

## К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПЕРЕРАБОТКИ *CHLORELLA VULGARIS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗИНОИДА

А. В. Митишев, Е. Ф. Семенова, Е. В. Преснякова

ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет»

Поступила в редакцию 28.09.2015 г.

**Аннотация.** Проведены исследования модифицированных сред Тамия в отношении накопления биомассы *Chlorella vulgaris* (M.W. Beijerinck). Изучено влияние температуры и длительности экстрагирования на выход целевого продукта. Результаты исследований показали, что хлорелла быстрее накапливает биомассу на модифицированных средах Тамия. Увеличение температуры и длительности процесса повышает выход резиноида хлореллы.

**Ключевые слова.** *Chlorella vulgaris*, среда Тамия, резиноид хлореллы, ароматический продукт, экстракция.

**Abstract.** Investigations of modified Tamiya mediums concerning *Chlorella vulgaris* (M.W. Beijerinck) biomass accumulation were held. The influence of temperature and duration of extraction on the yield of the desired product were studied. The results of research showed that chlorella biomass accumulates faster in the modified Tamiya mediums. Increase of the temperature and duration of the process increases the yield of chlorella resinoid.

**Keywords:** *Chlorella vulgaris*, Tamiya medium, chlorella resinoid, aroma product, extraction.

«Дубовый мох» это собирательный термин, укоренившийся в эфирномасличной промышленности и торговле [1], в основном, относимый к лишайнику *Evernia prunastri* L. из семейства пармелиевые (*Parmeliaceae*) [2], произрастающему не только на дубе, но и на других листовенных и хвойных деревьях, кустарниках. Существует много видов ароматных лишайников, в частности *E. furfuracea*, *Usnea barbata*, *Stictis pulmonaceae*, *Lobaria pulmonaria*, *Ramalina*, *Alectoria*, *Parmelia*, распространенных на различных континентах [3] и используемых для извлечения душистых веществ.

Резиноид - ароматический растительный экстракт, получаемый из эфирномасличного сырья с использованием этилового спирта [4]. К основным странам, производящим ароматные продукты из дубового мха, относятся Франция, США, Болгария, а до своего распада на ряд мелких стран Югославия и СССР (Краснодарский край, Крым). Характерный запах резиноиду придают  $\alpha$ - и  $\beta$ -туйон, гераниол, борнеол, цинеол, цитронеллол, камфора, ванилин и другие ароматобразующие

соединения. Также в составе резиноида найдены смолы; пигменты (главным образом, хлорофилл, придающий резиноиду темный цвет); каротиноиды; токоферолы и воскоподобные вещества [5]. Его применяют как душистое вещество шипрового направления [6] и как фиксатор запаха [7-9]. Резиноид дубового мха широко используется в мыловарении, медицине и фармацевтике. Он обладает антисептическим, заживляющим, смягчающим и тонизирующим действием на кожу [10-12].

«Дубовый мох» является малотоннажным видом эфирномасличного и лекарственного растительного сырья. Объемы переработки лишайников последние несколько десятилетий неуклонно снижались. На сегодняшний день получение резиноида в мире, в частности, в России, по сравнению с концом 20 века снизилось втрое. Это связано с несколькими причинами: ликвидацией ресурсов лишайника в доступных местах и расширением производства синтетических заменителей.

Поэтому в связи с быстрым развитием современной промышленной биотехнологии особый интерес в качестве нетрадиционных источников

аромапродуктов представляют водоросли [13]. Сравнительная оценка биохимического состава лишайников и зеленых микроводорослей указывает на то, что фенольные соединения этих организмов, обуславливающие ароматофиксирующие свойства, качественно близки, и *Chlorella* (M.W. Beijerinck) может являться источником резиноида [14]. Для роста и развития хлореллы необходимы вода, минеральные вещества, углекислый газ для фотосинтеза и кислород для дыхания. Недостаток света и питания задерживает развитие клеток на длительное время. Условия для наилучшего размножения хлореллы на разных стадиях могут существенно меняться. Так, например, установлено, что для процесса подготовки к размножению необходимо усиленное питание клеток фосфором и серой, а для более интенсивного роста - азотом и железом [15]. Цель данного исследования – оптимизация состава питательной среды для культивирования хлореллы и температурного режима переработки альгосырья для получения резиноида.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования являлся штамм зеленой микроводоросли и альгомасса штамма *Chlorella vulgaris* BIN. Культивирование хлореллы осуществляли на среде Тамия и ее двух модификациях, г/л:

1.  $\text{KNO}_3 - 7.5$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 3.75$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.25$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 0.15$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.003$ ; ЭДТА – 0.185. Раствор микроэлементов 1 мл.

2.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 3.0$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 3.75$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.87$ ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.0045$ ; ЭДТА – 0.185. Раствор микроэлементов 1 мл.

Раствор микроэлементов, г/л:  $\text{H}_3\text{BO}_3 - 2.86$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 1.81$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.222$ ;  $\text{MoO}_3 - 176.4$  мг/10 л;  $\text{NH}_4\text{VO}_3 - 229.6$  мг/10 л;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.01$  мг/л;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0.146$ ;  $\text{KJ} - 0.083$ ;  $\text{NaWO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.033$ ;  $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.198$ .

Среды засеивали культурой хлореллы в количестве 10% от объема и плотностью  $0.6 \cdot 10^6$  клеток/мл. Освещение осуществляли лампами дневного света. Определение pH проводили на pH-метре Mettler Toledo. Количество клеток в суспензии определяли с помощью метода прямого подсчета в камере Горяева и нефелометрическим методом с использованием фотоколориметра КФК-3.01, в качестве контроля служила прозрачная жидкая питательная среда для культивирования хлореллы [16]. Получение резиноида осуществляли согласно а. с. 1638157 (СССР) [17].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ Оптимизация состава питательной среды для культивирования хлореллы

Среда Тамия представляет питательный раствор высокой концентрации минеральных солей. В ней содержится большое количество меди, марганца и молибдена. Поскольку фоновую концентрацию азота необходимо поддерживать на высоком уровне, мы повысили его концентрацию в среде Тамия (модификации 1). В среде также увеличена концентрация  $\text{MgSO}_4$ , добавили  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и комплексное соединение – этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) для предотвращения выпадения осадков железа. В опыте заменили нитрат калия на сернокислый аммоний, увеличили количество сульфата магния,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  (модификация 2). Так как на седьмые сутки культивирования утилизация азота составляет 90 – 95%, вносили соли азота в исходном количестве, чтобы поддержать его концентрацию в культуральной среде.

Проведенный эксперимент показал, что урожайность хлореллы на модифицированных средах больше (рис. 1), чем на стандартной среде при культивировании в течение 14 суток, температуре  $28^\circ\text{C}$ , освещенности 6000 люкс и pH 6. Количество клеток хлореллы на модификации 2 среды Тамия быстро увеличивалось, по сравнению со средой Тамия и ее модификацией 1. Это связано с тем, что хлорелла лучше усваивает аммонийный азот, по сравнению с нитратным. При этом клетки изучаемого штамма на модифицированной среде Тамия (№ 2) находились в активном состоянии, крупного размера, ярко-зеленого цвета.

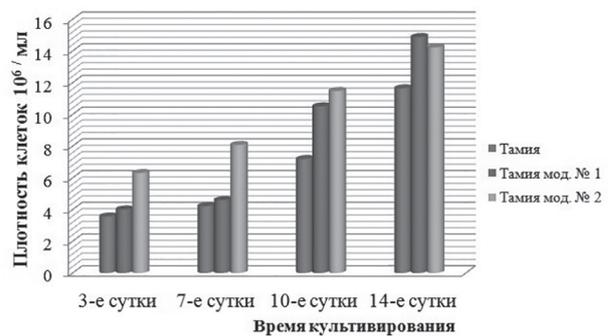


Рис. 1. Плотность клеток суспензионной культуры в динамике роста и развития

Спустя неделю культивирования клетки хлореллы на модифицированной среде Тамия (№ 1) начинали активное деление и уже на 10-ые сутки плотность клеток в суспензионных культурах на

модифицированных средах почти уравнилась. На 14-е сутки наибольшее количество клеток наблюдалось на модифицированной среде Тамия № 1.

### Изучение влияния температуры и длительности экстрагирования на выход целевого продукта

Экстракция резиноида происходит при повышенной (по сравнению с комнатной) температуре [18], поэтому она может влиять на выход конечного продукта. Для экстракции использовался спирт этиловый в концентрации не менее 92%, так как с уменьшением концентрации спирта увеличивается содержание балластных веществ в ароматическом продукте. Опыт проводился при температурах 50, 60, 70°C (табл. 1).

Проведенное исследование показало, что при температуре экстракции 50°C выход резиноида составил 12%. Повышение температуры на 10°C увеличило выход резиноида на 25% (с 12 до 15%).

Таблица 1

*Влияние температуры на выход ароматического продукта*

Показатель	Экстрагирование			Экстрагент	
	50	60	70	24	70
Выход конечного продукта, %	11.88	14.91	15.76	10.2	13.75

Наибольший выход резиноида наблюдался при температуре 70°C - 16%. При этом увеличивается эфирное число (15...17 мг/г), улучшается запах, усиливается интенсивность окраски (от светло-зеленой до темно-зеленой). При дальнейшем повышении температуры (76-78°C) улетучиваются ароматобразующие компоненты и разрушаются биологически активные соединения.

Предварительный подогрев спирта перед экстракцией также влияет на выход ароматического продукта, увеличивая его на 3.55% (табл. 1). С увеличением продолжительности процесса извлечения до 6 часов (трехкратная экстракция этанолом в течение 3, 2, 1 ч при 70°C) возрастает выход резиноида на 8%.

Полученный резиноид хлореллы представляет собой густую, смолянистую жидкость от темно-зеленого до коричневого цвета. Запах приятный, смолянистый с табачно-травянистой нотой. Преимуществами этого ароматического продукта является большое количество летучих веществ; отсутствие аллергенного компонента; содержание витаминов группы В; высокое содержание пигментов: хлорофиллов и каротиноидов [19].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования дают возможность использования модифицированных сред для выращивания биомассы хлореллы, на основе которой получают новый ароматический продукт – резиноид хлореллы для парфюмерно-косметических и химико-фармацевтических производств. Повышение температуры процесса, предварительный нагрев экстрагента и увеличение продолжительности экстракции позволяет существенно повысить выход ароматического продукта.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Технология натуральных эфирных масел и синтетических душистых веществ / И.И. Сидоров [и др.]. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. — 368 с.
2. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения / Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. — СПб: СпецЛит, Издательство СПХФА, 2002. — 407 с.
3. Лоулесс Д. Энциклопедия ароматических масел / Пер. с англ. Е. Незлобиной. — М.: Крон-Пресс, 2000. — 288 с.
4. ГОСТ Р 53043-2008. Продукция и сырье эфиромасличное, травянистое и цветочное. Термины и определения. — М.: Стандартиформ, 2009. — 7 с.
5. Хейфиц Л.А. Душистые вещества и другие продукты для парфюмерии: Справ. изд. / Л.А. Хейфиц, В.М. Дашунин. — М.: Химия, 1994. — 256 с.
6. Фаррер-Холлс Д. Ароматерапия. Полное руководство по применению эфирных масел. Пер. с англ. / Д. Фаррер-Холлс. — М.: Кладезь-Букс, 2006. — 340 с.
7. Фридман Р.А. Парфюмерия. 2-е изд. / Р.А. Фридман. — М.: Пищепромиздат, 1955. — 521 с.
8. Персидская К.Г. Лишайники – как источник получения продуктов для парфюмерии и медицины / К.Г. Персидская, Н.Н. Касимовская // Лесные биологически активные ресурсы (березовый сок, живица, эфирные масла, пищевые, технические и лекарственные растения): Сб. материалов 2 международной конференции / под ред. В.Н. Корякина. — Хабаровск, 2004. — С. 268-270.
9. Гесь Д.К. Лекарственные растения и их применение / Д.К. Гесь, Н.В. Горбач, Г.Н. Кадаев. — Минск: Наука и техника, 1976. — 592 с.
10. Завражнов В.И. Лекарственные растения: лечебное и профилактическое использование / В.И. Завражнов, Р.И. Китаева, К.Ф. Хмелев. — Воронеж: Изд-во ВГУ, 1993. — 408 с.

11. Махлаюк В. П. Лекарственные растения в народной медицине / В.П. Махлаюк. — Саратов: Приволжское кн. изд., 1993. — 541 с.
12. Дубовый мох и продукты его переработки / А.В. Мотрук Сидоров [и др.] — Краснодар, 2008. — Физико-химический анализ свойств многокомпонентных систем, № 6. — С.17
13. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. — М.: Мир, 1987. — 411 с.
14. Семенова Е.Ф. Скрининг водорослей - продуцентов летучих душистых веществ / Е.Ф. Семенова // V симпозиум «Основные направления научных исследований по интенсификации эфиромасличного производства» (тезисы докладов). Кишинев, 1990. — С.199-200.
15. Музафаров А.М. Культивирование и применение микроводорослей / А.М. Музафаров, Т.Т. Таубаев. — Ташкент: Фан УзССР, 1984. — 136 с.
16. А. с. 1638157 СССР Способ получения резиноида микроводорослей / Бугорский П.С., Родов В.С., Семенова Е.Ф., Клячко-Гурвич Г.Л. (СССР). - Заявл. 22.03.89 (заявка № 4665003 с датой приоритета изобретения 22.03.1989). Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений СССР 01.12.1990 г. Опубл. 30.03.91, БИ № 12
17. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л.А. Сиренко [и др.]. — К.: Наукова думка, 1978. — 247 с.
18. Мельников С.С. Хлорелла: физиологически активные вещества и их использование / С.С. Мельников, Е.Е. Мананкина. — К.: Наука і техніка, 1991. — 79 с.
19. Сравнительный анализ штаммов продуцента и инновационного продукта как основных элементов биотехнологии резиноида хлореллы / А.В. Митишев [и др.]. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Серия «Естественные науки», 2014. — № 4 (8). — С.19-29.

*Пензенский государственный университет  
Митишев А. В., интерн, кафедра общей и клинической фармакологии,  
E-mail: span2361@rambler.ru*

*Penza State University  
Mitishev A. V., Intern, Department of General and clinical pharmacology, Medical Institute,  
E-mail: span2361@rambler.ru*

*Семенова Е. Ф., кандидат биологических наук, профессор, старший научный сотрудник кафедры общей и клинической фармакологии  
E-mail: sef1957@mail.ru*

*Semenova E. F., PhD, Full Professor, senior staff scientist, department of general and clinical pharmacology  
E-mail: sef1957@mail.ru*

*Преснякова Е. В., кандидат биологических наук, доцент, кафедра медицинских информационных систем и технологий  
E-mail: spl7@mail.ru*

*Presnyakova E. V., PhD, Associate Professor, department of medical information systems and technologies  
E-mail: spl7@mail.ru*