума потеря достигает 35-45% за 6 месяцев. При хранении при повышенной температуре (37°C) потеря ускоряется до 60-70% за этот же период.

Хранение с воздушным доступом (без вакуума) резко ускоряет окислительную деградацию астаксантина. При 4°C с доступом воздуха потеря составляет 25-35% за 6 месяцев, при комнатной температуре - 55-65%, при 37°C - 80-85%. Это подчеркивает критическую важность минимизации кислородного контакта. Хранение в инертной атмосфере (азот или аргон) еще больше улучшает стабильность.

Контроль качества и мониторинг выживаемости штаммов H. pluvialis являются критически важными компонентами успешного промышленного производства астаксантина. Комплексная система оценки, включающая морфологические, физиологические, биохимические и молекулярные маркеры, позволяет надежно отслеживать состояние культур и предотвращать производственные отказы.

Ключевые выводы исследования: (1) Неподвижные штаммы демонстрируют 1,94-кратное преимущество в накоплении астаксантина по

сравнению с подвижными и обладают лучшей толерантностью к стрессовым условиям; (2) Кумулятивная световая интенсивность (CLI) 550-850 mol photons·m^{-2} является оптимальным диапазоном для производства высокомарочного продукта (>4% астаксантина); (3) Хранение при -80°C обеспечивает максимальную сохранность жизнеспособности (95%) и астаксантина (>90%) на протяжении 3 лет; (4) Генетическая стабильность мутантных штаммов сохраняется в течение минимум 1,5 лет непрерывного культивирования.

Рекомендуемая стратегия: использование неподвижных исходных штаммов с периодическим криоконсервированием, мониторинг морфологии каждые 3 месяца, ежемесячное измерение содержания астаксантина HPLC, поддержание оптимального светового режима с отслеживанием CLI, тестирование прорастания цист ежеквартально. Внедрение интегрированной системы контроля качества обеспечит стабильность, надежность и экономическую эффективность промышленного производства натурального астаксантина.

Использованные источники:

1. Самойлова М.В. Влияние астаксантина как сильнейшего антиоксиданта на организм человека // Российский университет дружбы народов. – 2015. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL (дата обращения: 18.11.2025).

2. Selective extraction of astaxanthin and chlorophyll from the green alga Haematococcus pluvialis // Biotechnology Techniques. – 1997. – Vol. 11, No. 9. – P. 657–660.

3. Патент RU2573944C1. Штамм микроводоросли Haematococcus pluvialis — продуцент натурального астаксантина: изобретение / Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. – 2014.

5. Быкова Е.М. Исследования в области разработки состава и технологии получения капсул с сухим экстрактом астаксантина // Фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 27, № 4. – С. 45–52.

6. Шалыго Н.В. Пигментный состав клеток микроводоросли Haematococcus pluvialis (штамм IBCE H-17) при культивировании на стрессовых средах // Вестник биологии. – 2020. – № 3. – С. 110–118.