

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ  
И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 544.773.33

ПОЛУЧЕНИЕ О/В-ЭМУЛЬСИЙ, СОДЕРЖАЩИХ АСТАКСАНТИН,  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОФЛЮИДНЫХ УСТРОЙСТВ

© 2020 г. Ю. В. Ульянова<sup>1</sup>, А. М. Попов<sup>2</sup>, Н. П. Бабиченко<sup>3</sup>, К. В. Горин<sup>3</sup>, Я. Э. Сергеева<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>2</sup> Европейский источник синхротронного излучения, Гренобль, Франция

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

\*E-mail: yanaes2005@gmail.com

Поступила в редакцию 28.04.2020 г.

После доработки 25.05.2020 г.

Принята к публикации 26.05.2020 г.

Астаксантин – жирорастворимый кетокаротиноид, биологические функции которого обусловлены высокой антиоксидантной активностью, что делает перспективным его применение в фармацевтической, косметической, пищевой и кормовой промышленности. Однако нестабильная структура астаксантина существенно ограничивает его использование. Исследована возможность применения микрофлюидной системы для получения стабильных эмульсий типа масло-в-воде (oil-in-water, O/W), масляная фаза которых содержит пигменты микроводоросли *Haematococcus pluvialis* IPPASH-629, основным компонентом которых является астаксантин в свободной или этерифицированной форме. Показано, что пигментный состав масляной фазы влияет как на распределение капель эмульсии по размерам, так и на стабильность. Эмульсия, содержащая суммарные каротиноиды микроводоросли *H. pluvialis*, главным образом моноэфиры астаксантина, характеризовалась высокой степенью инкапсуляции, наибольшей степенью полидисперсности, содержание астаксантина после 56 сут хранения при комнатной температуре оставалось практически неизменным.

DOI: 10.1134/S1992722320010100

ВВЕДЕНИЕ

Астаксантин (3,3'-дигидрокси- $\beta$ , $\beta'$ -каротин-4,4'-дион) – ярко-красный природный жирорастворимый кетокаротиноид, обладающий высокой антиоксидантной активностью. Наличием данного пигмента обусловлена окраска лососевых рыб, обнаружен астаксантин у ракообразных и микроорганизмов: представителей бактерий, микроводорослей, дрожжей [1].

Астаксантин можно выделить из упомянутых выше природных источников или получить синтетическим путем. Однако синтетический астаксантин законодательно разрешен для применения только в качестве пищевой добавки для рыб [2]. Для более широкого применения с целью удовлетворения потребностей человека в качестве компонента пищевых продуктов, в косметической и фармацевтической промышленности используется природный астаксантин, основным коммерческим продуцентом которого является микроводоросль *Haematococcus pluvialis* [3, 4].

Биологическая активность астаксантина, доказанная в опытах как *in vitro*, так и *in vivo*, вызвала большой интерес в связи с перспективным использованием данного каротиноида для профи-

лактики и лечения широкого спектра заболеваний [5, 6].

Доказано положительное воздействие астаксантина на состояние кожи человека, в том числе защита от фотостарения под воздействием УФ-лучей [7, 8]. Показано, что астаксантин обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими свойствами, оказывает проапоптотическое и противоопухолевое действие [9, 10].

Согласно данным [11–13] антиоксидантная эффективность астаксантина может быть связана с сопряженными двойными связями в молекуле. Однако из-за своей ненасыщенной структуры астаксантин чувствителен к температуре, окислению, воздействию света в процессе производства и хранения. Нестабильность астаксантина вызывает снижение его биологической активности, что существенно ограничивает его использование.

Согласно литературным данным для повышения стабильности и биодоступности астаксантина весьма эффективна инкапсуляция: получение различных эмульсий, коллоидных дисперсий, суспензий и наночастиц. Для коммерческого использования и применения в случае фармпрепа-

ратов важна скорость высвобождения инкапсулированного материала, при этом необходимо, чтобы системы доставки оставались физически и химически стабильными при воздействии различных сред, хранении, транспортировке, а также способствовали увеличению срока годности конечного продукта [14].

Эмульсии масло-в-воде (О/В) представляют собой смесь дисперсной и непрерывной фазы в четко определенной объемной доле. В О/В-эмульсиях астаксантин растворяется в масляной фазе.

Большинство методов эмульгирования, в основе которых лежит высокое напряжение сдвига, таких как гомогенизация под действием высокого давления, ультразвуковая гомогенизация, механическое диспергирование, сопровождаются нагревом эмульсионной системы во время процесса инкапсулирования, что может привести к преждевременной деградации каротиноидов, в том числе астаксантина. Кроме того, сложность в регулировании и подборе оптимальных параметров процесса позволяет создавать полидисперсные системы, которые могут иметь низкую стабильность и снижать эффективность инкапсулирования [15]. Для повышения монодисперсности и ограничения теплового воздействия в последние десятилетия были разработаны многочисленные микрофлюидные устройства.

Микрофлюидная система представляет собой компактное устройство, позволяющее работать с небольшими количествами (нанолитровый объем) при использовании каналов с размерами 10–100 мкм [16]. Использование микрофлюидных устройств в процессе эмульгирования имеет преимущества благодаря “мягким” условиям проведения процесса, высокой пропускной способности и более точной способности контролировать параметры процесса.

Кроме того, микрофлюидные устройства характеризуются высокой производительностью, определяемой геометрией каналов (ширина, глубина), вязкостью фаз, свойствами смачивания поверхности канала, соотношением скорости потоков несмешивающихся фаз и межфазным натяжением [17].

Таким образом, микрофлюидное эмульгирование является одним из наиболее интересных и перспективных методов, позволяющих проводить процесс эмульгирования в “мягких” условиях, не нарушая структуру и свойства инкапсулированного соединения, регулировать параметры процесса, в результате чего можно получить стабильные капли.

Цель данной работы – изучение возможности использования микрофлюидной системы для получения стабильных О/В-эмульсий, масляная фаза которых содержит пигменты микроводоросли *H. pluvialis* IPPASH-629, оценка стабильности

полученных эмульсий и сохранности включенного в их состав астаксантина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Объект исследования.* Используемые в работе пигменты были выделены из биомассы микроводоросли *H. pluvialis* IPPASH-629 (коллекция микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН).

*Культивирование* проводили на питательной среде ОНМ (optimal *Haematococcus* medium) [18] следующего состава (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 0.41,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0.03,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.246,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.11; микроэлементы (1 мл/л): биотин – 25 мкг/л; тиамин – 17.5 мкг/л; приготовленной на дистиллированной воде без добавления витаминов, начальное значение pH среды 6.5–6.7.

Выращивание проводили в колбах Эрленмейера на 250 мл, затем на 1000 мл и в итоге 5000 мл при постоянном освещении люминесцентными лампами дневного света. Вегетативные клетки выращивали при 2.5 Вт/м<sup>2</sup> ФАР (фотосинтетически активная радиация), затем культуру переносили на 50 Вт/м<sup>2</sup> ФАР и культивировали в течение восьми суток при непрерывном барботировании смесью  $\text{CO}_2$  и воздуха (1:99) при температуре  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ . Клетки микроводорослей отделяли центрифугированием и до проведения анализов хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

*Экстракция.* Выделение суммарных пигментов проводили согласно [19]. Суммарные каротиноиды получали путем омыления биомассы микроводоросли 5%-ным раствором КОН в 30%-ном метаноле ( $70^\circ\text{C}$ , 5 мин) [20]. Свободный астаксантин получали ферментативным гидролизом согласно [21].

Состав пигментов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе Agilent Technologies (США) модели 1200 с DAD-детектором; колонка Kromasil C18 (5 мкм,  $150 \times 4.6$  мм); подвижная фаза: ацетонитрил–дихлорметан–вода (7:2:1, v/v); скорость потока 1 мл/мин; объем вводимой пробы 8 мкл; УФ-детектирование при 476 и 458 нм [22].

Количественное определение астаксантина проводили спектрофотометрически (спектрофотометр Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis, США), содержание (мг/мл) рассчитывали по формуле [23]:

$$C = \frac{A \cdot V \cdot 10^4}{A_{1\text{см}}^{1\%}}, \quad (1)$$

где  $A$  – оптическая плотность при длине волны 470 нм;  $V$  – объем раствора, мл;  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  – коэффици-

ент молярной экстинкции, для астаксантина в ацетоне –  $2100 \frac{\text{мл}}{\text{г см}}$  [24].

*Определение состава жирных кислот эфиров астаксантина проводили согласно [25].*

*Получение эмульсий.* Астаксантинсодержащие О/В-эмульсии получали с использованием микрофлюидной установки, состоящей из двух шприцевых насосов (KDS Legato 100 и Legato 110, США) для подачи фаз, микроципа из полиметилметакрилата с внутренним диаметром каналов 150 мкм и микроскопа Leica EZ4 (Германия) для наблюдения за процессом формирования капель. В качестве дисперсионной среды использовали 5%-ный раствор додецилсульфата натрия (SDS) в деионизированной воде, в качестве дисперсной фазы – 0.5%-ный раствор астаксантина в соевом масле. Перевод пигментов из экстракта в соевое масло осуществляли при непрерывном перемещении компонентов с постепенным удалением растворителя. Формирование эмульсии проводили при соотношении расходов дисперсионной среды (5% SDS) к дисперсной фазе (соевое масло) 9:1. Полученную О/В-эмульсию собирали в приемник при комнатной температуре.

Концентрацию астаксантина в эмульсии определяли спектрофотометрически после экстракции ацетоном из аликвоты эмульсии по формуле (1).

Эффективность инкапсуляции астаксантина вычисляли как отношение концентрации астаксантина в эмульсии к начальной концентрации астаксантина в масле.

Размер капель определяли с помощью оптического микроскопа (Nikon Eclipse L200ND, Япония) с использованием встроенной программы. Анализ полученных данных проводили в программах Image J и Microsoft Excel 2010. Статистические данные (средний диаметр капель, стандартное отклонение, коэффициент вариации, полидисперсность) получали при обработке не менее 500 капель.

*Определение стабильности.* Стабильность полученных эмульсий определяли в течение двух месяцев при хранении при комнатной температуре в темноте, контролируя размер капель дисперсной фазы и содержание астаксантина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате качественного и количественного анализа пигментов *H. pluvialis* установлено, что в составе суммарных пигментов клеток микроводоросли хлорофилл содержится в следовых количествах. Основным каротиноидом является астаксантин, присутствующий главным образом в этерифицированном виде: содержание моно- и диэфиров астаксантина составило 66.5 и 24.0% соответственно, содержание свободного астаксантина – 5.05%, суммарное содержание прочих каротиноидов ( $\beta$ -каротина и лютеина) не превышало 5%.

Методом газовой хроматографии был определен состав жирных кислот эфиров астаксантина. Преобладающими являются  $C_{18}$ -жирные кислоты (более 50% от суммы жирных кислот), главным образом ненасыщенные: олеиновая  $C_{18:1}$  (18.00%), линолевая  $C_{18:2}$  (18.83%) и линоленовая  $C_{18:3}$  (12.34%). Основной насыщенной кислотой является пальмитиновая  $C_{16:0}$  (24.81). Близкие результаты по составу жирных кислот представлены в [26].

Согласно литературным данным, при получении астаксантинсодержащих эмульсий используется астаксантин, выделенный из клеток микроводоросли *H. pluvialis*, как свободный (аналитический, чистотой 97–98%) [27, 28], так и коммерческие масляные растворы астаксантина: AstaReal<sup>®</sup>, содержание астаксантина (95% – эфиры астаксантина, 5% свободный астаксантин) в котором составляет 20%, и Zanthin<sup>®</sup> с 10%-ным содержанием астаксантина (97% – эфиры астаксантина, 3% – свободный астаксантин) [15, 29].

Поскольку биотехнологическое получение астаксантина в свободной форме из микроводоросли *H. pluvialis* включает в себя стадию ферментативного гидролиза, что невыгодно с экономической точки зрения, в настоящих исследованиях было проведено сравнение эмульсий трех типов. Тип I содержал суммарные пигменты микроводоросли (аналог коммерческих препаратов), тип II – суммарные каротиноиды, тип III – свободный астаксантин. Дисперсная фаза представляла собой 0.5%-ный раствор астаксантина в соевом масле.

**Таблица 1.** Характеристики эмульсий

Показатель	Эмульсия		
	тип I	тип II	тип III
Эффективность инкапсуляции, %	79.56 ± 0.32	85.47 ± 0.98	94.21 ± 0.67
Коэффициент вариации, %	45.51 ± 2.52	38.23 ± 2.67	43.95 ± 2.36
Степень полидисперсности	0.67 ± 0.01	0.73 ± 0.03	0.72 ± 0.02

Основным критерием выбора эмульгаторов для получения микроэмульсий является показатель гидрофильно-липофильного баланса (**HLB**), а также доступность и возможность коммерческого использования эмульгатора в косметических и фармацевтических целях. Для стабилизации прямых эмульсий используют водорастворимые поверхностно-активные вещества (**ПАВ**) с высокими числами **HLB**, как правило, в диапазоне от 8 до 18 [30]. В настоящей работе на основе анализа литературных данных в качестве анионного ПАВ был выбран додецилсульфат натрия, характеризующийся высоким числом **HLB** 40 и критической концентрацией мицеллообразования (**ККМ**)  $8.1 \times 10^{-3}$  М.

В ходе предварительных исследований (данные не приведены) были испытаны микрофлюидные ячейки с различной геометрией каналов, подобраны оптимальные параметры (соотношения потоков, концентрация SDS) для получения эмульсий О/В с использованием соевого масла.

Наибольшая эффективность инкапсуляции отмечена для эмульсии, содержащей свободный астаксантин, наименьшая – для эмульсии, содержащей суммарные пигменты (табл. 1).

На рис. 1 представлены полученные образцы эмульсий. На микрофотографиях видно, что для всех образцов капли имеют сферическую форму. Однако в зависимости от вида используемых пигментов эмульсии имеют различное распределение капель дисперсной фазы по размерам (рис. 2, рис. 3).

Распределение капель по размерам образца эмульсии типа I характеризуется наименьшим интервалом 12–98 мкм, при этом больше половины капель имеют размер от 21 до 46 мкм. Эмульсии типа II и III объединяет то, что размер капель образцов находится в более широком интервале 13–130 мкм. С другой стороны, их различие в том, что в образце эмульсии типа II, содержащей главным образом астаксантин в этерифицированной форме, более 50% капель находится в интервале 29–64 мкм, тогда как в образце эмульсии типа III, содержащей свободную форму астаксантина, – в интервале 40–130 мкм. Следует отметить, что все образцы имеют полидисперсное распределение капель по размерам, о чем свидетельствуют величины коэффициентов вариации и степени полидисперсности (табл. 1). Кроме того, для образцов эмульсий типа I и III характерно бимодальное распределение капель по размерам.

По-видимому, различие в формировании капель можно объяснить тем, что ацильные фрагменты жирных кислот в моно- и диэфирах астаксантина могут оказывать дополнительное стабилизирующее воздействие на капли за счет гидрофобных взаимодействий с SDS.

При изучении стабильности было установлено, что эмульсии стабильны в течение 56 суток, при этом независимо от типа эмульсии значительных изменений размера капель не наблюдали. Следовательно, в процессе длительного хранения не произошло слияния капель О/В-эмульсий, содержащих астаксантин.

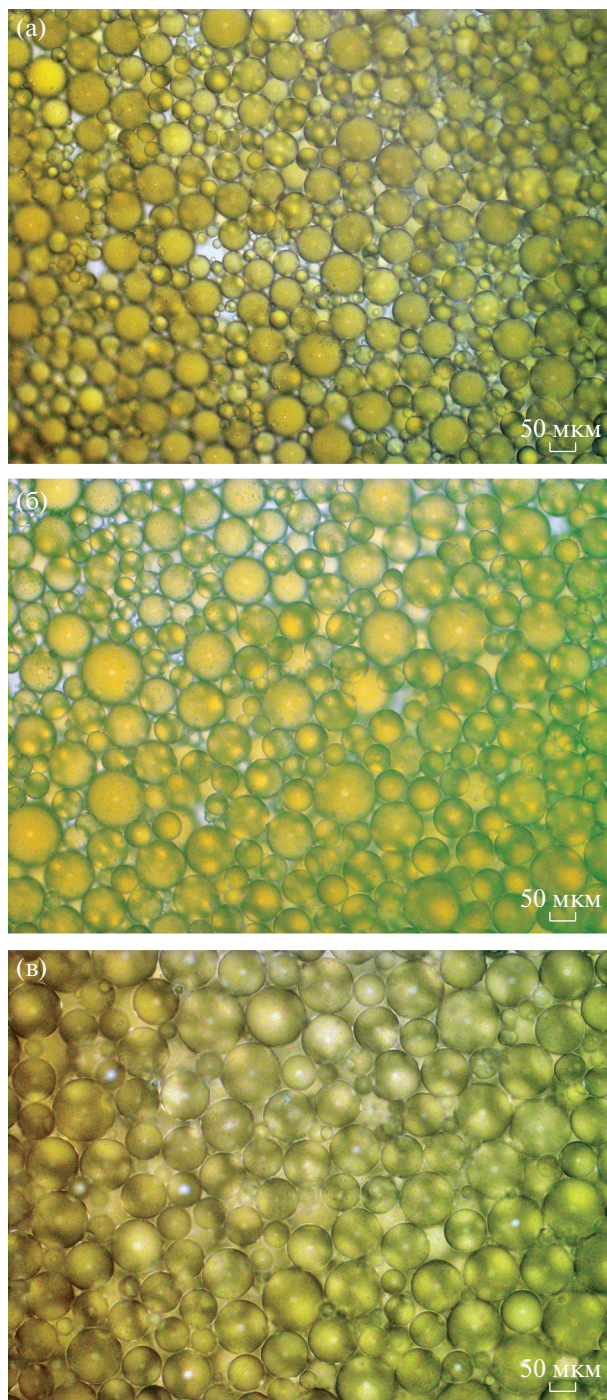
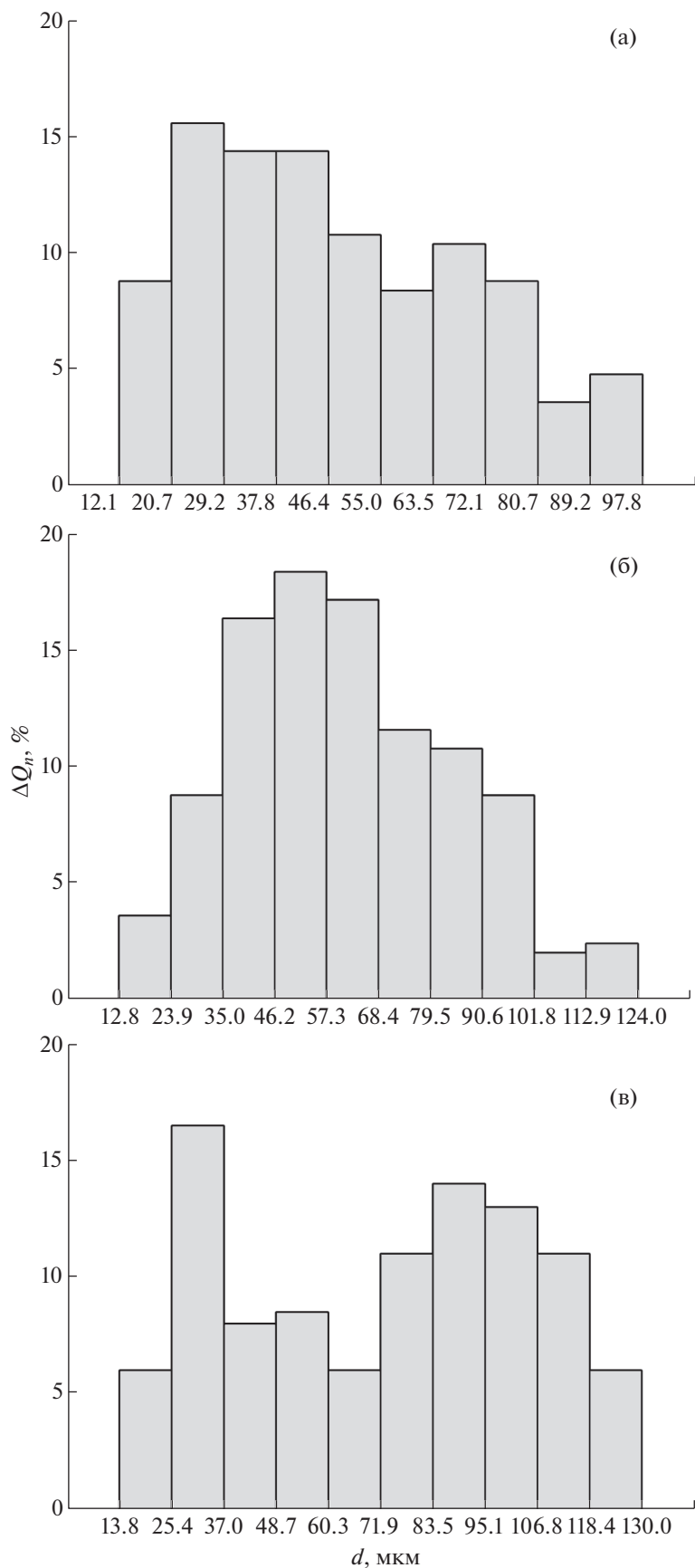


Рис. 1. Микрофотографии эмульсий типа I (а), II (б) и III (в).



**Рис. 2.** Гистограмма распределения капель дисперсной фазы по размерам: а – тип I, б – тип II, в – тип III.

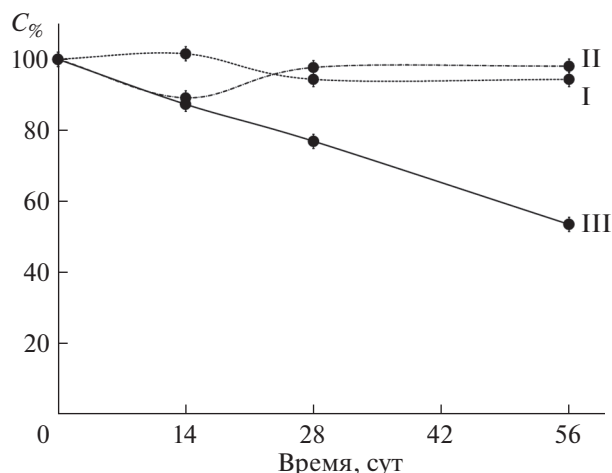


Рис. 3. Изменение содержания астаксантина в процессе хранения эмульсий (цифры на графике соответствуют типу эмульсии).

Кроме того, анализ стабильности показал, что при использовании астаксантина в этерифицированной форме (эмульсии с суммарными пигментами и суммарными каротиноидами микроводоросли) содержание инкапсулированного астаксантина остается выше 90% от исходного количества после 56 сут хранения при 25°C, при этом пигмент не подвергался ни изомеризации, ни химической деградации. В то время как в эмульсии, содержащей свободный астаксантин, наблюдается почти двукратное снижение содержание пигмента за этот же период, при этом в спектре поглощения на фоне снижения интенсивности характеристического максимума поглощения астаксантина (470 нм) наблюдали появление и рост дополнительных максимумов поглощения, что свидетельствовало об образовании продуктов окисления астаксантина [31].

Таким образом, представлены результаты исследования практического применения микрофлюидной системы для получения стабильных О/В-эмульсий, содержащих астаксантин. Эмульсия, содержащая суммарные каротиноиды микроводоросли *H. pluvialis*, главным образом моноэфиры астаксантина, характеризовалась высокой степенью инкапсуляции, наибольшей степенью полидисперсности, концентрация астаксантина осталась практически неизменной после 56 сут хранения при комнатной температуре.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предлагаемая методика является перспективным способом получения стабильных О/В-эмульсий, содержащих астаксантин, и является отправной точкой для исследования антиоксидантной (биологической) активности полученных эмульсий и подтверждения возможности их применения в составе косметических продуктов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Higuera-Ciajara I., Felix-Valenzuela L., Goycoolea F.M.* // Critical reviews in food science and nutrition. 2006. V. 46. № 2. P. 185. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
2. *Li J., Zhu D., Niu J. et al.* // Biotechnol. Adv. 2011. V. 29. № 6. P. 568. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.001>
3. *Shah M., Mahfuzur R., Liang Y. et al.* // Front Plant Sci. 2016. V. 7. P. 531. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
4. *Khoo K.S., Lee S.Y., Ooi C.W. et al.* // Bioresour. Technol. 2019. V. 288. Article 121606. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>
5. *Yuan J.P., Peng J., Yin K., Wang J.H.* // Mol. Nutr. Food Res. 2011. V. 55. № 1. P. 150. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000414>
6. *Yang Y., Kim B., Lee J.Y.* // Hum. Nutr. Food Sci. 2013. V. 1. № 1003. P. 1. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
7. *Singh K.N., Patil S., Barkate H.* // J. Cosmetic Dermatology. 2020. V. 19. № 1. P. 22. <https://doi.org/10.1111/jocd.13019>
8. *Ng Q.X., De Deyn M.L.Z.Q., Loke W. et al.* // J. Dietary Supplements. 2020. P. 1. <https://doi.org/10.1080/19390211.2020.1739187>
9. *Faraone I., Sinisgalli C., Ostuni A. et al.* // Pharmacol. Res. 2020. P. 104689. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104689>
10. *Fakhri S., Abbaszadeh F., Dargahi L., Jorjani M.* // Pharmacol. Res. 2018. V. 136. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.012>
11. *Solovchenko A.E.* // Russ. J. Plant Physiol. 2013. V. 60. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.1134/S1021443713010081>
12. *Chen G., Wang B., Han D. et al.* // Plant J. 2015. V. 81. № 1. P. 95. <https://doi.org/10.1111/tpj.12713>
13. *Li Y., Han D., Yoon K. et al.* // Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2013. P. 545. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch28>
14. *Liu X., McClements D.J., Cao Y., Xiao H.* // Food Biophys. 2016. V. 11. № 3. P. 302. <https://doi.org/10.1007/s11483-016-9443-6>
15. *Khalid N., Shu G., Kobayashi I. et al.* // Colloids Surf. B. 2017. V. 157. P. 355. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.003>
16. *Занавескин М.Л., Миронова А.А., Попов А.М.* // Молекулярная медицина. 2012. № 5. С. 9.
17. *Vladislavjević G.T., Kobayashi I., Nakajima M.* // Microfluidics and Nanofluidics. 2012. V. 13. № 1. P. 151. <https://doi.org/10.1007/s10404-012-0948-0>
18. *Fábregas J., Dominguez A., Regueiro M. et al.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 53. № 5. P. 530. <https://doi.org/10.1007/s002530051652>
19. *Sarada R., Vidhyavathi R., Usha D., Ravishankar G.A.* // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 20. P. 7585. <https://doi.org/10.1021/jf060737t>

20. *Li Y., Miao F., Geng Y. et al.* // Chinese J. Oceanol. Limnol. 2012. V. 30. № 4. P. 627.  
<https://doi.org/10.1007/s00343-012-1217-5>
21. *Su F., Xu H., Yang N. et al.* // Electron J. Biotechnol. 2018. V. 34. P. 37.
22. *Ranga R., Sarada A.R., Baskaran V. et al.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 19. № 11. P. 1333.  
<https://doi.org/10.4014/jmb.0905.03007>
23. *Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.* Carotenoids: Handbook. Swiss: Birkhauser Verlag. 2004. 645 p.
24. *Foppen F.H.* // Chromatogr. Rev. 1971. V. 14. № 3. P. 133.  
[https://doi.org/10.1016/0009-5907\(71\)80012-1](https://doi.org/10.1016/0009-5907(71)80012-1)
25. *Sergeeva Ya.E., Mostova E.B., Gorin K.V. et al.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 807.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683817080063>
26. *Damiani M.C., Popovich C.A., Constenla D., Leonardi P.I.* // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. № 11. P. 3801.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.136>
27. *Liu X., Zhang R., McClements D.J. et al.* // Food Biophys. 2018. V. 13. № 4. P. 412.  
<https://doi.org/10.1007/s11483-018-9547-2>
28. *Pan L., Zhang S., Gu K., Zhang N.* // J. Food. 2018. V. 16. № 1. P. 607.  
<https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1437080>
29. *Khalid N., Shu G., Holland B.J. et al.* // Food Res. Int. 2017. V. 102. P. 364.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.019>
30. *Gadhav A.* // Int. J. Sci. Res. 2014. V. 3. № 4. P. 573.
31. *Zhou Q., Xu J., Yang S. et al.* // J. Oleo Sci. 2015. V. 64. № 5. P. 515.  
<https://doi.org/10.5650/jos.ess14264>