

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра біотехнології**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО ОТРИМАННЯ ПІГМЕНТІВ ІЗ
МІКРОВОДОРОСТЕЙ»**

Виконав: здобувач вищої освіти 2 курсу, групи ПБтм21(1,5д)-01
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Едуард ЗИМА

Керівник: Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології,
к.фарм.н, доцент Ольга КАЛЮЖНАЯ

Рецензент: Доцент закладу вищої освіти кафедри технологій
фармацевтичних препаратів, к.фарм.н, доцент Олександр
МАНСЬКИЙ

АНОТАЦІЯ

У кваліфікаційній роботі, присвяченій отриманню пігментів, запропоновано використовувати мікроводорості, серед яких зупинились на найбільш перспективних видах *Chlorella vulgaris* (продуцент хлорофілів), *Spirulina platensis* (продуцент фікоціаніну), *Haematococcus pluvialis* (продуцент астаксантину) та *Dunaliella salina* (продуцент β -каротину). У роботі наведено культивування даних видів продуцентів, що є класичним біотехнологічним процесом, та представлений аналіз останніх досліджень технологій виділення та очищення пігментів. На основі аналізу представлених технологій розроблено технологічні схеми виробництва хлорофілів, фікоціаніну, астаксантину, каротину, що робить процес отримання пігментів на основі мікроводоростей доступним для реалізації на вітчизняних підприємствах.

Ключові слова: мікроводорості, біопігменти, культивування, технологічна схема.

ANNOTATION

In the qualifying work devoted to the production of pigments, it is proposed to use microalgae, among which we focused on the most promising species *Chlorella vulgaris* (producer of chlorophyll), *Spirulina platensis* (producer of phycocyanin), *Haematococcus pluvialis* (producer of astaxanthin) and *Dunaliella salina* (producer of β -carotene). The article describes the cultivation of these types of producers, which is a classic biotechnological process, and presents research on the development of technologies for the selection and purification of pigments. Based on the analysis of the presented technologies, technological schemes for the production of chlorophylls, phycocyanin, astaxanthin, and carotene were developed, which makes the process of obtaining pigments based on microalgae available for implementation at domestic enterprises.

Key words: microalgae, biopigments, cultivation, technological scheme.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД	7
1.1 Загальна характеристика використання мікроводоростей як продуцентів пігментів	7
1.2 Переваги водоростей як продуцентів біологічно активних речовин	9
1.3 Перелік основних родів водоростей, що використовуються як продуценти пігментів	11
2. Класи пігментів, що продукуються мікроводоростями	24
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	35
3.1 Технологія отримання пігменту із мікроводорості <i>Spirulina platensis</i>	35
3.2 Технологія отримання пігменту з мікроводорості <i>Chlorella vulgaris</i>	40
3.3 Технологія отримання пігменту з мікроводорості <i>Dunaliella salina</i>	44
3.4 Технологія отримання пігменту з мікроводорості <i>Haematococcus pluvialis</i>	48
3.5. Проведення попередніх досліджень із забарвлення зразків текстилю	52
ВИСНОВКИ	55
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	57
ДОДАТОК	62

ВСТУП

Актуальність теми. Мікроводорослі привертають увагу дослідників як екологічно чисті, стійкі та потенційні джерела різноманітних біологічно активних сполук. Біопігменти є найважливішими компонентами світлозбирального комплексу мікроводоростей; каротиноїди та фікобіліпротеїни відіграють основну роль у збиранні світла та виконують фотозахисну роль при надлишку світлової енергії. Останнім часом попит на ці біопігменти зростає через можливість їхнього застосування у якості натуральних барвників та великий біологічний потенціал і сприятливий вплив на здоров'я людини (антиоксидантні, протиракові, протизапальні, імуномодуючі властивості).

Серед мікроводоростей основними джерелами біопігментів є види *Chlorella vulgaris* (хлорофіли), *Spirulina platensis* (фікоціанін), *Haematococcus pluvialis* (астаксантин) та *Dunaliella salina* (β-каротин), вирощування яких є класичним біотехнологічним процесом із розробленою технологією виділення та очищення пігментів. Це робить процес отримання пігментів на основі мікроводоростей доступним для реалізації на вітчизняних підприємствах.

Тому тема даної роботи, а саме дослідження щодо отримання пігментів на основі мікроводоростей для реалізації її на вітчизняних підприємствах, є актуальною.

Мета роботи - аналіз існуючих технологій виробництва біопігментів, зокрема хлорофілів, фікоціаніну, астаксантину та β-каротину, мікробним синтезом з використанням мікроводоростей та розробка технологічних схем для можливої реалізації їх на вітчизняних підприємствах.

Завдання для досягнення мети наступні:

- обґрунтувати вибір мікроводоростей, які будуть найбільш перспективними в якості продуцентів біопігментів;
- вивчити морфологічні, фізіологічні, біохімічні властивості обраних

видів мікроводоростей;

- проаналізувати існуючі технології виробництва біопігментів на основі обраних видів мікроводоростей;
- скласти технологічні схеми виробництва біопігментів на основі обраних видів мікроводоростей;
- провести попередні дослідження щодо можливості використання мікроводоростей в якості барвників.

Об'єктами роботи є продуценти біопігментів - мікроводорості видів *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*.

Предметом роботи є вивчення та аналіз технологій виробництва біопігментів на основі мікроводоростей.

Методи наукових досліджень. Використано методи: описового дослідження - проаналізовані літературні і доступні в Інтернеті джерела; графічні методи - складені технологічні схеми; мікробіологічні методи - досліджені умови вирощування водоростей в умовах лабораторії; технологічні методи - проведено забарвлення зразків тканин.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновані у роботі аналіз сучасних технологій виробництва біопігментів на основі продуцентів - мікроводоростей видів *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis* та *Dunaliella salina* та розроблені на його основі технологічні схеми можуть бути використані на вітчизняних підприємствах для виробництва хлорофілів, фікоціанінів, астаксантину, каротину.

Апробація результатів дослідження. Окремі результати досліджень на наступних науково-практичних заходах:

1. Зима Е. П. Перспективність розробки пігментів на основі технологій мікробного синтезу / Зима Е. П., Калюжная О. С. // Topical issues of new medicines development: Матеріали XXVIII Міжнародної науково-практичної конф. молодих учених та студентів присвяченої 150-річчю з дня народження М.О.Валяшка (18-19 березня 2021 р., м. Харків). Х.: НФаУ, 2021. С. 226-228.

2. Калюжная О.С. Використання мікрводоростей як продуцентів пігментів / Калюжная О.С., Хохленкова Н.В., Зима Е.П. // Сучасні досягнення фармацевтичної справи: збірник наукових праць, випуск 1. Х.: Вид-во НФаУ, 2022. С. 143-146.

3. Зима Е. П. Перспективність використання водоростей як продуцентів пігментів / Зима Е.П., наук. керівник: Калюжная О.С. // Мат. III Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Youth pharmacy science», Х.: НФаУ, 7-8 грудня 2022 р. С. 166-197.

РОЗДІЛ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Загальна характеристика використання мікроводоростей як продуцентів пігментів

Мікроводорості є однією з найдавніших форм життя на Землі, що існувала в океанах з початку формування Землі близько 3 мільярдів років тому. Мікроводорості відносяться до фотосинтезуючих організмів і включають як прокаріотичні (наприклад, ціанобактерії: *Spirulina sp.*), так і еукаріотичні види (наприклад, зелені водорості: *Chlorella sp.*). Їх розмір коливається в діаметрі від 0,2 до 2,0 мкм [3, 11].

Хоча ці мікроорганізми є фотоавтотрофними, вони можуть рости у фотогетеротрофних, гетеротрофних або міксотрофних умовах. Їх вирощують у двох різних системах: відкритій (озера та ставки) та фотобіореактори. Відкрите вирощування - найстаріший із використовуваних методів (з 1950 р.); проте фотобіореактори знаходять дедалі ширше застосування через здатність уникати впливу зовнішніх факторів та забруднення. Мікроводорості мають просту морфологію і можуть зростати у помірних умовах освітлення, солоності, рН, температури та концентрації поживних речовин або в екстремальних умовах [2, 3].

Spirulina platensis, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* та *Haematococcus pluvialis* є видами, що культивуються у великих масштабах для виробництва висушеної біомаси та пігменту. *Spirulina sp.* та *Chlorella sp.* в основному використовуються як корми та харчові добавки через високий вміст у них білків, ліпідів, вітамінів і мінералів. Ці мікроводорості домінують на ринку мікроводоростей, які використовуються як джерело пігментів, таких як фікобіліпротеїни та каротиноїди. *Dunaliella salina* та *Haematococcus pluvialis* вирощуються у промислових масштабах для отримання каротиноїдів, зокрема β-каротину (попередник вітаміну А) та астаксантину (потужний антиоксидант) [24].

Для отримання біопродуктів з біомаси мікроводоростей необхідно

здійснити вибір штаму - продуценту, розробити методи культивування та подальші процеси збирання врожаю, попередньої обробки, екстракції та очищення. В експериментальному масштабі метод культивування вважається успішним, якщо він здатний генерувати велику кількість біомаси мікроводоростей, багатою на цільові цінні сполуки. Далі, після дозрівання етап збору проводять відділенням біомаси від культурального середовища. Процес збору включає різні технології, у тому числі фільтрацію, флотацію, центрифугування та осадження. Попередня обробка є наступним кроком і використовується для руйнування клітинної стінки для підвищення ефективності вилучення біомолекул. Крім складу клітинних стінок, необхідно враховувати деякі основні критерії, такі як розташування бажаних пігментів у тканинах водоростей та їх стабільність, які різняться залежно від класу мікроводоростей. Для руйнування клітинної стінки можуть використовуватись механічні та немеханічні методи. До механічних методів відносяться використання млинів, пресування, гомогенізації під високим тиском, мікрохвильової обробки, ультразвукової обробки. До немеханічних методів належать використання кислот, лугів, осмотичного шоку та ферментативних процесів. Етап екстракції залежить від цільового пігменту. Традиційні методи включають використання розчинників залежно від природи пігменту. Вибір розчинника повинен здійснюватися з урахуванням властивостей пігменту розчинятися та екстрагуватися, при цьому без впливу розчинника на властивості пігменту. Наприклад, етанол, ацетон, метанол, н-гексан, діетиловий ефір та хлороформ використовували для екстракції пігментів мікроводоростей у поєднанні з різними методами (наприклад, омиленням, заморожуванням/відтаванням та нагріванням). До нетрадиційних методів відносяться електротехнологічні прийоми, наприклад, імпульсне електричне поле, високовольтні електричні розряди, екстракція за допомогою мікрохвиль/ультразвуку [27, 30].

1.2 Переваги водоростей як продуцентів біологічно активних речовин

Водорості є важливим джерелом різноманітних біологічно активних речовин та харчових продуктів. Одним з найпоширеніших способів використання водоростей як можливих носіїв цілого спектра унікальних сполук є застосування їх біомаси, отриманої шляхом масового культивування. Це дає можливість значною мірою вирішувати проблему одержання необхідної кількості водоростей з метою всебічного біохімічного їх дослідження, вивчення різних сторін метаболізму та виявлення ряду біологічно цінних та специфічних сполук [25].

Мікрowodорості широко досліджуються з метою з'ясування можливості їх застосування як додаткового джерела білка та окремих амінокислот, ряду вітамінів, компонентів пігментного комплексу тощо. Також на сьогоднішній день водорості розглядаються як перспективні біосистеми, здатні до ефективного перетворення енергії світла в хімічну енергію водню, альтернативного та екологічно чистого палива. Виробництво біопалива як екологічно безпечної технології вважається одним з першочергових завдань переходу до сучасної енергетики, що ґрунтується на використанні поновлюваних енергетичних ресурсів. Мікрowodорості можуть використовуватись у вирішенні глобальної енергетичної проблеми людства як сировина для виготовлення біодизельного палива [11].

Спрямоване культивування водоростей може забезпечити синтез цілого ряду біохімічних компонентів. Цей процес базується на використанні каталітичного потенціалу компонентів клітин, клітинних стінок та екзометаболітів різних таксономічних груп водоростей. Це дозволяє отримувати унікальні сполуки, які можуть використовуватись у певних сферах діяльності людини [5-7].

У наш час лідерами в розробці та освоєнні досягнень у цій галузі є США, Японія, країни Західної Європи, які мають багаторічний досвід

отримання та використання біомаси водоростей та її індивідуальних біополімерів у харчовій промисловості, сільському господарстві, фармакології тощо. Ці країни володіють потужним потенціалом нової техніки, постійно здійснюють фундаментальні та прикладні дослідження в галузі фізіології, біохімії водоростей та їх культивування з метою отримання біомаси, збагаченої на певні компоненти.

В останні десятиріччя є певні досягнення і в Україні. Здійснюється масштабне культивування окремих видів мікроводоростей головним чином *Spirulina plantesis*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* та деяких інших [1 - 4].

На сьогоднішній день водорості культивуються для виробництва лікарських речовин, косметичних компонентів, пігментів, харчових продуктів, застосовуються у енергетичній галузі та для очищення стічних вод. Широке застосування мікроводоростей обумовлено рядом переваг перед іншими джерелами та методами виробництва.

Але головною перевагою є те, що речовини синтезовані мікроводоростями та технології їх виробництва відносяться до не токсичних у порівнянні з методами хімічного синтезу. Так, пройшло вже багато часу від того коли тільки відкривали методики отримання пігментів хімічним шляхом і вони не були досконалі і були набагато токсичнішими. Проте, хоч це і стало безпечніше для людини, але використання сильних кислот та інших реагентів у хімічних виробництвах залишає цей метод неекологічним та небезпечним, а особливо використання металів в якості барвників - більшість пігментів для фарб це оксиди або гідроксиди заліза, титану, міді свинцю, марганцю. Хоч людство придумувало як зробити такі пігменти безпечнішими, все одно цього повністю не вдалось зробити, тому і існують деякі обмеження з використанням наприклад фарб, в яких містяться не тільки шкідливі розчинники, а і активні метали, що можуть провокувати ракові захворювання [19].

Ще одним недоліком отримання пігментів хімічним синтезом є застосування високих температур. В деяких технологіях необхідне

нагрівання до 20-50 °C і утримування такої температури від 2 до 15 діб для утворення на площі металу пігментної сировини, а в інших випадках це прокалювання сировини при 400-825 °C в залежності від пігменту і методики. Тобто ці технології є енергозатратними у порівнянні з отриманням пігментів за допомогою мікроводоростей, адже для їх вирощування якщо це зимній період будуть необхідні підтримка кімнатної температури і світло від ламп, якщо ж це літній період то додаткових затрат на підігрів і освітлення не потрібно [17].

Таким чином, головними перевагами отримання пігментів за допомогою мікроводоростей у порівнянні з хімічним синтезом є екологічно чистіше виробництво без використання токсичних для людини речовин, відсутність великих затрат електроенергії або газу для нагрівання, а також можливість отримувати паралельно інші біологічно-активні речовини - так, було знайдено методику при якій отримували пігмент за допомогою продуцента *Chlorella vulgaris*, а потім із залишків отримували білкову біомасу для подальшого використання (дана методика буде описана у розділі 3).

Щодо переваг використання мікроводоростей як продуцентів пігментів у порівнянні із використанням для цієї мети бактерій - основними перевагами є використання меншої кількості підготовчих стадій, відсутність етапів масштабування інокулята, можливість отримання більшої вихідної сировини для отримання пігменту за рахунок швидкого накопичення біомаси.

1.3 Перелік основних родів водоростей, що використовуються як продуценти пігментів

Пігменти з мікроводоростей і ціанобактерій широко затосовуються в продуктах харчування, кормах, фармацевтичних препаратах, нутрицевтиках і косметичці, головним чином завдяки їхньому кольору та біоактивним властивостям, а також тому, що вони є натуральними та екологічно чистими компонентами [34, 21].

Мікроводорості та ціанобактерії можна продавати як сиру біомасу

(висушену), так і переробляти для отримання специфічних сполук. Коли лише певна сполука є кінцевим продуктом, це вимагає подальшої обробки екстракції та, можливо, очищення. Вартість для виробництва очищених пігментів все ще є високою, і це обмежує застосування на високовартісних ринках, наприклад, косметичному [24].

На сьогоднішній день успішно реалізовані у промислових масштабах наступні виробництва пігментів з мікроводоростей і ціанобактерій: фікоціанін з *Arthrospira platensis* [34]; β-каротин з *Dunaliella salina*; та астаксантин з *Haematococcus pluvialis*. Інші сполуки та джерела із мікроводоростей є перспективними: лютеїн з *Scenedesmus almeriensis* [21] і фікоеритрин з *Porphyridium spp.* [13]. Ринок цих пігментів становить приблизно 1,5 мільярда доларів США, включаючи всі джерела (природні та синтетичні). Тільки ринок фікоціаніну має розмір близько 100 мільйонів доларів США, β-каротин приблизно 270 мільйонів доларів США, лютеїн близько 350 мільйонів доларів США, і астаксантин приблизно 800 мільйонів доларів США [34].

Пігменти зазвичай містяться у складі екстрактів, отриманих із згаданих організмів, оскільки, як уже зазначалося, процес очищення призводить до невинуватених витрат [21].

Кілька факторів можуть впливати на вилучення пігментів, включаючи цільовий пігмент, організм, ринкові тенденції, доступні технології та витрати. Для екстракції зазвичай необхідно зруйнувати клітину та використати розчинник; однак, також можливо витягти деякі цих сполук без процесу руйнування клітин, використовуючи так зване «доїння клітин», де продукт екстрагується під час росту культури [21].

Продуктивні ланцюги мікроводоростей набувають значення як стійкі альтернативи для отримання природних пігментів. Проведений аналіз вказав на хлорофіли, фікоціанін, астаксантин і β-каротин як на найбільш відповідні пігменти, а на *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis* і *Dunaliella salina*, відповідно, як на найбільш вивчені джерела. *Haematococcus*

згадується в найбільшій кількості патентів, що підтверджує високий технологічний інтерес до цієї мікроводорості. Концепція біопереробки, інвестиції в проекти та компанії, пов'язані з культивуванням мікроводоростей та/або екстракцією пігменту, зростають, зокрема, для фікоціаніну зі *Spirulina platensis*. Ці докази є кроком вперед для консолідації ринку пігментів з мікроводоростей, який, як очікується, зростатиме в найближчі роки, збільшуючи перспективи заміни синтетичних пігментів природними аналогами [26].

Спіруліна. Спіруліна (*Spirulina spp.*) - це багатоклітинна та ниткоподібна ціанобактерія, яка досягла значної популярності в секторі охорони здоров'я, харчовій промисловості та аквакультури. Водорість розвивається і росте у воді, її можна легко збирати і переробляти. Містить високий вміст макро- і мікроелементів, незамінних амінокислот, білків, ліпідів, вітамінів, мінералів і антиоксидантів. Спіруліна вважається повноцінною харчовою добавкою для боротьби з недостатнім харчуванням у країнах, що розвиваються. Спіруліна вважається безпечною для споживання людиною, про що свідчить її довга історія вживання в їжу та останні наукові відкриття. В останні роки спіруліна привернула величезну увагу дослідників, а також промисловості як джерело нутрицевтичних і фармацевтичних препаратів [37].

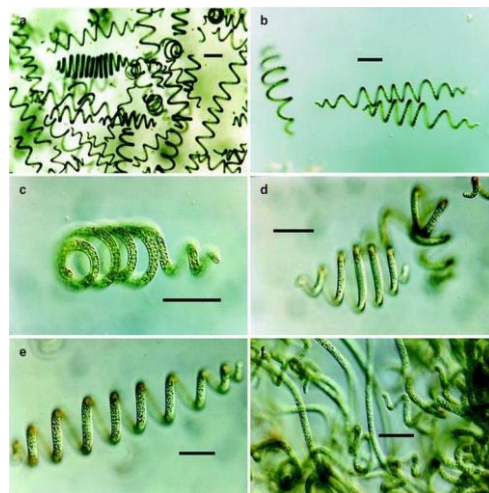


Рис. 1.1 - Вигляд мікроводорості *Spirulina spp.* під мікроскопом

Ціанобактерії були комерційно досліджені завдяки своїй здатності генерувати велику кількість важливих продуктів, таких як фікоціанін. Використовується також для виробництва харчових добавок, кормів для тварин і фармацевтичної продукції. Масове вирощування спіруліни залежить від низки факторів, включаючи доступність поживних речовин, температуру та світло. Спіруліні також потрібен відносно високий рН, який пригнічує ріст інших водоростей у системі. Щоб підтримувати високий рН і уникнути коливань, у культуральному середовищі завжди має бути велика кількість бікарбонату натрію

Окрім спіруліни для комерційного виробництва пігментів, зокрема фікобіліпротеїнів, використовують види *Arthrospira sp.* (фікоціанін) і *Porphyridium sp.* (фікоеритрин) [28, 38].

Біомаса спіруліни має високу поживну цінність і високий потенціал екстракція біосполук із доданою вартістю. Ця водорість визнана джерелом вітамінів (B1, B2, B12, E, і провітамін A), мінералів (Fe, Mg, Ca, P, Cr, Cu, Na та Zn) [6], пігментів (фікоціанін, хлорофіли та каротиноїди), незамінних жирних кислот (γ-ліноленова кислота), фенольних сполук, біопептидів та ферментів [4]. Ці сполуки проявляють кілька функціональних ефектів, діючи як імуномодулятори [12], антиоксиданти, та протизапальні засоби, протипухлинні та протимікробні засоби, а також показують пребіотичні ефекти.

Серед корисних продуктів зі спіруліни в нашій роботі нас цікавить природний синій пігмент - фікоціанін - основний фікобіліпротеїн, знайдений у цій мікрowodорості [26], який був схвалений для застосування як харчовий пігмент Управлінням з харчових продуктів і медикаментів у 2013 році [23], в даний час використовується як натуральний барвник у харчових продуктах, таких як напої та кондитерські вироби. Крім того, він знаходить застосування у фармацевтичній сфері завдяки терапевтичним ефектам (антиоксидант, протизапальна та протипухлинна дія), у косметичній промисловості (наприклад, губна помада та підводки для очей), і як флуоресцентні

маркери [26, 33, 22]

Беручи до уваги вище написану інформацію то, можна сказати що спіруліна являє собою перспективний мікроорганізм, який можна використовувати в багатьох галузях виробництва. Адже даний мікроорганізм є як джерелом потрібних складових для людей таких як вітаміни, мінерали, макро- і мікроелементи, антиоксиданти, жирні кислоти. Крім того можна використовувати її як стабілізатор мікрофлори ШКТ людини, доповнюючи або активуючи відповідні мікроорганізми. Також було виявлено у спіруліні такі властивості, як зниження надмірних кількості цукру в крові людини, що в подальшому можна буде використовувати як складову препаратів для хворих на цукровий діабет. У дітей виявляє ефект кращого засвоєння їжі, та підвищує резистентність організму до захворювань ШКТ та організму в цілому. Тобто виходячи з цього добавки з даного мікроорганізму впевнено займають місце у галузі добавок і харчовій промисловості. Але завдяки дослідженням сюди ще можна додати використання пігменту спіруліни, як новий заміник старих пігментів, які використовують хімічні промисловості для їх отримання.

Хлорела. Мікроводорості переважно зустрічаються у водних екосистемах, живучи як у морській, так і в прісній воді. Мікроводорості ефективніше дають біомасу, ніж наземні рослини, завдяки своїй вищій продуктивності у використанні сонячного світла та CO₂, що призводить до надзвичайно високих темпів їх росту, тому мікроводорості, як вже було зазначено вище, використовуються в харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості, а їх пігменти, поживні речовини, біологічно активні сполуки та вся біомаса вже використовуються в усьому світі.

Нещодавно різні біоактивні сполуки та поживні речовини мікроводоростей, були виявлені як у морській, так і в прісній воді, в тому числі і серед представників ціанобактерій [27]. Однак існує обмежена інформація щодо біоактивних сполук прісноводних видів *Chlorella*, які класифікуються як зелені водорості.

Види *Chlorella* можна масово культивувати, а їхні харчові добавки є комерційними доступний у всьому світі. Проте комерційне вирощування їхньої біомаси розпочато лише кілька років тому. *Chlorella vulgaris* була відкрита у 1890 р. доктором Мартінусом Віллемом Бейерінком, відомим мікробіологом і ботаніком. Ще один вид *Chlorella*, що вирізняється серед інших наявністю піреноїдів в хлоропластах, був ідентифікований і відповідно названий *C. pyrenoidosa* в 1903 році. Відтоді, охарактеризовано понад 20 видів *Chlorella*, описано понад 100 штамів. Наразі, види *Chlorella* поділяються на три різновиди: *C. vulgaris*, *C. lobophora* та *C. Sorokiniana* [35].



Рис. 1.2 - Вигляд мікроводорості *Chlorella* під мікроскопом

Продукти *Chlorella* містять численні поживні речовини та вітаміни, включаючи D і B12, які відсутні в джерелах їжі рослинного походження. Хлорела містить більшу кількість фолієвої кислоти і заліза, ніж інші продукти рослинного походження [8]. Додавання хлорели ссавцям, включаючи людей, повідомляється про прояв різноманітної фармакологічної активності, включаючи імуномодулюючу, антиоксидантну, протидіабетичну, антигіпертензивну та антигіперліпідемічну дію [35]. Мета-аналіз на вплив добавок хлорели на серцево-судинні фактори ризику свідчить про те, що вона

покращує загальну кількість рівень холестерину, рівень холестерину ліпопротеїнів низької щільності, систолічний артеріальний тиск, діастолічний кров тиск і рівень глюкози в крові натще, але не тригліцериди та холестерин ліпопротеїнів високої щільності рівнях [2]. Ці сприятливі ефекти *Chlorella* можуть бути наслідком синергізму між кількома поживними речовинами і антиоксидантних сполук. Однак відомості про склад біологічно активних сполук в *Chlorella* обмежені [35].

У 1940-х роках двоє дослідників Йоргенсен і Конвіт годували концентрованим супом з хлорели 80 пацієнтів у колонії для лікування прокажених у Венесуелі. В результаті чого відбулося поліпшення фізичного стану пацієнтів і це було першим задокументованим свідченням потенціалу мікроводоростей як добавки для покращення здоров'я [28]. На початку 1950-х років дослідження хлорели як джерела їжі проводились в Японії. В результаті цього використання хлорели як добавки в Японії експоненціально зросло [12].

Хімічний склад хлорели:

1. Білки. Однією з найбільш примітних поживних властивостей хлорели є високий вміст Білок хлорели містить 60% незамінних амінокислот. Ця сума втричі перевищує наявну в яловичині, яка вважається однією з найбільш концентрованих доступних форм білка. Оскільки білок мікроводоростей має низький рівень молекулярної маси, він може бути легко засвоєний за умови, що клітини були порушені. Пептиди, витягнуті з хлорели мають важливий профілактичний вплив на репарацію клітин [11].

2. Ліпіди. Деякі з основних ліпідних компонентів *Chlorella vulgaris* це олеїнова, пальмітинова та ліноленова кислоти. *Chlorella emersonii*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella sp.*, *Nannochloris sp.* і *Phaeodactylum tricornutum* можуть мати до понад 50% вміст ліпідів з різною продуктивністю [36].

3. Полісахариди. β -1,3-глюкан, який є основним компонентом хлорели, може діяти як антиоксидант, імуностимулятор і ефективно діє в зниження рівня ліпідів крові. Комплекси, знайдені в *Chlorella pyrenoidosa* і *Chlorella*

ellipsoidea містять глюкозу разом із комбінаціями галактози, манози, рамнози, N-ацетилглюкозаміду і N-ацетилгалактозаміну. Доведено, що ці комплекси мають імуностимулюючу та інгібіторну дію проти збудника *Listeria monocytogenes* і *Candida albicans* [1].

4. Хлорофіл. Хлорела вважається одним з основних джерел хлорофілу. Вона містить більше хлорофілу, ніж більшість доступних добавки, що містять оброблений хлорофіл [28]. Деякі переваги хлорофілу для здоров'я включають лікування рани, виразки, геморої, регуляція менструації, допомагає при гемофілії, покращує стан хворих на діабет та астму тощо. Так як структура хлорофілу дуже нагадує гемін який поєднується з білками, утворюючи гемоглобін, було доведено, що хлорофіл корисний для збільшення червоних клітин крові [1].

5. Вітаміни та мінерали. Хлорела є дуже багатим джерелом вітамінів і мінералів, її можуть легко приймати як дорослі, так і діти для досягнення добової норми вітамінів у раціоні. Деякі з вітамінів, які містяться у великій кількості в хлорелі, це: альфакаротин, бета-каротин, вітамін B1, B2, B3, B5, B6, E та вітамін K. Вітаміни, що містяться в незначних кількостях, це фолієва кислота, біотин, інозит, холін і вітамін B12 [12].

Якщо взяти за основу все вище сказане то як для людини, це дуже вигідний організм. Адже його можна використовувати в багатьох промисловостях, це і застосування у фармацевтичному виробництві і як БАДи, так і виділення речовин необхідних для створення ліків, це і використання як інгредієнти в косметичній продукції, це і використання як харчові продукти для рибних господарств, для тваринних господарств так і для людей відповідно [7]. Крім того дані мікроорганізми зарекомендували себе як продуценти пігментів, що дозволяє розширити коло їх використання ще для легкої промисловості та популяризувати ці пігменти на виставках моди, адже в наш час екологічна повістка одна із передових. Також важливо те що дослідники різних країн продовжують експерименти і дослідження її властивостей находячи нові властивості або додаючи їх за допомогою генної

інженерії, що дає великі перспективи в майбутньому в застосуванні *Chlorella* в різних галузях промисловості [14].

Дуналієла. *Dunaliella* - це тип зелених, одноклітинних, дводжгутикових, галофільних мікроводоростей, що належать до сімейства *Chlorophyceae*, яке включає близько 30 родів, одним з яких є рід *Dunaliella*. Відомо близько десяти видів роду *Dunaliella*, найбільш відомі та вивчені *D. tertiolecta*, *D. media*, *D. eichloria*, *D. minuta*, *D. parva* та *D. viridis*. Слід зазначити, що не всі згадані вище види переносять такі високі концентрації солі, як *D. salina*. Деякі види *Dunaliella* є морськими організмами, про які ніколи не повідомлялося в гіперсолоних середовищах. Тому небагато організмів можуть вижити, як *Dunaliella salina*, в умовах з такою високою концентрацією солі. Види *Dunaliella* справді здатні переносити різні концентрації NaCl в діапазоні від 0,2 % до приблизно 35 %. Крім того, у Мертвому морі знайдені головним чином види *Dunaliella* і, зокрема, *Dunaliella salina*.

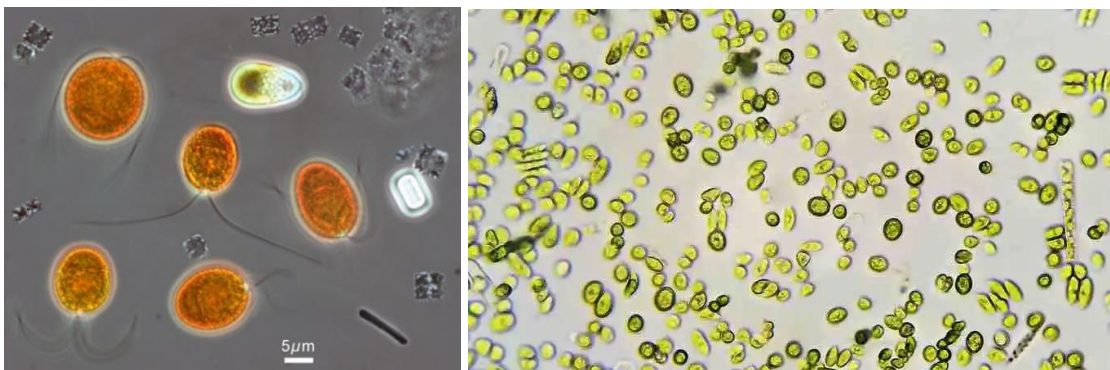


Рис. 1.3 - Вигляд мікроводорості *Dunaliella salina* під мікроскопом

Мертве море розташоване вздовж лінії Африканського розлому. Це результат геологічного явища, яке утворилося три мільйони років тому. Під час гігантського природного потрясіння на поверхню вийшли кілька багатих на мінерали шарів землі, хлинули джерела, породивши долину й озеро, розташоване нижче рівня моря. Випаровування, яке тривало протягом тисячоліть, призвело до концентрації солей і мінералів у водах озера, яке зараз називається Мертвим морем, до рівня, якого немає в жодному іншому

морі чи океані. Таким чином, води Мертвого моря містять в 3 рази більше натрію, в 30 разів більше магнію, в 16 разів більше калію і в 36 разів більше кальцію, ніж, наприклад, Середземне море. Мікроводорості *Dunaliella salina* є одним із рідкісних видів, які можуть жити в середовищі з настільки високою солоністю. *Dunaliella salina* також має дуже високу толерантність до рН від рН 1 до рН 11, а також здатна витримувати температури нижче 0°C і вище 38°C [5]. Оскільки *Dunaliella* не має жорсткої клітинної стінки, вони виробляють значну кількість гліцерину, щоб впоратися з високою концентрацією солі та забезпечити захист від осмотичного тиску. Таким чином, гліцерин діє як «сумісна розчинена речовина», яка, зокрема, захищає ферменти від інактивації та інгібування. Крім того, щоб вижити під час інтенсивного світла, ці мікроводорості синтезують каротиноїди. Ця велика кількість каротиноїдів також забезпечує антиоксидантну активність. *Dunaliella salina* була вперше помічена у водоймах для випаровування солі на півдні Франції в 1838 році Майклом Феліксом Дуналем і названа на честь її першовідкривача в 1905 році. Після цього відкриття *Dunaliella salina* стала модельним організмом для вивчення адаптації до солі. Встановлення концепції розчинених речовин, сумісних з органічними сполуками для досягнення осмотичної рівноваги, значною мірою базується на вивченні видів *Dunaliella* [30].

Гематоккок. *Haematococcus pluvialis* - це одноклітинна зелена мікроводорість, здатна накопичувати велику кількість астаксантину для появи червоного кольору, з вмістом до 1,5-3% маси сухої клітини, і в даний час є основним джерелом природного астаксантину [31].

У *H. pluvialis* астаксантин (3,30-дигідрокси- β , β -каротин-4,40-діон) синтезується з β -каротину шляхом додавання двох кетогруп до атомів вуглецю C4 і C4' за допомогою β -каротинкетоксилази з наступним приєднанням двох гідроксильних груп до C3 і C3' за допомогою β -каротингідроксилази. Отже, шлях біосинтезу астанксантину в *H. pluvialis* можна зобразити таким шляхом: β -каротин \rightarrow ехінон \rightarrow кантаксантин \rightarrow адонірубін \rightarrow астаксантин.

Астаксантин має потужну антиоксидантну здатність, яка в кілька разів сильніша, ніж будь-який інший каротиноїд, такий як зеаксантин, кантаксантин, β -каротин і лютеїн, і до 500 разів сильніша, ніж вітамін Е. Крім того, багато біологічних дій, включаючи дії проти запалення, раку [20].

Життєвий цикл *Haematococcus pluvialis* розділений на дві стадії: вегетативні клітини та хламідоспори. У відповідних умовах і багатих поживними речовинами середовищах *Haematococcus pluvialis* швидко росте, ділиться і розмножується, утворюючи таким чином велику кількість вегетативних клітин із джгутиками. Коли умови навколишнього середовища стають невідповідними, рухливі клітини втрачають джгутики і перетворюються на нерухомі вегетативні клітини.

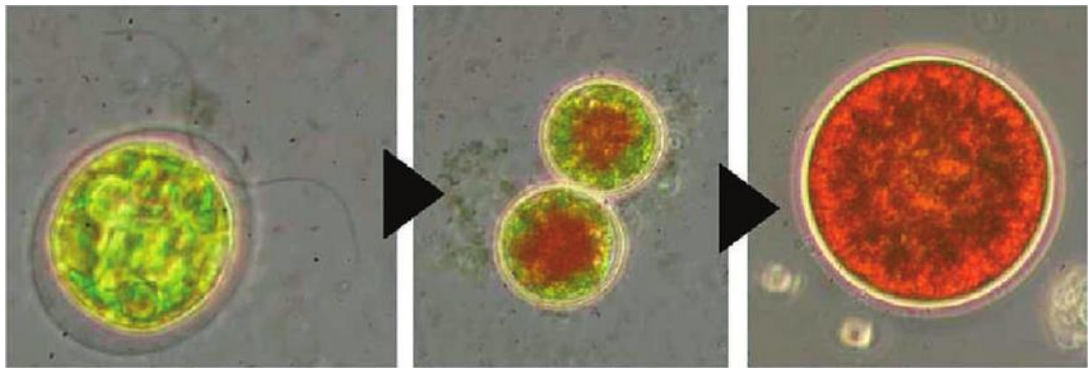


Рис. 1.4 - Вигляд мікроводорості *Haematococcus pluvialis* під мікроскопом

Під впливом постійних несприятливих умов навколишнього середовища, таких як висока освітленість, висока кількість солі, брак поживних речовин тощо, вегетативні клітини більше не діляться та не розмножуються, а борються з несприятливими умовами навколишнього середовища накопичує велику кількість астаксантину в клітинах, що призводить до утворення червоних хламідоспор [3].



Рис. 1.5 - Утворення червоних хламідоспор мікрроводоростю
Haematococcus pluvialis

В даний час прийнято вважати, що висока освітленість є необхідною умовою для отримання високого рівня астаξανтину. В умовах високого освітлення клітини водоростей виробляють надмірну кількість активних форм кисню (АФК) за допомогою фотосинтезу. *Haematococcus pluvialis* може синтезувати та накопичувати астаξανтин, щоб протистояти окислювальному пошкодженню клітин водоростей активними формами кисню. Базуючись на цій дослідницькій теорії, астаξανтин *Haematococcus pluvialis* зазвичай індукують за допомогою мілкої ставка (з глибиною рідини 5-15 см) або трубопровідного фотобіореактора з коротким світловим шляхом (3-5 см), а потім вирощують на відкритому повітрі. *Haematococcus pluvialis* також можна культивувати гетеротрофно за допомогою джерела органічного вуглецю в темних умовах. У порівнянні з фотосинтетичною автотрофією, гетеротрофну культуру можна збільшити за допомогою традиційного ферментера, таким чином реалізуючи промислове виробництво. Однак, як згадувалося вище, висока інтенсивність світла є ключовим фактором для поточного великомасштабного виробництва астаξανтину. Хоча в літературі повідомлялося, що стимуляція високої солоності може також стимулювати *Haematococcus pluvialis* до накопичення астаξανтину в темних гетеротрофних умовах, оскільки вихід астаξανтину занадто низький (9 мг/л),

це не має практичного значення. Щоб використати переваги гетеротрофної культури та подолати проблему вузького місця, яка полягає в тому, що важко ефективно накопичувати астаксантин у темних умовах, останніми роками в літературі повідомлялося, що шляхом прийняття гетеротрофно-автотрофного режиму тандемної культури, де клітини водоростей може розмножуватися в зелених вегетативних клітинах через гетеротрофну культуру в темних умовах, а потім зелені вегетативні клітини спонукають до накопичення астаксантину традиційним фотоавтотрофним способом, щільність клітин може становити до 6 г/л, а вихід астаксантину може досягати 114 мг/л [31].

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика обраних пігментів та продуцентів ферментів

Мікродорості та ціанобактерії є фотосинтезуючими організмами, які виробляють різні види пігментів для збирання світла. Такі пігменти зазвичай поділяють на три основні класи - хлорофіли, каротиноїди, фікобіліпротеїни. Наявність різних типів пігментів у мікродоростей і ціанобактерій змінюється залежно від типу, до якого належить організм.

Хлорофіл є найбільш фундаментальним; відповідає за для кисневу фотосинтетичну активність, і він присутній у всіх фотосинтезуючих мікродоростей і ціанобактерії.

Каротиноїди можуть бути як первинними, так і вторинними пігментами, що залежить від виду та умов зростання; найбільш відомими та комерційними є астаксантин, лютеїн та β -каротин [25].

Фікобіліпротеїни є особливим класом пігментів присутнім тільки в ціанобактеріях і червоних водоростях, і може представляти собою основний поглинач світла в цих організмах. Найбільш поширені - фікобіліпротеїни фікоціанін і фікоеритрин [9]. Разом три класи пігментів максимізують світлозбирання мікродоростей і ціанобактерій у всьому діапазоні видимого світла.

Каротиноїди - це ліпофільні забарвлені сполуки, які є містяться у вищих рослинах (голонасінних і покритонасінних) і водорості, а також у нефотосинтезуючих організмах, таких як гриби та бактерії. Каротиноїди містяться в формі різних ізомерів, а саме транс, 9-цис, 13-цис, 5-цис форми. Відомо більше 600 форм каротиноїдів (деякі важливі з них: β -каротин, астаксантин, кантаксантин, лютеїн тощо) та їх хімічний склад структура заснована на 40-вуглецевому полієні, що є остовом молекули.

Таблиця 1.1 - Продукування пігментів (каротиноїдів) різними організмами [10]

Species	Total Carotenoid (µg/g DW)	Lutein (µg/g DW)	β-cryptoxanthin (µg/g DW)	β-carotene (µg/g DW)
<i>Chlorella fusca</i>	79.55 ±37.58	63.53±9.56	Nd	10.01±1.27
<i>Chlorella vulgaris</i>	81.81±32.60	63.39±5.99	Nd	18.42±5.31
<i>Selenestrum</i>	76.22±32.97	62.67±18.05	Nd	13.54±5.36
<i>Butryococcussudesticus</i>	53.96±29.44	51.96±3.90	1.99±0.21	Nd
<i>Pandorinamorum</i>	56.82±28.29	51.61±5.68	2.38±0.32	2.82±1.43
<i>Chlorococcus</i>	62.66±36.18	62.66±5.83	Nd	Nd

Пік аналізу ВЕРХ зафіксував три типи каротиноїдів які можна виявити та показати пік лютеїну, бета-каротину та бета-криптоксантину. Серед усіх цих каротиноїдів був виявлений лютеїн у всіх видах мікроводоростей, які були проаналізовані [10]. На рис.1.9 показано зареєстровану *Chlorella fusca*, що містить найвищий вміст лютеїну ($69,53 \pm 9,56$ мкг/г) серед усіх видів мікроводоростей. Всього два види які були проаналізовані, містять бета-криптоксантин - *Butryococcusseduticus* ($1,99 \pm 0,21$) та *Pandorinamorum* ($2,38 \pm 0,32$ мкг/г) (рис. 1.8). Бета-каротин на рис. 1.9 був присутній у чотирьох видів культивованих мікроводоростей - це *Chlorella fusca* ($10,01 \pm 1,27$ мкг/г), *Chlorella vulgaris* ($18,42 \pm 5,31$ мкг/г), *Selenestrum* ($13,54 \pm 5,36$ мкг/г) і *Pandorinamorum* ($2,82 \pm 1,43$ мкг/г). *Pandorinamorum* показали піки лютеїну, бета-каротин і бета-криптоксантин. З точки зору користі для здоров'я, лютеїн є корисним щоб відстрочити початок катаракти, отже, зменшити ризик виникнення катаракти. За даними ВООЗ, вони оцінюють 285 мільйонів людей як такі, що страждають від проблем із зором, отже, це відкриття може подолати ці проблеми [9]. Також є дослідження, яке повідомляє, що споживання бета-каротину може збільшити мінеральну щільність кісткової

тканини, зменшити ризик серцевих захворювань [18].

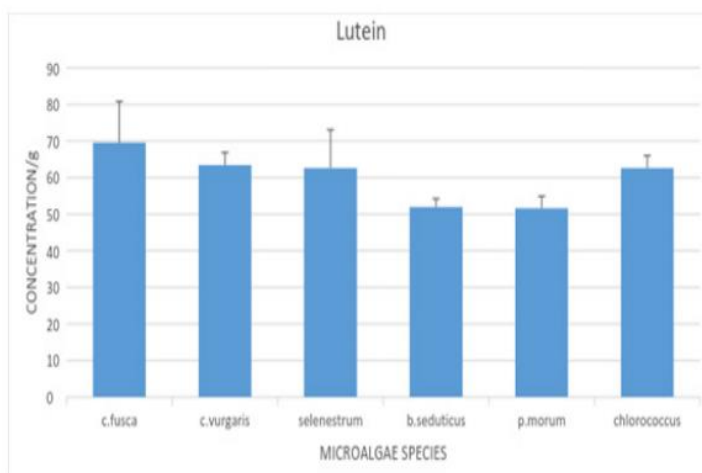


Рис. 1.9 - Вміст лютеїну у досліджуваних водоростях [10]

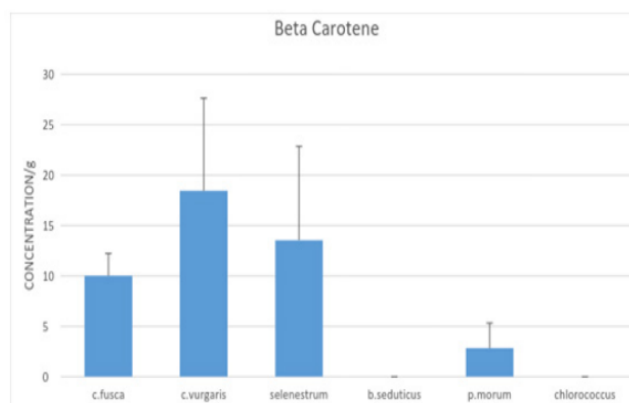


Рис. 1.10 - Вміст бета-каротину у досліджуваних водоростях [10]

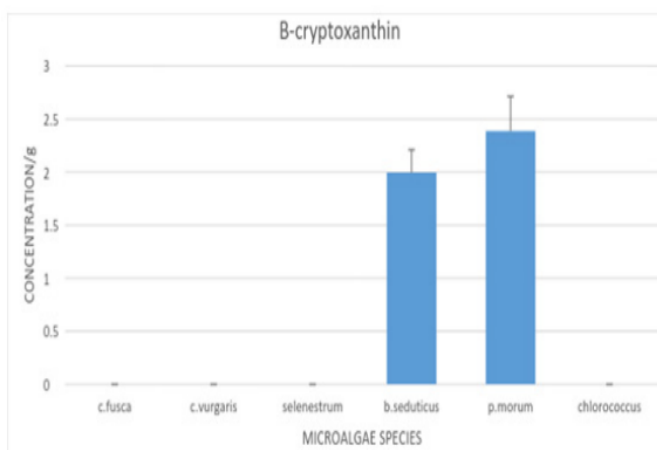


Рис. 1.11 - Вміст бета-криптоксантину у досліджуваних водоростях [10]

В даний час у промисловому масштабі виробництво каротиноїдів з мікроводоростей відноситься лише до астаксантину та β -каротину з

Haematococcus pluvialis і *Dunaliella salina*, відповідно. В організмах, що виробляють астаксантин, таких як *Phaffia rhodozyma* (дріжджі) або *H. pluvialis* (водорості), каротиноїди розташовані в ліпідних глобулах цитоплазми. Такі позапластичні каротиноїди також називають вторинними каротиноїдами. *H. pluvialis* представляє найбагатше біологічне джерело цього пігменту і культивується в широкому обсязі масштабовано кількома компаніями, використовуючи різні підходи. Комерційно вирощений *H. pluvialis* може накопичувати > 30 г астаксантину кг^{-1} сухої речовини.

Важливе значення має каротиноїдний пігмент астаксантин у косметичі, нутрицевтиках, продуктах харчування та комбікормовій промисловості. Астаксантин є сильним барвником і потужним антиоксидантом. Але існують і певні недоліки при використанні мікрowodоростей як продуцентів пігментів. Виробництво мікрowodоростей у великому масштабі пов'язане з такими недоліками, як слабкий контроль процесу, високе споживання CO_2 низьким ККД, проблеми забруднення та оптимальні потреби у великій кількості солі, води та сонячна радіація. З цих причин альтернативні стратегії/покращення операційних систем, такі як великі відкриті водойми, природні ставки, гребне колесо канали/ставки, трубчасті фотобіореактори були запропоновані та спробовані збільшити виробництво β -каротину. Ефективність вилучення та продуктивність β -каротину з *Dunaliella* можна підвищити у багато разів за допомогою двофазного біореактора, що складається з водної і біосумісної органічної фази. В даний час промисловість використовує закриті трубчасті біореактори для виробництва каротиноїдів. Цей біореактор було визнано кращим для виробництва біомаси та астаксантину з *H. Pluvialis* [25].

Фікоціанін та фікоеритин

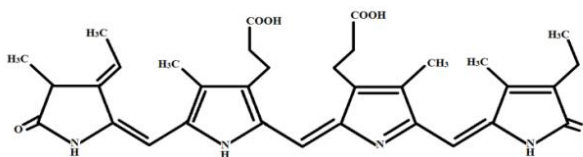


Рис. 1.12 - Хімічна формула фікоціаніну CH₃

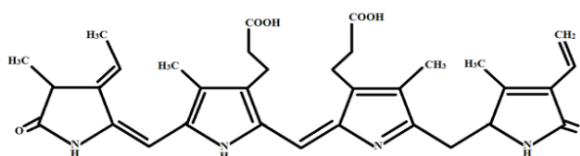


Рис. 1.13 - Хімічна формула фікоеритину CH₂

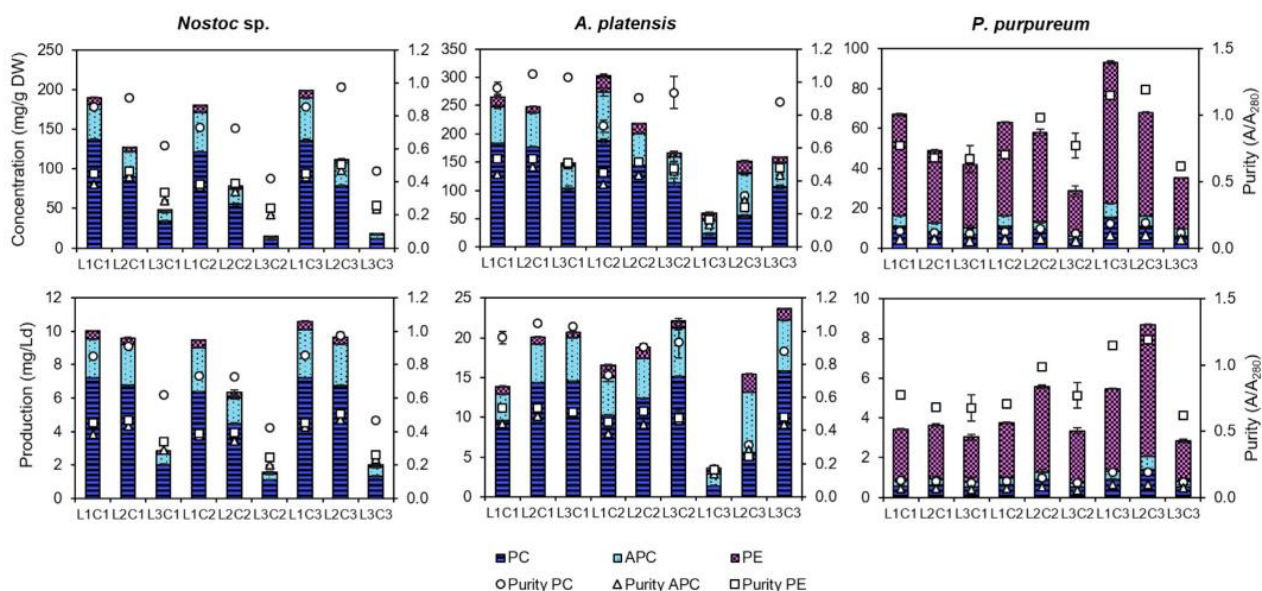
Молекули є допоміжними пігментами, водорозчинними та сильно флуоресцентними білками з лінійними простетичними групами (біліни), які пов'язані зі специфічними залишками цистеїну. Залежно від їх складу і змісту хромофори, РВР можуть бути класифіковані як фікоціаніни (РС, $\lambda_{\text{max}} = 610\text{--}625$ нм), фікоеритрини (РЕ, $\lambda_{\text{max}} = 490\text{--}570$ нм) та алофікоціаніни (АРС, $\lambda_{\text{max}} = 650\text{--}660$ нм). Основними комерційними продуцентами фікобіліпротеїнів є ціанобактерія *Arthrospira* та родофіт *Porphyridium*. Крім того, ціанобактерія *Nostoc* також була нещодавно висунутий як потенційне джерело фікобіліпротеїнів. Крім того, що вони відіграють важливу роль у метаболізмі пігментації мікрроводоростей, фікобіліпротеїни також демонструють деякі корисні біологічні функції, такі як антиоксидантна, антиациногенна, протизапальна, антиангіогенна, нейро- та гепатопротекторна. Фікобіліпротеїни мають високу комерційну цінність як натуральні барвники в нутрицевтиці, косметичі та фармацевтиці, а також застосовуються в клінічних досліджень і молекулярній біології, і як природний барвники в текстильній промисловості. Останні дослідження показали, що екстракти червоного пігменту з макроводоростей *Gracilaria*

vermiculophylla і синій пігмент з *Arthrospira platensis* показали рівномірний розподіл на бавовняних і вовняних тканинах з результатами демонструючи життєздатність і якість натурально пофарбованого текстилю.

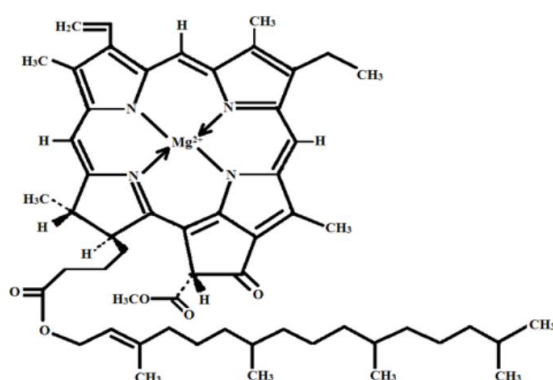
Nostoc sp. Результати культивування *Nostoc sp.* показують, що в середньому фікоціанін був найпоширенішим фікобіліпротеїном, а потім алофікоціанін і фікоеритрин. Максимальна сума концентрація фікобіліпротеїнів була отримана в L1C3 (199 мг/г DW), тоді як мінімум у L3C2 (15 мг/г DW). Концентрації спостерігалось в цьому дослідженні відповідно до попередніх результатів *Nostoc sp.* культивують у стандартних середовищах росту. Незалежно від початкових концентрацій NaNO_3 , зменшити світло інтенсивності утворює більше фікобіліпротеїнів з вищою чистотою спостерігається при середній інтенсивності світла (L2). Що стосується NaNO_3 , зміна його концентрації не впливала вміст фікобіліпротеїнів стільки ж, скільки змінюються умови освітлення, тобто згідно з дослідженням, проведеним Rosales Loaiza et al.. При низькій інтенсивності світла (L1) C3 мав найвищу концентрацію, тоді як при середній (L2) і високій (L3) інтенсивності світла C1 показав найвищий рівень концентрації та вихід. Підсумовуючи, за результатами цього експерименту, найкращі умови для виробництва фікобіліпротеїнів кращий рівень чистоти від *Nostoc sp.* були при слабкому та середньому освітленні інтенсивність (L1: 65 і L2: 150 мкЕ/м² s) з низьким або високим вмістом NaNO_3 концентрації (C1: 0,75 і C3: 2,25 г NaNO_3 /л).

A. Platensis. Результати культивування *A. platensis* показують, що в середньому фікоціанін був найпоширенішим фікобіліпротеїном, а потім алофікоціанін і фікоеритрин. Максимальна сума концентрація фікобіліпротеїнів була отримана в L1C2 (303 мг/г DW), тоді як мінімум у L1C3 (60 мг/г DW). Для низьких (C1) і середніх (C2) концентрацій NaHCO_3 , менша інтенсивність світла більше фікобіліпротеїнів. Однак для високого (C3) NaHCO_3 концентрації, вищі умови освітлення виробляли більше фікобіліпротеїни. Тим не менш, коли виробництво біомаси є Вважається, що

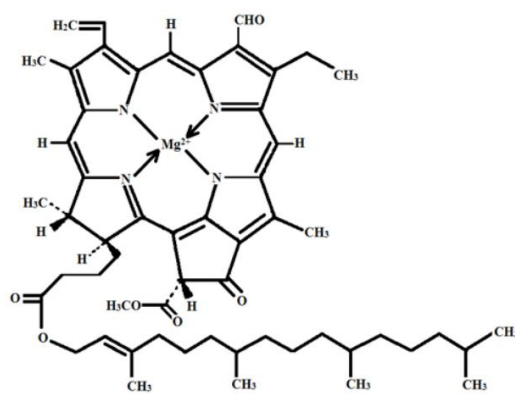
більш висока інтенсивність світла призвела до більш високого виходу фікобіліпротеїнів у всіх випадках, про що також повідомлялося в попередніх дослідженнях (да Кастро, 2015 рік; Марку та ін., 2012). Щодо впливу NaHCO_3 в середовище росту, більш високі концентрації призвели до зниження фікобіліпротеїнів вміст (Шарма та ін., 2014). Це пояснює найнижче концентрація та виробництво фікобіліпротеїнів у L1C3 (60 мг/г DW, з якого 23 мг PC/г DW) та L2C3 (152 мг/г DW, з який 55 мг PC/г DW), оскільки ці випробування були менш сприятливими стан серед усіх інших, тобто низький вміст фікобіліпротеїнів через високий вміст вуглецю та низьке виробництво біомаси через слабе освітлення умови. Спектри поглинання сирих екстрактів також показують це L1C3 і L2C3 отримали нижчу абсорбцію фікоціаніну ($\lambda = 615$ нм). Цікавим є те, що ці два випробування також демонструють вищу абсорбцію, ніж інші в діапазоні $\lambda = 420\text{--}440$ і $660\text{--}680$ нм, що свідчить про наявність хлорофілу а. У цьому сенсі, враховуючи, що поглинання алофікоціаніну вимірюється при $\lambda = 652$ нм і перекривається хлорофілом а, вміст о алофікоціанін міг бути переоцінений для цих випробувань, особливо після спостереження, що лише в цих двох випадках зміст алофікоціанін вище, ніж фікоціанін. Підводячи підсумок, виходячи з результати цього експерименту, найкращі умови для виробництва фікобіліпротеїни з кращими рівнями чистоти з *A. platensis* були на рівні середня та висока інтенсивність світла (L2: 150 та L3: 230 мкЕ/м² s) у поєднанні з низькими та середніми концентраціями NaHCO_3 (C1: 8,4 і C2: 16,8 г/л) [19].



хлорофіл (а і в)



хлорофіл А



хлорофіл Б

Хлорофіл - це пігмент зеленого кольору, який є секретним на два основних типи: хлорофіл а (Chl a) і хлорофіл б (Chl b). Різниця між кожним типом залежить від кільця замісники. Chl a в основному міститься в синьо-зелених водоростях і відіграє роль природного харчового барвника та антиоксиданту [24]. Пігменти жовто-оранжевого кольору, які називаються каротиноїдами, поділяються на два основних класи: ксантофіли та каротини. Зеаксантин (Zea) є домінуючим ксантофілом, який має здатність підтримувати здоров'я очей, напр. катаракта і вікова дегенерація жовтої плями (AMD) [13]. Тим часом β -каротин (β -Car), один із каротинів, є попередником вітаміну А і забезпечує антиоксидантну дію що стосується

здоров'я очей [26]. У цій статті буде коротко повідомте про склад домінуючих пігментів, що зустрічається в синьо-зелені водорості роду *Arthrospira sp.* і *Scytonema sp.* Обидва вид рясно культивується в Індонезії. Це У статті також обговорювалися економічні перспективи мікрowodоростей у сфері харчування та здоров'я [32].

Крім цих продуцентів є також дослідження щодо змішаних культур прісноводних мікрowodоростей *Chlorella vulgaris* і *Hyaloraphidium contortum*. Як от у досліденні - Виробництво біомаси та пігментів змішаної культури мікрowodоростей (*Hyaloraphidium contortum* і *Chlorella vulgaris*) шляхом культивування в середовищах на основі комерційних добрив (*Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (Hyaloraphidium contortum and Chlorella vulgaris) by cultivation in mediabased on commercial fertilizer*), де у дослідженні змішана культура прісноводних мікрowodоростей *Chlorella vulgaris* і *Hyaloraphidium contortum* з колекції мікрowodоростей лабораторії ім Біології та вирощування молюсків, Інститут тропічної зоології Центр Використовувався університет Венесуели. Штами підтримували в специфічному бульйоні і тверде агарове середовище. Культури зберігалися в камері з контрольованим умовах, за світлового періоду 12 годин світла та 12 годин темряви, з а інтенсивність світла 45 мкмоль квантів м-2с⁻¹ і середня температура середовища 20 ± 2 ° С. Освітлення виробляли лампами денного світла 20 і 40 Вт. типу. Мікрowodорості культивували на трьох поживних середовищах, з яких два комерційні неорганічні добрива Нітрофоска® (Азот амонійний (N) 6,5%, 5,5% Нітратний азот, порівнянний фосфор (P) 12,0% Розчинний калій (K) 17,0% Магній 2,0%, Сірка 6,0%, Кальцій 5,0%, 0,02% Бор і Цинк 0,01%) і Полівердол ® (8-8-6 NPK з мікроелементами для позакореневого обприскування. Середовище також містить невелику кількість вітаміну B1 і нафтилоцтової кислоти. Інші ЗМІ є традиційне середовище Guillard з кінцевим складом на літр 75 мг KNO₃, 5,65 мг NaH₂PO₄ 2H₂O, 4,360 мг EDTA Na₂, 3,150 мг FeCl₃ 6H₂O, 0,010 мг CuSO₄ 5H₂O, 0,022 мг ZnSO₄ 7H₂O, 0,010 мг CoCl₂ 6H₂O, 0,180 мг MnCl₂ 4H₂O,

0,006 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 мг кристалічний ціанокобаламін (B12), 0,100 мг соляного тіаміну (B1) і 0,001 мг кристалічного біотину (Stein, 1975). Чотирикратні культури були ініційовані при щільності клітин $5,0 \cdot 10^4$ клітин мл⁻¹ для кожного види мікроводоростей, що використовуються в контейнері ємністю 1000 мл з 750 мл стерильного живильного середовища. В результаті цього дослідження було виявлено відповідне комерційне добриво яке прекрасно показало себе як середовище для змішаної культури мікроводоростей, що дозволить без перешкод використовувати в промислових масштабах, адже це виявилось економічно доцільним та не шкідливим для кінечного продукту [17].

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Перспективні переваги як продуцентів пігментів мікроводоростей обумовили велику кількість досліджень в цьому напрямку. У даному розділі наведено аналіз останніх досліджень з розробки пігментів на основі обраних продуцентів - мікроводоростей *Spirulina platensis* (фікоціанін), *Chlorella vulgaris* (хлорофіл), *Dunaliella salina* (бета-каротину), *Haematococcus pluvialis* (астаксантин) та розроблено технологічні схеми отримання пігментів.

3.1 Технологія отримання пігменту із мікроводорості *Spirulina platensis*

Промислова технологія отримання фікоціаніну на основі продуцента *Spirulina platensis* наступна [15]: вирощували в 100 мл середовища Zarrouk при рН 9,5 в конічних колбах об'ємом 250 мл та інкубували при 24°+2°С та інтенсивності світла 3000 люкс за циклу L/D 16/8 год. Колби струшували двічі на день при 50 об/хв протягом 30 хв. Біомасу водоростей збирали через 30 днів центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 10 хв. Приблизно 7 г свіжої біомаси відбирали та двічі промивали дистильованою водою. Біомасу, отриману після другого промивання, мацерували в рідкому азоті, після мацерації та отжиму отримували дрібного порошку. Порошок суспендували в 10 мл 0,05 М натрій-фосфатного буфера (рН 7). Суспензію витримували в 1 мл буфера для лізису (1М Tris, рН 8; 0,5 М ЕДТА; 20% сахарози (мас./об.)). Додавали лізоцим до кінцевої концентрації 5 мг мл⁻¹ та інкубували протягом 2 годин при 37°С. Потім суміш центрифугували при 10000 об/хв протягом 15 хвилин і збирали прозорий синій супернатант, що містить фікоціанін. Синій супернатант фракційно осаджували сульфатом амонію при 30 і 50% (мас./об.). Білок, осаджений 30% (мас./об.) сульфатом амонію, відкидали. Отриманий з 50% розчином містив головним чином фікоціанін, який розчиняли в невеликому об'ємі 0,05 М Na-фосфатного буфера (рН 7). Розчин

потім піддають діалізу з тим же буфером, який розбавляють в 1000 разів. Діаліз проводили протягом 4 годин, змінюючи буфер між ними. Діалізовану пробу пропускали через Sephadex G-25 (1,5 x 20 см), попередньо врівноважену та елюйовану 0,005 М Na-фосфатним буфером (pH 7) при 1 мл при 1 хв. Перша фракція, що демонструє максимуми поглинання при 620 нм відповідає пігменту фікоціаніну. Його знову пропускали через колонку Sephadex-G-100 (2,5 x 20 см), попередньо врівноважену та елюйовану 0,005 М Na-фосфатним буфером (pH 7) при 1 хв.

Продукти, отримані після кожного етапу очищення, аналізували на загальний вміст білків, фікоціанін та піддавали спектральному скануванню на спектрофотометрі Beckman DU 64. SDS-PAGE проводили з використанням 12,5% поліакриламідного гелю, який включав 4% стек-гель.

Звичайними методами виділення внутрішньоклітинної речовини є руйнування клітин за допомогою обробки ультразвуком або під тиском і більш традиційно шляхом подрібнення з певними абразивами з подальшим центрифугуванням та/або фільтрацією. В наведеному дослідженні використали рідкий азот для руйнування клітин. Крім того, використовували лізоцим для руйнування клітин і для максимізації виходу фікоціаніну. Загальний вміст білка, вміст фікоціаніну та чистота фікоціаніну представлені в таблиці 3.1. Чистота фікоціаніну зростає після кожного етапу очищення. Чистота неочищеного фікоціаніну становила 0,97. Осад, отриманий після осадження сульфатом амонію, дав чистоту 1,43. Діалізована фракція при подальшому очищенні за допомогою гель-фільтраційної хроматографії з використанням колонки Sephadex G-25 дала чистоту 3,73. Фікоціанін вважається високочистим, якщо A_{620} перевищує 4. Поглинання менше 4 не вважається чистим і потрібне подальше очищення. Тому фракція потребує додаткового очищення. Було отримано коефіцієнт поглинання 2,8 за допомогою колонки з гідроксилапатитом. У цьому дослідженні використовували колонку Sephadex G-25 і отримали співвідношення 3,73, що близько до 4. Фракції, зібрані з колонки Sephadex G-25, додатково очищали та

знесолювали на колонці Sephadex G-100 (2,5 x 20 см) за допомогою 0,005 М Na-фосфатного буфера (pH 7) при 1 мл 1 хв. Колонку з гідроксилапатитом не використовували на даному етапі, її замінили іншою колонкою Sephadex G-100. Коефіцієнт поглинання для очищеного фікоціаніну зріс до 4,98. Чистота фікоціаніну, отриманого після кожного етапу, порівнюється зі стандартним стандартом (Таблиця 3.2). Очищений фікоціанін був додатково підтверджений спектральним скануванням поглинання (рис. 3.1). Чітко помітно загострення піку між сирим і очищеним екстрактом. Пік очищеного фікоціаніну різкіший, ніж пік неочищеного екстракту. Очищені фрагменти перевіряли на SDS-PAGE. Фракція на останньому етапі чітко показала дві смуги субодиниць фікоціаніну з молекулярною масою приблизно 16 і 19 кДа та спостерігалось чітке зменшення смуг забруднюючих білків після останнього етапу очищення.

Таблиця 3.1 - Ступінь чистоти фікоціаніну після різних етапів очищення з *S. platensis* [15]

Етапи	Загальний білок ($\mu\text{g}/\text{мл}^{-1}$)	Фікоціанін ($\mu\text{g}/\text{мл}^{-1}$)	Фікоціанін (%)	Домішки	G25/G100
Неочищений екстракт	2.40	1.30	54.16	45.84	0.97
Осадження сульфатом амонію	1.70	1.41	82.94	17.06	1.43
Пропуск через Колону Sephadex G-25	1.81	1.57	85.08	14.92	3.73
Пропуск через Колону Sephadex G-100	1.75	1.59	90.85	9.15	4.98

Вміст фікоціаніну після кожного етапу очищення збільшувався з кожним кроком. Спочатку неочищений екстракт до осадження сульфатом амонію зафіксував 54,16% фікоціаніну, і він поступово збільшувався. Вміст

фікоціаніну після останнього етапу очищення становив 90,85%. На кожному етапі очищення спостерігалось зниження вмісту домішок. У цьому повідомленні описано новий спрощений метод вилучення та очищення фікоціаніну з *Spirulina platensis*. Порівняно з іншими методами це є перевагою, оскільки не використовується іонообмінна хроматографія та не потрібен спеціальний інструмент для руйнування клітин. Крім того, уникають використання ультрацентрифуги [15].

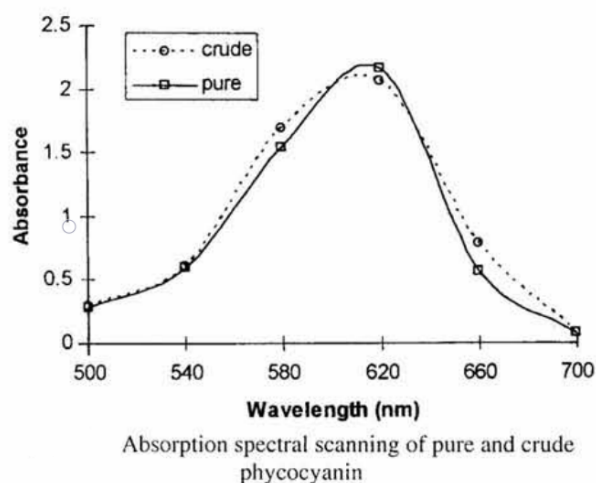


Рис. 3.1 - Спектри поглинання фікоціаніну при дослідженні [15]

Таблиця 3.2 - Порівняння чистоти при різних етапах очистки фікоціаніну [15]

Етапи очищення	Стандартний метод	Представлене дослідження
Неочищений фікоціанін	0.905	0.97
Осадження сульфатом амонію	1.26	1.43
Пропуск через Колону гідроксилапатиту	2.8	-
Пропуск через Колону DEAE Sphadex A-50	4.15	3.73
Пропуск через DEAE Sepharose CL-6B	-	-
Пропуск через Колону Sphadex G-100	-	4.98

Технологічна схема отримання пігментного препарату фікоціаніну



3.2 Технологія отримання пігменту з мікродорості *Chlorella vulgaris*

За аналізованою технологією [29] основні продукти, що отримуються, включають хлорофіл, активний полісахарид хлорели, функціональну олію хлорели та білок хлорели. На основі забезпечення активності функціональних компонентів хлорели оптимізовано процес для отримання вищих урожаїв і зниження собівартості продукції.

Технічне рішення цього методу полягає в наступному: збагачення хлорели за допомогою технології мембранного розділення для отримання концентрованої суспензії хлорели, додавання відповідного ферменту до рідкофазної системи для руйнування стінки, а розчин хлорели після руйнування стінки екстрагується за допомогою розчинника хлорофілу, при цьому можна отримати функціональні пігментні продукти та зменшити значення кольору наступних продуктів; після знебарвлення хлорели спочатку проводився ензимоліз у водній фазі, а потім екстрагувались функціональні олії та жири розчинником. Отриману знежирену хлорелу екстрагують кислотним методом. Частину активного полісахариду, що залишилася, висушують для отримання сирої хлорели.

1) Мембранне розділення

Концентрування культуральної рідини хлорели до 0,5-1% від початкового об'єму здійснювали за допомогою мікропористої фільтрувальної мембрани. Параметри розділення мембрани: швидкість поперечного потоку 2,4-5 см / с, робочий тиск 0,02-0,08 МПа, температура 20 ° С - 40 ° С.

2) Ферментативний гідроліз

Клітинна стінка хлорели в рідині концентрується шляхом гідролізу та конденсації за допомогою складного ферменту. Складними ферментами є целюлаза, пектиназа і ксиланаза. Параметри процесу ферментативного гідролізу - від 40 ° С до 60 ° С. Кількість становить 0,1 - 0,5% від маси сухої речовини в концентрованому розчині хлорели, а час ферментації - від 1 до 5

годин;

3) Підготовка пігменту

Етанол використовувався як екстрагент для вилучення хлорофілу з рідини *Chlorella vulgaris* при концентрації екстракції від 50 до 70%, температурі екстракції від 50 °C до 60 °C, тривалості екстракції від 2 до 6 годин, а потім центрифугуванням для отримання етанольного екстракту і знебарвлення. Хлорелу, етанольний екстракт концентрують при зниженому тиску з отриманням хлорофілу;

4) Ферментативна екстракція

Фермент був використаний для екстракції олії зі знебарвленої хлорели органічним розчинником. Органічним розчинником був петролейний ефір, н-гексан або циклогексан. Об'ємне співвідношення знебарвленої хлорели до органічного розчину становило від 1:5 до 1:10. Кількість протеази становить 2,5 - 8,5 ‰ від маси знебарвленої хлорели, температура 50 °C - 60 °C, час екстракції нейтральної протеази та органічного розчинника 3 - 7 год; центрифугуванням отримують фазу органічного розчинника і знежирену хлорелу;

5) Кислотна екстракція полісахаридів хлорели

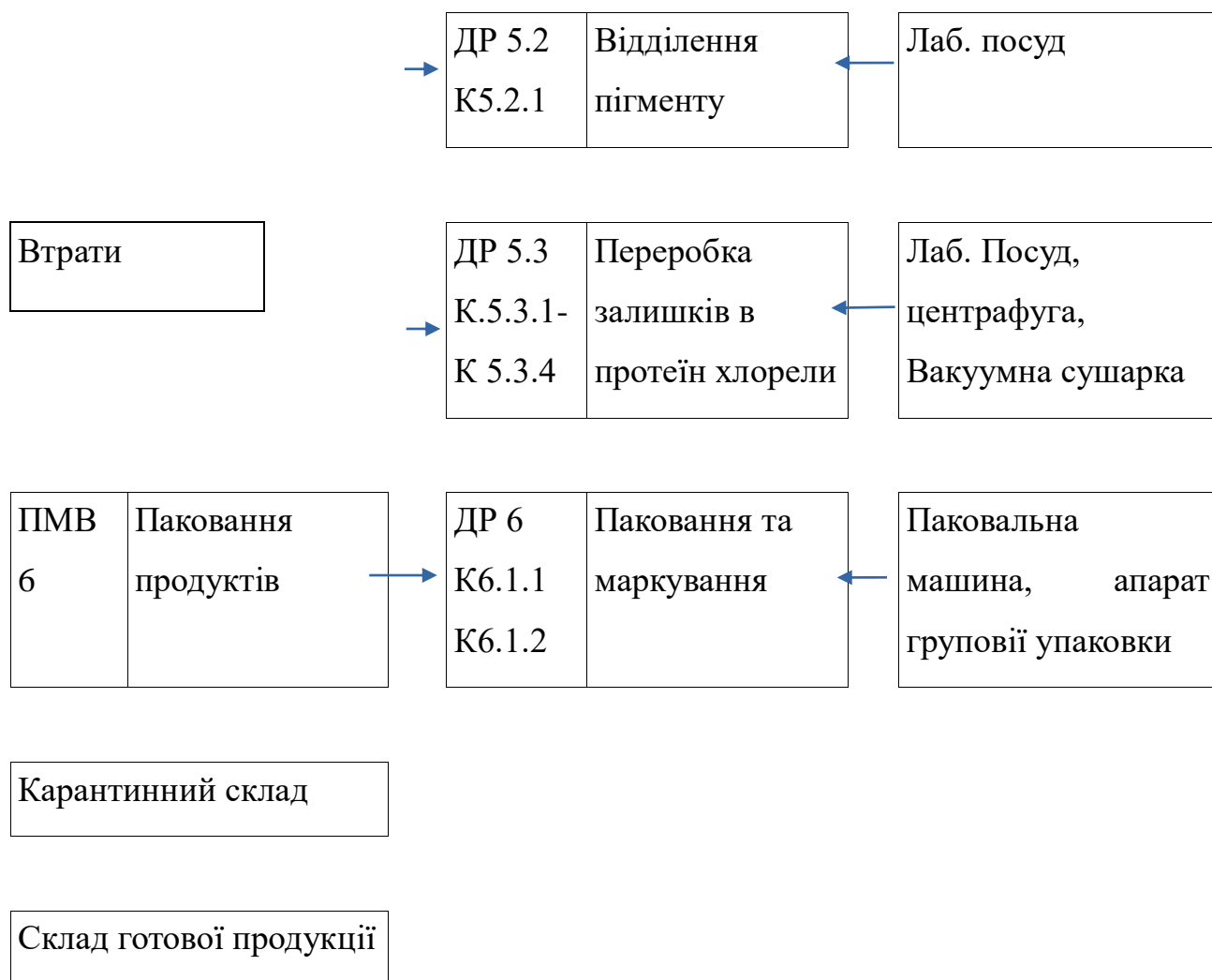
Активний полісахарид хлорели екстрагували кислотним методом із знежиреної хлорели. Значення рН кислоти було від 3 до 5, температура екстракції від 50 до 80 °C, а час екстракції від 2 до 4 годин. Водну фазу і осад отримували центрифугуванням. Після концентрування при зниженому тиску проводили осадження етанолом;

6) Сухий протеїн хлорели

Осад після екстракції полісахариду сушать при зниженому тиску, ступінь вакууму становить 0,01 - 0,03 МПа, а температура становить 40 °C - 50 °C, щоб отримати суху хлорелу [29].

Технологічна схема отримання пігментного препарату хлорофілу





3.3 Технологія отримання пігменту з мікроводорості *Dunaliella salina*

Експерименти за допомогою екстракції надкритичним CO₂ були проведені в пілотному масштабі Фраунгоферового центру для хіміко-біотехнологічних процесів (CBP, Leuna, Німеччина) [16]. Для кожного експерименту 100 г біомаси *Dunaliella salina* поміщали в 2 л екстрактора та змішати з приблизно 1300 г циліндричних наповнювальних кілець із нержавіючої сталі (5 × 5 × 0,3 мм). Кільця Рашига в посудині екстрактора пом'якшили агломерацію біомаси під час експериментів. Планшети покривали целюлозним фільтрувальним папером (2,5 мкм), щоб уникнути проникнення біомаси крізь плити в наступні трубопроводи та судини. CO₂ (62 бар) подавався з резервуару, який живиться від зовнішнього джерела CO₂. Розчинник CO₂ підвищували до досліджуваного тиску екстракції компресором і доводили до температури екстракції за допомогою теплообмінника. Співрозчинником був етанол (96 об.%), додається до потоку CO₂ з окремого живильного бака, підключеного поблизу вхідного отвору екстрактора. Вплив співрозчинника етанолу аналізували шляхом варіювання маси етанольної фракції в потоці розчинника на рівнях 0, 4 і 10 мас.%. Температуру і тиск етанолу регулювали аналогічно до потоку CO₂ теплообмінником і компресором. Загальна маса екстрагуючих розчинників CO₂ та етанолу вимірювали витратоміром, до приблизно 4–5 кг/год⁻¹. Час екстракції становив 180 хв. Під час дослідів температури 50, 60 і 70°C застосовувалися для екстрактора. Тиск екстракції досліджувалися 300, 400 і 500 бар.

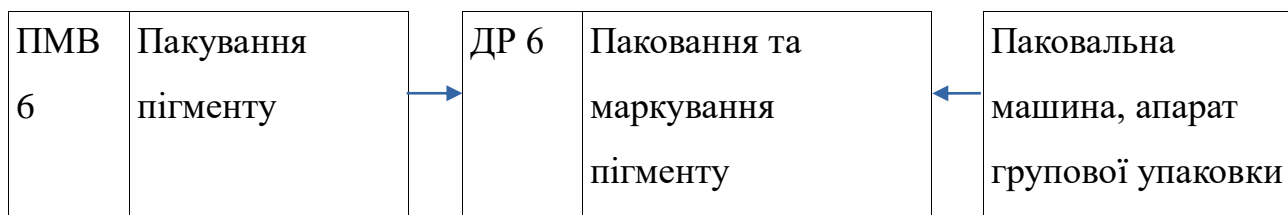
Після проходження екстракції, суміш розчинник-екстракт проводили в роздільна ємність, що працює при 50 °C і 62 бар. CO₂ випарюють і відокремлюють від суміші етанол-екстракт, і передають назад у резервуар CO₂. Для відбору проб рідкого спиртового екстракту відкривали випускний клапан що дозволяє повністю злити вміст сепаратора у попередньо зважені

коричневі скляні колби. В дослідях без співрозчинника, посудину сепаратора заповнювали 500 мл етанолу перед експериментом з екстракції, щоб полегшити збір екстрагованого β -каротину.

Зразки екстракту, відібрані під час експериментів, аналізували спектрофотометрично (спектрофотометр типу 7310, Jenway) за певної довжини хвилі [16].

Технологічна схема отримання пігментного препарату бета-каротину





Карантинний склад

Склад готової продукції

3.4 Технологія отримання пігменту з мікроводорості *Haematococcus pluvialis*

Отримання пігменту астаксантину із мікроводорості *Haematococcus pluvialis* проводили методом надкритичною рідинною екстракцією CO₂ (SFE-CO₂) [20].

Надкритичну рідинну екстракцію CO₂ проводили за допомогою надкритичного рідинного екстрактора Jeouu Rong з об'ємом екстрактора 0,3 л. Рідкий CO₂ з циліндра підвищувався до надкритичного стану за допомогою поршневого насоса та охолоджувався до -4°C на водяній бані перед тим, як потрапити в екстракційну ємність. Тиск екстракції регулювали за допомогою голчастих і мікрометричних клапанів. Температуру екстракції контролювали за допомогою термостату, швидкість потоку CO₂ регулювали ротаметром, а обсяг споживання реєстрував газовий лічильник. Під час кожного процесу, коли температура в екстракційній ємності досягала встановленої точки і мікрометричні клапани закривалися, мікроводорості завантажували в екстракційний контейнер з нержавіючої сталі (59,0 мм) з фільтрами з нержавіючої сталі, розміщеними на обох кінцях, щоб запобігти переносу. Потім контейнер поміщали в екстракційну ємність. Після цього в екстрактор додавали етанол як модифікатор. Тиск в екстракційній ємності регулювався голчастим клапаном, а час статичної екстракції встановлювався таймером.

Після екстракції сполук багату розчиненими речовинами рідину з екстрактора розширювали через мікрометричні клапани до атмосферного тиску. Вміст астаксантину в розчині екстракту аналізували за допомогою ВЕРХ. Викиди CO₂ збирали та переробляли для культивування мікроводоростей і зменшення впливу процесу на навколишнє середовище. Рідинну екстракцію SFE-CO₂ проводили у двох примірниках для кожного зразка. Відходи були зібрані та перероблені для культивування мікроводоростей і зменшення впливу процесу на навколишнє середовище.

Омилення ефірів астаксантину.

Омилення проводили для гідролізу ефірів астаксантину за модифікованим методом. Загалом, омилення проводили шляхом пропускання азоту через суміш, що складається з 5,0 мл екстракту SFE-CO₂, 15,0 мл метанолу та 6,0 мл розчину для омилення (NaOH, розчинений у воді) при 15°C протягом 24 годин. Процес проводили в темряві, а подачу азоту припиняли, коли об'єм зменшувався до 10,0 мл. Отриману рідину потім зберігали в темряві при -21°C для аналізу ВЕРХ.

Детально досліджено параметри, що впливають на ефективність вилучення астаксантину з *H. pluvialis*. Умови під час серійної екстракції астаксантину з *H. pluvialis* рідиною SC-CO₂ були оптимізовані щодо завантаження *H. pluvialis* (W, 3,33-33,3 г/л), швидкості потоку CO₂ (f, 2,0-12,0 NL/хв), де NL/хв - швидкість потоку в л/хв, виміряна за нормальних умов повітря), час статичної екстракції (t, 0,0-100,0 хв), тиск (P, 1000-5000 psi), завантаження модифікатора етанолу (VE, 3,08) -12,31 мл/г), температура (T, 30,0-80,0°C), склад модифікатора (E_c, 0,0-99,5% етанол у воді). Початкові умови екстракції SC-CO₂ та дані після експериментів з параметрами виділені найкращі наведено в таблиці 3.3 [20].

Таблиця 3.3 - Початкові та оптимальні умови для надкритичної рідинної екстракції CO₂ (SFE-CO₂) астаксантину з *Haematococcus pluvialis* [20]

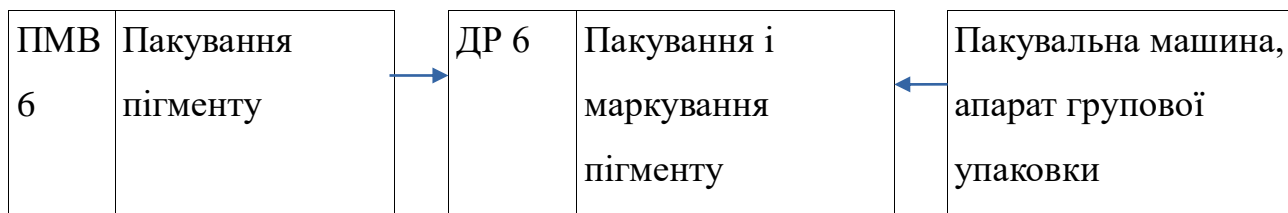
Параметр	Завантаження <i>Haematococcus</i> (w, г/л) ^{a)}	Швидкість потоку CO ₂ (f, NL/хв)	Час екстракції (t, хв)	Тиск при екстракції (P, psi)	модифікатор етанолу (V _e , мл/г) ^{b)}	Температура при екстракції (T, °C)	склад модифікатора (E _c , %)
Початкові налаштування	21.67	8.0	30.0	4000	6.15	60.0	99.5
Експериментальні налаштування	3.33-33.33	2.0-12.0	0-100	1000-5000	3.08-12.31	30-80	20-99.5
Оптимальні налаштування	21.67	6.0	20.0	4,500	9.23	50.0	99.5

a) вага біомаси *Haematococcus pluvialis* на об'єм екстракційної ємності

b) об'єм модифікатора етанолу на вагу біомаси *Haematococcus pluvialis*

Технологічна схема отримання пігментного препарату астаксантину





Карантинний склад

Склад готової продукції

3.5. Проведення попередніх досліджень із забарвлення зразків текстилю мікроводоростями

На кафедрі біотехнології були створенні умови для вирощування мікроводоростей - спіруліни та хлорели в умовах фотобіореактору (рис. 3.5) та проведенні дослідження із забарвлення зразків текстилю.

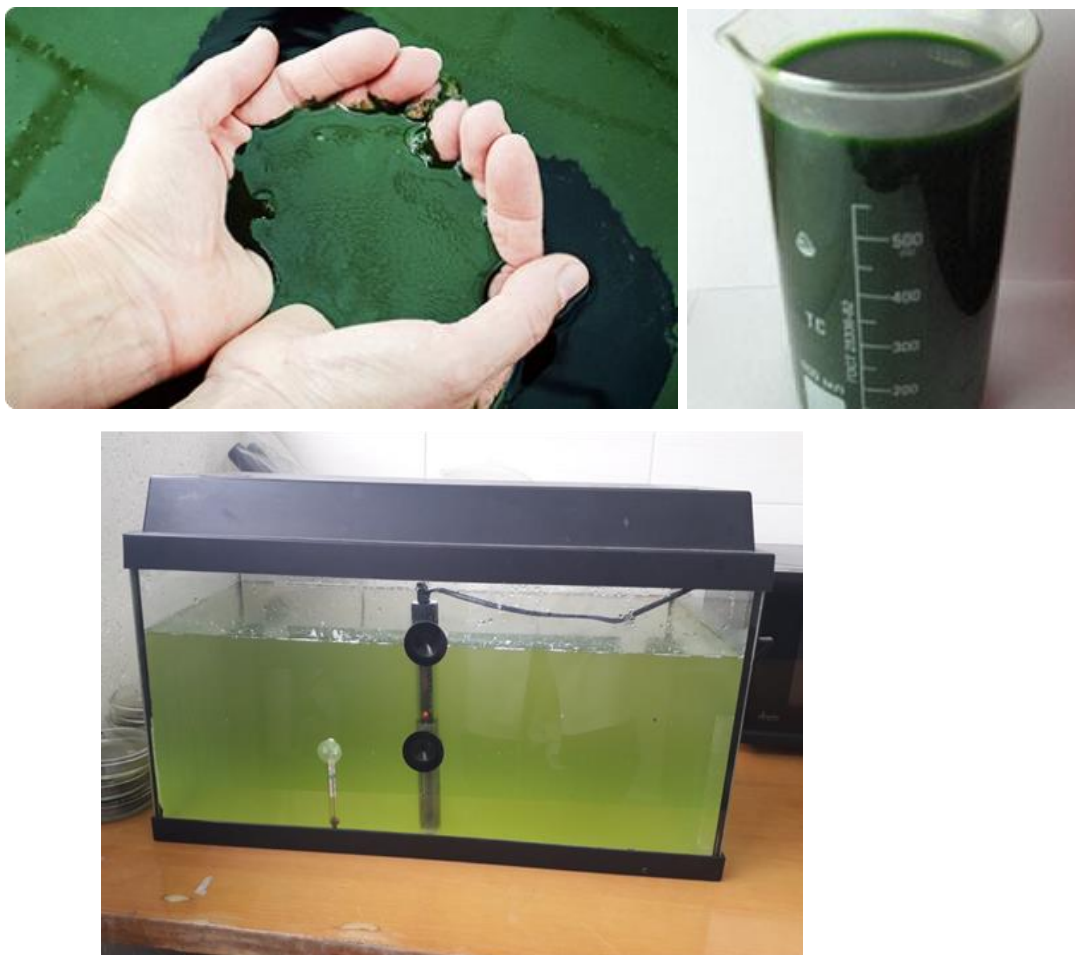


Рис. 3.5 - Етапи вирощування спіруліни в умовах фотобіореактору

На рис. 3.6 наведено зразки із різних типів текстилю, забарвлені відфільтрованою культуральною рідиною на початок дослідження, на рис. 3.7 - зразки через 3 міс. зберігання.

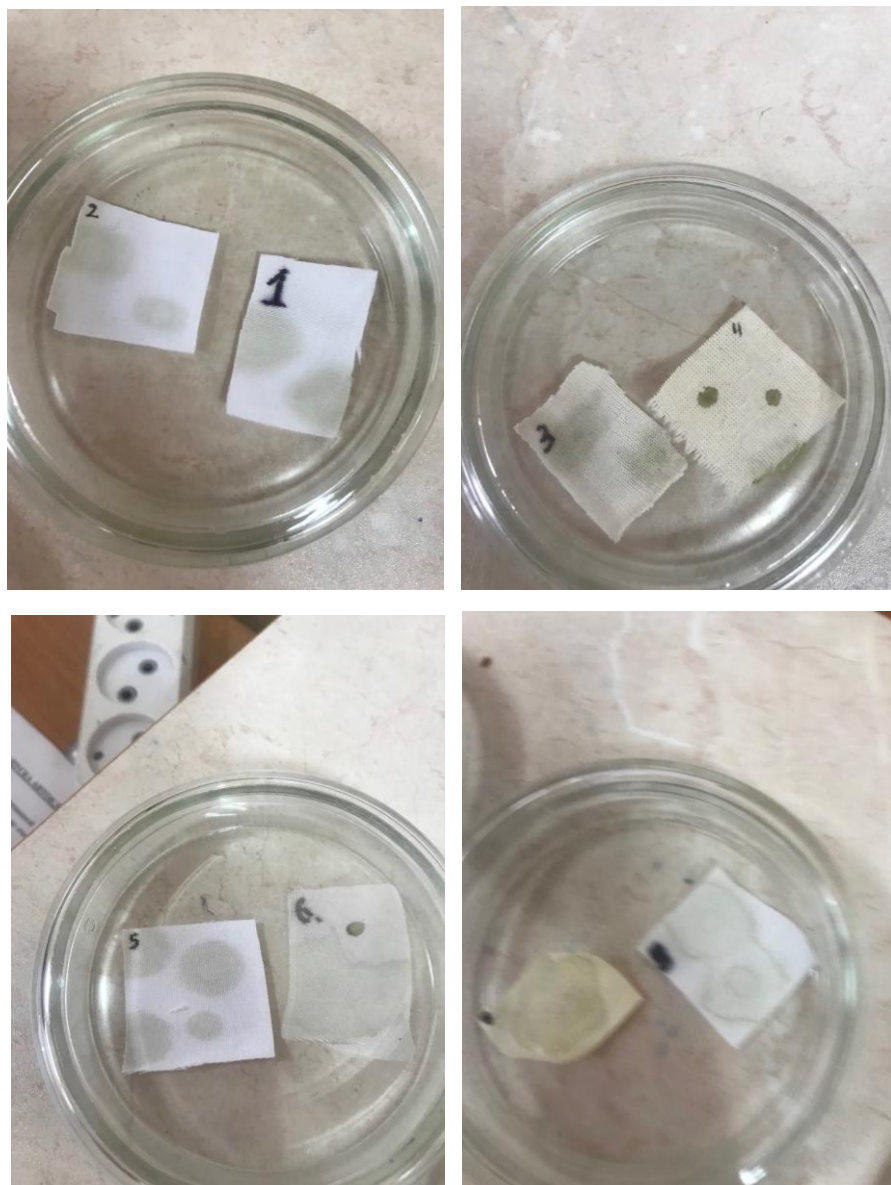


Рис. 3.6 - Зразки забарвлені культуральною рідиною на початок експерименту

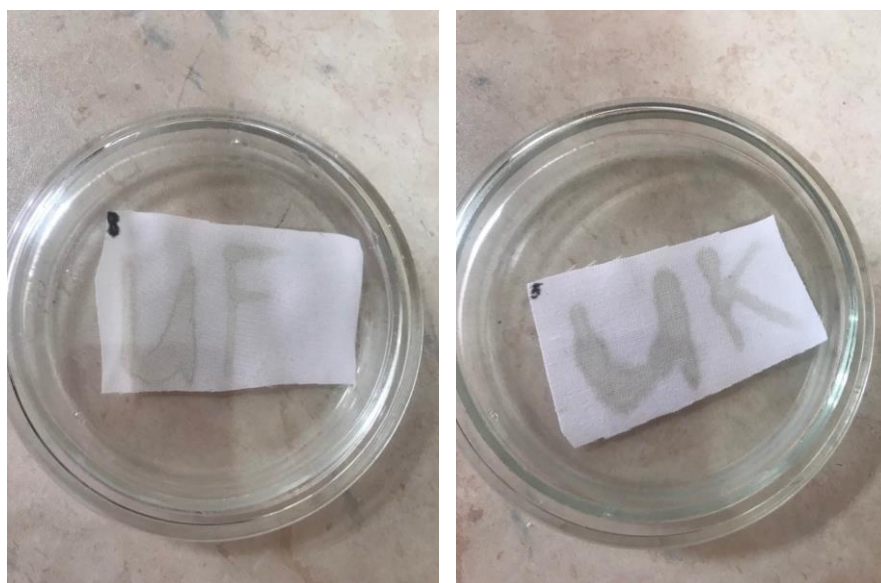




Рис. 3.7 - Зразки забарвлені культуральною рідиною через 3 міс. зберігання

Проведені дослідження показали, що забарвлені культуральною рідиною спіруліни зразки текстилю зберігали забарвлення навіть через 3 місяці зберігання, що доводить перспективність подальших досліджень щодо отримання пігментів за допомогою мікроводоростей.

ВИСНОВОК

1. Проведений аналіз сучасних досліджень показали, що мікроводорості є визнаними природними джерелами біопігментів.

2. Серед мікроводоростей основними джерелами біопігментів є види *Chlorella vulgaris* (хлорофіли), *Spirulina platensis* (фікоціанін), *Haematococcus pluvialis* (астаксантин) та *Dunaliella salina* (β -каротин), вирощування яких є класичним біотехнологічним процесом із розробленою технологією виділення та очищення пігментів.

3. Мікроводорості відносяться до фотосинтезуючих організмів і включають як прокаріотичні (наприклад, ціанобактерії: *Spirulina sp.*), так і еукаріотичні види (наприклад, зелені водорості: *Chlorella sp.*). Їх розмір коливається в діаметрі від 0,2 до 2,0 мкм.

Хоча ці мікроорганізми є фотоавтотрофними, вони можуть рости в фотогетеротрофних, гетеротрофних або міксотрофних умовах. Їх вирощують у двох різних системах: відкритій (озера та ставки) та фотобіореактори. Відкрите вирощування - найстаріший із використовуваних методів (з 1950 р.); проте фотобіореактори знаходять дедалі ширше застосування через здатність уникати впливу зовнішніх факторів та забруднення. Мікроводорості мають просту морфологію і можуть зростати в помірних умовах освітлення, солоності, рН, температури та концентрації поживних речовин або в екстремальних умовах.

4. Для отримання біопродуктів з біомаси мікроводоростей необхідно здійснити вибір штаму - продуценту, розробити методи культивування та подальші процеси збирання врожаю, попередньої обробки, екстракції та очищення. В експериментальному масштабі метод культивування вважається успішним, якщо він здатний генерувати велику кількість біомаси мікроводоростей, багатою на цільові цінні сполуки. Далі, після дозрівання етап збору проводять відділенням біомаси від культурального середовища. Процес збору включає різні технології, у тому числі фільтрацію, флотацію,

центрифугування та осадження. Попередня обробка є наступним кроком і використовується для руйнування клітинної стінки для підвищення ефективності вилучення біомолекул. Крім складу клітинних стінок, необхідно враховувати деякі основні критерії, такі як розташування бажаних пігментів у тканинах водоростей та їх стабільність, які різняться залежно від класу мікрowodоростей. Для руйнування клітинної стінки можуть використовуватись механічні та немеханічні методи. До механічних методів відносяться використання млинів, пресування, гомогенізації під високим тиском, мікрохвильової обробки, ультразвукової обробки. До немеханічних методів належать використання кислот, лугів, осмотичного шоку та ферментативних процесів. Етап екстракції залежить від цільового пігменту. Традиційні методи включають використання розчинників залежно від природи пігменту. Вибір розчинника повинен здійснюватися з урахуванням властивостей пігменту розчинятися та екстрагуватися, при цьому без впливу розчинника на властивості пігменту. Наприклад, етанол, ацетон, метанол, н-гексан, діетиловий ефір та хлороформ використовували для екстракції пігментів мікрowodоростей у поєднанні з різними методами (наприклад, омиленням, заморожуванням/відтаванням та нагріванням). До нетрадиційних методів відносяться електротехнологічні прийоми, наприклад, імпульсне електричне поле, високовольтні електричні розряди, екстракція за допомогою мікрохвиль/ультразвуку.

5. На основі аналізу сучасних досліджень складено технологічні схеми виробництва біопігментів на основі обраних видів мікрowodоростей.

6. Проведені попередні дослідження на кафедрі біотехнології НФаУ показали, що забарвлені культуральною рідиною спіруліни зразки текстилю зберігали забарвлення навіть через 3 місяці, що доводить перспективність подальших досліджень щодо отримання пігментів за допомогою мікрowodоростей. Це робить процес отримання пігментів на основі мікрowodоростей доступним для реалізації на вітчизняних підприємствах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вміст пігментів та фотосинтетична активність *Chlorella vulgaris* beijerinck (Chlorophyta) за дії натрію селеніту, цинку сульфїту і хрому хлориду : наук. журнал *Algologia* / О. І. Боднар, А. І. Герц, Н. В. Герц, В. В. Грубінко. 2019, 29(4). С. 404-424.
- 2 Вплив натрій селеніту на фотосинтетичну активність та енергетичний метаболізм у *Chlorella vulgaris* beij / Г. Б. Вінярська, О. І. Боднар, О. В. Галиняк. Збірник наукових праць VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Біологічні дослідження – 2017». С. 256-257.
3. Деякі аспекти застосування мікроводоростей для очищення стічних вод від сполук азоту та фосфору (огляд) / І. М. Незбицька, С. Й. Шаманський, С. В. Бойченко, Г. В. Харченко. Гідробіологічний журнал 2020. Т. 56. № 6. С. 65-83.
4. Джерела каротиноїдів та їх характеристика (огляд) / Л. В. Шевченко, В. М. Михальська, О. С. Яремчук, О. В. Камінська, О. В. Байєр. *Science Review*, 2018, 8(15). С. 19-28.
5. Порівняльний аналіз методів оцінки збереженості культур мікроводоростей *Dunaliella salina* Teodoresco та *Chlorococcum dissectum* Korshikov (Chlorophyta) після впливу стрес-факторів / Н. А. Чернобай, К. Д. Возовик, Н. Г. Каднікова. *Algologia*, 2021, 31(4). С. 353–364.
6. Спіруліна у дитячому харчуванні / О. Б. Шидловська, В. В. Цирульнікова, К. С. Вихор, І. О. Расторгуєва. *Молодий вчений*, 2018, 5 (57). С. 15-25.
7. Суспензія мікроводорості як стимулятор синтезу листкових пігментів щеплених саджанців винограду / Н. М. Зеленянська, О. М. Мандич. *Аграрні інновації*, 2022, № 14.
8. Сучасні перспективи використання *Chlorella vulgaris* в аквакультури / О. О. Смалюк, Л. А. Онуфрійчук, О. І. Боднар. Збірка наукових праць І

Всеукраїнської науково-практичної конференції (з міжнародною участю) «Екологічні дослідження у вищих навчальних закладах», Херсон: ФОП Вишемирський В.С., 2018. 330 с.

9. Удосконалення біотехнології виробництва бета-каротину / І. А. Бєлих, Ю. С. Малигіна. Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я, 2019, Ч.ІІ.

10. Удосконалення біотехнології отримання каротиноїдів / І. Є. Шапкіна, О. О. Варанкіна, О. М. Огурцов: Матеріали конференції Ч.3. 2018.

11. Чміль А.І. Енергетична ефективність процесу культивування мікроводорослей. "Енергетика і автоматика", №6, 2018.

12. A comprehensive review on chlorella- its composition, health benefits, market and regulatory scenario / Komal Rani, Dr. Nidhi Sandal, PK Sahoo / The Pharma Innovation Journal 2018

13. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. Bioresour/ Li, S.; Ji, L.; Shi, Q.; Wu, H.; Fan, J. / Technol. 2019, 292, 122048.

14. An attempt to induce an immunomodulatory effect in rowers with spirulina extract. : J. Int. Soc. Sports Nutr. / Juszkievicz, A.; Basta, P.; Petriczko, E.; Machaliński, B.; Trzeciak, J.; Łuczkowska, K.; Skarpańska-Stejnborn, A. / 2018, 15, 1–12.

15. A simple method for efficient extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* Geitler/ S Uday Bhaskar, G Gopalaswamy, R Raghu.

16. β -Carotene extraction from *Dunaliella salina* by supercritical CO₂ / Kristin Ludwig & Liisa Rihko-Struckmann & Gordon Brinitzer & Gerd Unkelbach & Kai Sundmacher, 16 February 2021.

17. Biomass and pigments productions of the mixed culture of microalge (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on comertional fertilizer / Diagnora Brito, Arturo Castro, Miguel Guevara, Ely Gomez, Ana Ramos-Villarroel and Nicoleta Maftei Aron.

18. Determination of natural carotenoid pigments from freshwater green algae as potential halal food colorants / Othman, R., Noh, N., *Nurrulhidayah, A.F. Anis Hamizah, H and Jamaludin, M. A. 14 December 2017, Journal homepage: <http://www.ifrj.upm.edu.my>

19. Economically Potential Pigments from Marine Blue-Green Algae for the Application in Food and Health / Katarina Purnomo Salima , Rosita Dwi Chandra, Heriyantoa, Dwi Susilaningsihd, Leenawaty Limantaraa, and Tatas Hardo Panintingjati Brotosudarmoa.

20. Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* by supercritical carbon dioxide fluid with ethanol modifier / Jian-Liang Pan, Hui-Min Wang, Chun-Yen Chen, Jo-Shu Chang.

21. Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria—A Review on Current Methodologies Fernando Pagels 1,2,3 / Ricardo N. Pereira 3 , António A. Vicente 3 and A. Catarina Guedes/ journal Applied Sciences

22. Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. Process Biochem. / Pan-utai, W.; Iamtham, S. / 2019, 82, 189–198.

23. Food and Drug Administration Listing of Color Additives Exempt Certification. Availableonline: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=73.530> (accessed on 5 January 2020).

24. High-value coproducts from algae—An innovational way to deal with advance algal industry. In Waste to Wealth / Mehta, P.; Singh, D.; Saxena, R.; Rani, R.; Gupta, R.P.; Puri, S.K.; Mathur, A.S., R.R., Agarwal, R.A., Kumar, R.P., Sukumaran, R.K., Eds.; Springer: Singapore, 2018; pp. 343–363.

25. Laurent Dufossé. Microbial Pigments From Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries: Chapter 4. / Alexandru Grumezescu; Alina Maria Holban. Handbook of food bioengineering, VII, Elsevier, pp.113-132, 2017, Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes

26. Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and

Industry and Market Trend Analysis / amara C. Silva, Isabel C. F. R. Ferreira, Madalena M. Dias and M. Filomena Barreiro

27. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. Mar. Drugs / Barkia, I.; Saari, N.; Manning, S.R. / 2019, 17, 304.

28. Microalgae–nutritious, sustainable aqua- and animal feed source / Dineshbabu, G.; Goswami, G.; Kumar, R.; Sinha, A. / Funct. Foods 2019, 62, 103545.

29. Method for continuously extracting functional components of *Chlorella vulgaris*/ Xiaoffei Guo, Yutang He, Huadong Liu, He Liu, Danshi Zhu / patent CN101736045A.

30. Method for obtaining an aqueous extract of *Dunaliella salina* and cosmetic uses of same / Imbert Isabelle[FR], Le Mestr Audrey[FR], Chabert Rachel[FR], Afriat Staloff Isabelle [IL], Yadin Boaz[IL], Oger Elodie[FR] / patent EP3806819A1.

31. Method for producing astaxanthin by heterotrophic culture of *Haematococcus pluvialis* / Zheng Yubin [CN]; Liu Shuaishuai [CN]; Cao Peixin [CN]; Dai Yunfa [CN]; Xie Shiyi [CN] / patent CA3153203A1.

32. Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater / Larissa T. Arashiro, María Boto-Ordóñez, Stijn W.H. Van Hulle, Ivet Ferrer, Marianna Garfí, Diederik P.L. Rousseau / Bioresource Technology journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech.

33. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques./ İlter, I.; Akyıl, S.; Demirel, Z.; Koç, M.; Conk-Dalay, M.; Kaymak-Ertekin, F. / J. Food Compos. Anal. 2018, 70, 78–88.

34. Pigments from microalgae. In Handbook of Microalgae-Based Processes and Products / Pagels, F.; Salvaterra, D.; Amaro, H.M.; Guedes, A.C, Jacob-Lopes, E., Queiroz, M.I., Maroneze, M.M., Zepka, L.Q., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 465–492.

35. Potential of *Chlorella* as a Dietary Supplement to Promote Human Health / Tomohiro Bito, Eri Okumura , Masaki Fujishima and Fumio Watanabe /

Nutrients 2020, 12(9), 2524.

36. Spirulina–From growth to nutritional product: A review.: Trends Food Sci. Technol / Soni, R.A.; Sudhakar, K.; Rana, R.S. / 2017, 69, 157–171.

37. Spirulina – From growth to nutritional product: A review / Ruma Arora Sonia-K.Sudhakarac- R.S.Rana журнал Trends in Food Science & Technology Volume 69, Part A, November 2017, Pages 157-171.

38. Valuable bioproducts obtained from microalgal biomass and their commercial applications: A review. Environ. Eng. / Bhalamurugan, G.L.; Valerie, O.; Mark, L. / Res. 2018, 23, 229–241.

ДОДАТКИ

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА АПТЕЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКІВ

Сертифікат № 100

Цим засвідчується, що
Зима Е. П.

брав(ла) участь у X Міжнародній науково-практичній конференції

“Сучасні досягнення фармацевтичної
технології і біотехнології”

10-11 листопада 2022 р.

Ректор НФаУ, проф.



м. Харків, Україна, онлайн

Алла КОТВИЦЬКА



Сучасні досягнення
фармацевтичної технології і
біотехнології
X Міжнародна науково-практична конференція
10-11 листопада 2022 р.



Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет

Цим засвідчується, що

Зима Е. П.

**Науковий керівник:
Калюжная О. С.**

брав(ла) участь у роботі III Всеукраїнської
науково-практичної конференції
з міжнародною участю

YOUTH PHARMACY SCIENCE



Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.

Алла КОТВИЦЬКА

7-8 грудня 2022 р.
м. Харків
Україна

СЕРТИФІКАТ

Національний фармацевтичний університетФакультет Фармацевтичних технологій та менеджментуКафедра БіотехнологіїСтупінь вищої освіти магістрСпеціальність 162 Біотехнології та біоінженеріяОсвітня програма Біотехнологія**ЗАТВЕРДЖУЮ****Завідувачка кафедри**Біотехнологіїд. фарм. н., проф.Наталя ХОХЛЕНКОВА« 03 » жовтня 2022 року**ЗАВДАННЯ****НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ**Едуарда ЗИМИ1. Тема кваліфікаційної роботи *Дослідження щодо отримання пігментів із мікроводоростей*керівник кваліфікаційної роботи *Ольга КАЛЮЖНАЯ*, к.фарм. н., доц.(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, науковий ступінь, вчене звання)затверджений наказом НФаУ від «14» жовтня 2022 року № 2272. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи *27.01.2023*3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи *об'єкт – види мікроводоростей *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina**, які є перспективними у виробництві основних груп пігментів4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) *вступ, огляд літератури, об'єкти та методи дослідження, експериментальні дослідження, висновок, література*

5. Дата видачі завдання 03 жовтня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Робота з літературою	жовтень 2022	Виконано
2	Проведення досліджень	листопад 2022	Виконано
3	Оформлення кваліфікаційної роботи	грудень 2022	Виконано
4	Здача кваліфікаційної роботи	27 січня 2023	Виконано

Здобувач вищої освіти

(підпис) Едуард ЗИМА
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

Керівник кваліфікаційної роботи

(підпис) Ольга КАЛЮЖНАЯ
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 227
по Національному фармацевтичному університету
від 14 жовтня 2022 року

Про затвердження тем кваліфікаційних робіт

Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти 2 курсу, спеціальність – 162 Біотехнології та біоінженерія, освітня програма – Промислова біотехнологія, ступінь вищої освіти – магістр, термін навчання – 1 р. 6 міс., денна форма.

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
Зима Едуард Павлович	Дослідження щодо отримання пігментів із мікроводоросте й	Research on obtaining pigments from microalgae	к.фарм.н, доцент, доцент закладу вищої освіти закладу вищої освіти кафедри біотехнології Калюжная О.С.	к.фарм.н, доцент, доцент закладу вищої освіти кафедри технологій фармацевтичних препаратів Манський О.А.

Ректор

Алла КОТВИЦЬКА

Вірно:

Декан факультету фармацевтичних технологій та менеджменту



Наталія ЖИВОРА

ВИСНОВОК**Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти**

№ 111211 від «17» січня 2023 р.

Проаналізувавши випускну кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Зими Едуарда Павловича, 2 курсу, _____ групи, спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, на тему: «Дослідження щодо отримання пігментів із мікрроводоростей / Research on obtaining pigments from microalgae», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіювання).

**Голова комісії,
професор**

**Інна ВЛАДИМИРОВА**

1%

21%

ВІДГУК

керівника на кваліфікаційну роботу магістерського ступеня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Едуарда ЗИМИ

(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

на тему: Дослідження щодо отримання пігментів із мікроводоростей

Актуальність теми Останніми роками помітно зріс інтерес до культивування водоростей через їх практичний потенціал для людини. На сьогоднішній день вирощування водоростей спрямоване на виробництво речовин і технологій високої ринкової вартості, таких як пігменти, білки, ліпіди, вуглеводи, мінерали, вітаміни та інші, які можуть бути використані як джерела фармацевтичних препаратів, косметики, дієтичних добавок. Водорості, як і рослини, синтезують велику кількість пігментів, склад і кількість яких може відрізнятися залежно від виду та умов зростання. Їх вирощування, порівняно з рослинами, має певні переваги, такі як: швидший ріст, більш висока продуктивність біомаси, менша площа землі для вирощування, дешевше виробництво. З цієї причини водорості є цікавою альтернативою для виробництва пігментів порівняно з традиційними джерелами, тому тема роботи є актуальною.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість У роботі проведено аналіз сучасних джерел літератури щодо виробництва пігментів на основі видів мікроводоростей, складені технологічні схеми та проведені власні попередні дослідження щодо можливості забарвлення пігментами культуральної рідини водоростей текстилю, що може бути використано при розробці вітчизняних технологій виробництва біопігментів.

Оцінка роботи Проведений у роботі аналіз сучасних досліджень показали, що мікроводорості є визнаними природними джерелами біопігментів. Серед мікроводоростей основними джерелами біопігментів є види *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, *Haematococcus pluvialis* та *Dunaliella salina*, вирощування яких є класичним біотехнологічним процесом із розробленою технологією виділення та очищення пігментів. На основі аналізу сучасних досліджень складено технологічні схеми виробництва біопігментів. Це робить процес отримання пігментів на основі мікроводоростей доступним для реалізації на вітчизняних підприємствах.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту Робота містить всі необхідні розділи, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт магістра. Дана кваліфікаційна робота може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії, а її автор заслуговує присвоєння кваліфікації «магістр з біотехнологій та біоінженерії».

Керівник

(підпис)

Ольга КАЛЮЖНАЯ

(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

" 24 " січня 2023 р.

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу Едуарда ЗИМИ
(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ)

на тему Дослідження щодо отримання пігментів із мікроводоростей

Актуальність теми Мікроводорослі привертають увагу дослідників як екологічно чисті, стійкі та потенційні джерела різноманітних біологічно активних сполук. Біопігменти є найважливішими компонентами світлозбирального комплексу мікроводоростей; каротиноїди та фікобіліпротейни відіграють основну роль у збиранні світла та виконують фотозахисну роль при надлишку світлової енергії. Останнім часом попит на ці біопігменти зростає через їх великий біологічний потенціал і сприятливий вплив на здоров'я людини (антиоксидантні, протиракові, проти запальні, імуномодулюючі властивості). Тому тема роботи є актуальною.

Теоретичний рівень роботи У роботі на достатньо високому теоретичному рівні розглянуто джерела отримання пігментів, переваги та недоліки кожного з них, описані види пігментів, які застосовуються у практичній діяльності людини, види водоростей, які є перспективними для отримання біопігментів, загальна та конкретні технології виробництва біопігментів.

Пропозиції автора по темі дослідження У кваліфікаційній роботі обґрунтовано рецептуру лінійки натуральних желеподібних десертів; розроблено технологію та складено технологічну схему виробництва натуральних желеподібних десертів; проаналізовано сировину базу для отримання пектину натурального походження.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість У роботі проведено аналіз сучасних джерел літератури щодо виробництва пігментів на основі видів мікроводоростей, складені технологічні схеми та проведені власні попередні дослідження щодо можливості забарвлення пігментами культуральної рідини водоростей текстилю, що може бути використано при розробці вітчизняних технологій виробництва біопігментів

Недоліки роботи У роботі зустрічаються граматичні помилки та невлучні фрази.

Загальний висновок і оцінка роботи Робота містить всі необхідні розділи, результати досліджень, виконана відповідно до вимог та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії.

Рецензент _____ доцент Олександр МАНСЬКИЙ _____
(підпис) (вчене звання, Ім'я, ПРИЗВИЩЕ)

«25» січня 2023 р.

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 7

«26» січня 2023 року

м. Харків

Засідання кафедри біотехнології

Голова: завідувачка кафедри, доктор фармацевтичних наук, професор Наталя ХОХЛЕНКОВА.

Секретар: асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

ПРИСУТНІ: завідувачка кафедри Наталя ХОХЛЕНКОВА, професор закладу вищої освіти Леонід СТРЕЛЬНИКОВ, професор закладу вищої освіти Оксана СТРИЛЕЦЬ, доцент закладу вищої освіти Ольга КАЛЮЖНАЯ, доцент закладу вищої освіти Микола РИБАЛКІН, доцент закладу вищої освіти Юлія АЗАРЕНКО, доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ, асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

Про представлення до захисту до Екзаменаційної комісії випускних кваліфікаційних робіт.

I. СЛУХАЛИ:

Здобувача вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія» ОП «Промислова біотехнологія» денної форми 2 курсу 1 групи Едуарда ЗИМУ з доповіддю на тему «Дослідження щодо отримання пігментів із мікроводоростей» (керівник доцент закладу вищої освіти Ольга КАЛЮЖНАЯ).

УХВАЛИЛИ:

Рекомендувати до захисту кваліфікаційну роботу.

Голова

завідувачка кафедри,
доктор фармацевтичних наук,
професор

_____ Наталя ХОХЛЕНКОВА
(підпис)

Секретар

асистент закладу вищої освіти _____ Аліна СОЛОВЙОВА
(підпис)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувач вищої освіти Едуард ЗИМА
(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ)

до захисту кваліфікаційної роботи

за галуззю знань 16 Хімічна та біоінженерія

спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітньою програмою Промислова біотехнологія

на тему: «Дослідження щодо отримання пігментів із мікроводоростей»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ Наталія ЖИВОРА

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Едуард ЗИМА рекомендується до захисту в Екзаменаційну комісію з кваліфікаційною роботою на тему: «Дослідження щодо отримання пігментів із мікроводоростей»

Керівник кваліфікаційної роботи _____ Ольга КАЛЮЖНАЯ

“24” січня 2023 року

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Едуард ЗИМА допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри біотехнології _____ Наталя ХОХЛЕНКОВА

“26” січня 2023 року

Кваліфікаційну роботу захищено
у Екзаменаційній комісії
« 01 » лютого 2023 р.

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,
кандидат сільськогосподарських наук
_____ / Олена ЩЕРБАК /