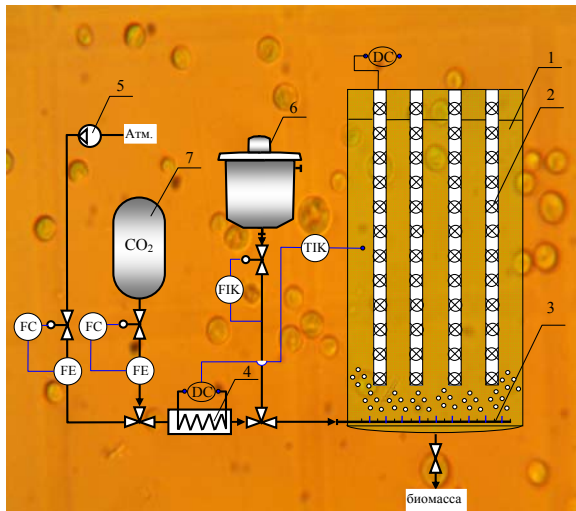


Д. С. ДВОРЕЦКИЙ, С. И. ДВОРЕЦКИЙ,
М. С. ТЕМНОВ, Е. В. ПЕШКОВА, Е. И. АКУЛИНИН

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Научное электронное издание
на компакт-диске



Тамбов

◆ Издательство ФГБОУ ВПО «ТГТУ» ◆
2015

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Тамбовский государственный технический университет»

**Д. С. ДВОРЕЦКИЙ, С. И. ДВОРЕЦКИЙ,
М. С. ТЕМНОВ, Е. В. ПЕШКОВА, Е. И. АКУЛИНИН**

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Рекомендовано Научно-техническим советом
ФГБОУ ВПО «ТГТУ» в качестве монографии

Научное электронное издание
комплексного распространения



Тамбов
Издательство ФГБОУ ВПО «ТГТУ»
2015

УДК 551.464.791.5
ББК Л814
Т38

Рецензенты:

Доктор технических наук, профессор,
заместитель директора по научной работе ФГБНУ
«Всероссийский научно-исследовательский институт
использования техники и нефтепродуктов в сельском хозяйстве»
С. А. Нагорнов

Кандидат технических наук, ведущий специалист
научно-образовательного центра «Нанотехнологии и
наноматериалы» ФГБОУ ВПО «Тамбовский государственный
университет имени Г. Р. Державина»
А. А. Ермаков

Т38 **Технология** получения липидов из микроводорослей [Электронный ресурс] : монография / Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий, М. С. Темнов [и др.]. – Тамбов : Изд-во ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Системные требования : ПК не ниже класса Pentium II ; CD-ROM-дисковод ; 45,4 Mb ; RAM ; Windows 95/98/XP ; мышь. – Загл. с экрана.
ISBN 978-5-8265-1507-5.

Рассмотрены перспективы комплексного использования биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* для получения липидов и в качестве источника сырья для производства энергоносителей. Проведены экспериментальные исследования режимов периодического культивирования, концентрирования и разрушения клеточных стенок биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*. Экспериментально исследован процесс экстракции липидов из биомассы микроводорослей, определены оптимальные условия его проведения. Разработана математическая модель процесса периодического культивирования биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*.

Предназначена для исследователей в области биотехнологии, преподавателям, аспирантам и магистрантам.

УДК 551.464.791.5
ББК Л814

Все права на размножение и распространение в любой форме остаются за разработчиком.
Незаконное копирование и использование данного продукта запрещено.

ISBN 978-5-8265-1507-5

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тамбовский государственный технический университет» (ФГБОУ ВПО «ТГТУ»), 2015

ВВЕДЕНИЕ

Идея замещения ископаемых жидких топлив, получаемых из нефти, липидами, получаемыми из микроводорослей, была выдвинута в 1942 году Хардером и фон Витшем, и за прошедшие более чем 70 лет активно прорабатывалась учеными ведущих индустриальных стран – США, Германии, Японии, Англии, Израиля и др. Однако, несмотря на очевидный потенциал этой идеи, до сих пор не разработана технология получения биотоплива из микроводорослей, позволяющая обеспечить конкуретоспособную его себестоимость. В связи с этим задачи, направленные на снижение себестоимости культивирования микроводорослей и выделения из них липидов, не потеряли своей актуальности и активно решаются ведущими учеными.

В работе рассмотрены перспективы комплексного использования биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* в качестве источника сырья для производства энергоносителей. Выполнен обзор технологий культивирования микроводорослей с повышенным содержанием липидов. Проведены экспериментальные исследования режимов периодического культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Разработана математическая модель процесса культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Обсуждаются подходы к подготовке биомассы микроводорослей для эффективной организации процесса экстракции. Проведен анализ способов концентрирования биомассы и разрушения клеточных стенок микроводорослей, представлены материалы экспериментального исследования. Проанализированы способы экстракции липидов из биомассы, проведен обзор способов извлечения липидов из биомассы, выполнено экспериментальное исследование процесса экстракции липидов из биомассы, определены оптимальное соотношение экстрагентов и режим проведения процесса экстракции липидов из биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Представленная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках базовой части государственного задания (проект № 1983).

1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

1.1. МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ

Микроводоросль *Chlorella vulgaris* – микроскопический одноклеточный фотосинтезирующий микроорганизм (рис. 1). Клетка *Chlorella vulgaris* имеет сферическую форму, около 2...10 мкм в диаметре. Как и у всех высших растений, в пластидах *Chlorella vulgaris* содержатся хлорофиллы форм *a* и *b*, функция которых состоит в аккумуляции энергии солнечного света и использовании ее для образования органических веществ.

Одна микроскопическая клетка выполняет все жизненные функции. Для роста и развития *Chlorella vulgaris* необходимы вода, минеральные вещества, углекислый газ и кислород.

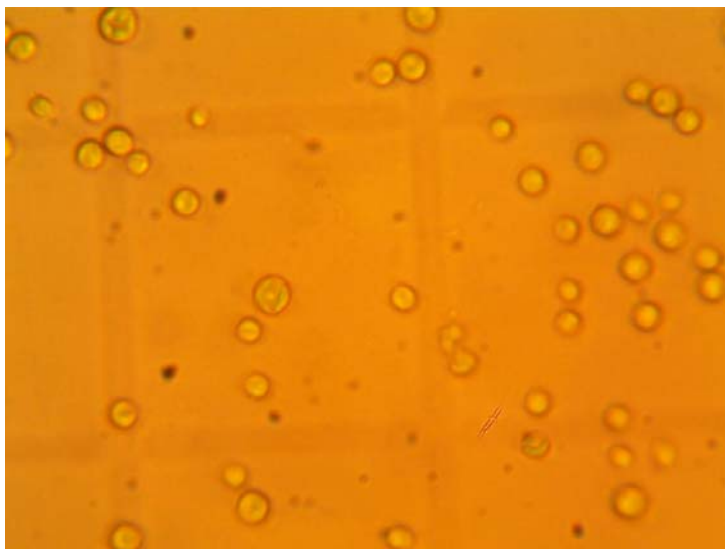


Рис. 1. Микроскопия клеток *Chlorella vulgaris* (×1000)

Chlorella vulgaris широко распространена в пресных водах, на сырой земле, коре деревьев и т.д. Это одноклеточная зеленая водоросль без жгутиков, глазков и сократительных вакуолей имеет округлую форму и по размерам меньше хламидомонады. Клетки содержат обычно чашевидный хлоропласт с пиреноидом или без него и одно мелкое ядро.

Единственный способ размножения – бесполой, причем каждая гаплоидная клетка митотически делится дважды или трижды с образованием соответственно четырех или восьми потомков – автоспор, которые еще внутри оболочки материнской клетки покрываются собственными оболочками. Освобождаются автоспоры после разрыва стенки материнской клетки [1].

Процесс размножения *Chlorella vulgaris* весьма интенсивен. При оптимальных условиях за короткое время можно получить прирост биомассы в 200 раз больший, чем у высших растений [2].

Применение *Chlorella vulgaris* основано на высоком содержании в ней биологически ценных веществ. Сухая биомасса *Chlorella vulgaris* содержит более 45% сырого протеина, включая незаменимые аминокислоты, 30...35% углеводов, 7...10% жира. В составе зеленой клетки содержатся незаменимые в питании животных аминокислоты: лизин ($\approx 10\%$), метионин ($\approx 1\%$), триптофан ($\approx 2\%$), аргинин ($\approx 15\%$), гистидин ($\approx 3\%$), лейцин ($\approx 6\%$), изолейцин ($\approx 3\%$), фениланин ($\approx 2\%$), треонин ($\approx 2\%$) валин ($\approx 5\%$), а также хлорофилл ($\approx 2\%$).

На долю витаминов в биомассе *Chlorella vulgaris* приходятся витамины групп В, С, РР, Е, каротин. В диких штаммах в нативном виде содержатся микроэлементы – йод, бром, мышьяк, кобальт, калий, фосфор, железо, магний и тому подобные и антибиотики.

Систематически *Chlorella vulgaris* относится: к отделу – зеленые водоросли (*Chlorophyta*), классу – зеленые или равножгутиковые водоросли (*Chlorophyceae, Isocontae*), порядок – хлорококковые или протококковые (*Chlorococcophyceae, Protococcophyceae*), семейство – ооцистовые (*Oocystaceae*), род – хлорелла (*Chlorella*).

Chlorella vulgaris не требовательна к условиям обитания и способна весьма интенсивно размножаться, поэтому очень широко распространена и встречается практически повсеместно.

В водоемах – это типичная планктонная водоросль, но встречается она и в бентосе, а также на наземных субстратах и в почве.

1.2. КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

Биомасса микроводорослей *Chlorella vulgaris* является перспективным продуцентом для получения широкого спектра продуктов.

Характерным свойством клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* является способность к изменению химического состава клеток в широком диапазоне в зависимости от условий культивирования (уровень освещенности, состав питательной среды). Как и высшие растения, микроводоросли содержат нейтральные и полярные липиды. Нейтральные липиды состоят в основном из сложных эфиров глицерина. При благоприятных условиях микроводоросли производят в основном полярные липиды (например, фосфолипиды).

Полярные липиды являются структурными компонентами всех живых клеток, входят в состав цитоплазматической, митохондриальной и других мембран, играют существенную роль в мембранной проницаемости, ответственны за расположение ферментов дыхательной цепи и перенос электронов. Поэтому фосфолипиды широко применяются в качестве пищевых и биологически активных добавок.

При неблагоприятных или ограниченных условиях роста микроводорослей (стрессовые условия культивирования) накапливаются нейтральные липиды в виде липидных капель в цитоплазме [2] и являются основными запасными компонентами клетки. Неполярные липиды находят широкое применение

ние при производстве биотоплива, биополимеров и других продуктов.

Схема комплексной переработки биомассы представлена на рис. 2.

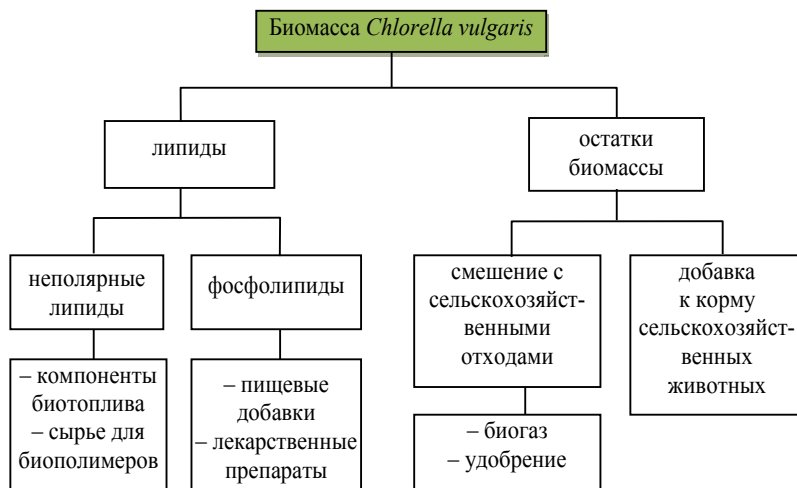


Рис. 2. Комплексное использование биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*

Технология комплексного использования биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* заключается в следующем: штамм культивируется в течение восьми дней на стандартной питательной среде до достижения стационарной стадии роста, затем для клеток штамма создаются стрессовые условия путем пересадки на питательную среду с дефицитом азота для стимулирования накопления внутриклеточных липидов (культивирование в течение пяти дней). Затем клетки биомассы отделяются от суспензии.

На следующем этапе стенки клеток разрушаются для более полного извлечения липидов. Извлечение липидов осуще-

ствляется смесью полярного и неполярного растворителей, при этом фосфолипиды будут содержаться во фракции полярного растворителя, а триглицериды – неполярного.

Эскизная схема получения фосфолипидов представлена на рис. 3.

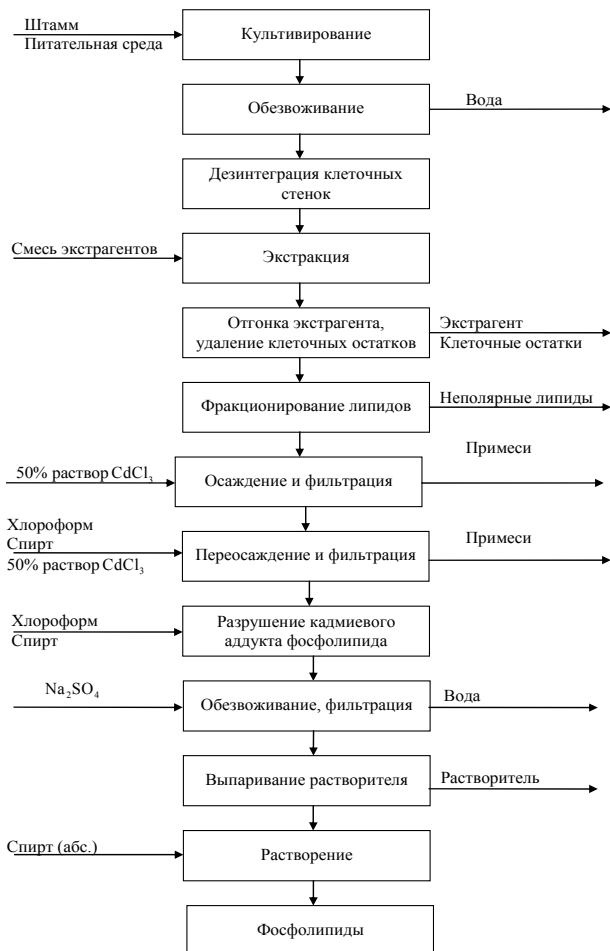


Рис. 3. Эскизная схема процесса получения фосфолипидов

Извлеченные фосфолипиды подвергаются очистке (рис. 3) и используются в качестве пищевых и биологически активных добавок для поддержки нервной системы, профилактики неврозов, мигреней, бессонницы, глазных заболеваний, а также восстановления клеток печени [3].

Остатки биомассы (белки, углеводы) подвергаются очистке и используются в качестве добавки для корма сельскохозяйственных животных либо смешиваются с отходами сельского хозяйства и используются для получения биогаза, жидких и твердых удобрений [4].

1.3. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КАК ИСТОЧНИКА СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ЭНЕРГОНОСИТЕЛЕЙ

Биоэнергетика во всем мире является активно развивающимся сектором экономики, который основан на источниках энергии органического происхождения, используемых для производства тепла, электричества и топлив [5].

Принято различать три поколения возобновляемых источников растительного сырья для получения биотоплива.

1. К первому поколению относятся традиционные сельскохозяйственные культуры с высоким содержанием липидов, крахмала, сахаров. Липиды можно перерабатывать в компоненты смесового биодизельного топлива, крахмалы и сахара служат сырьем для производства биоэтанола. Однако использование этих сырьевых источников сопряжено с рядом недостатков: использование пахотных земель, необходимых для выращивания пищевых продуктов; высокие затраты на обработку земель и внесение дорогостоящих удобрений, пестицидов и т.д.

2. Ко второму поколению относятся непищевые остатки выращиваемых растений, трава и древесина. Производство биотоплива из этого сырья менее затратно. Такое сырье содержит целлюлозу и лигнин, поэтому имеется возможность его прямого сжигания, трансформации его в горючие газы через

пиролиз. Недостатками сырья второго поколения являются невысокая отдача с единицы площади и необходимость использования для выращивания обширных площадей пахотных земель.

3. К третьему поколению сырья относится биомасса из микроводорослей. К основным достоинствам данного сырьевого источника можно отнести: высокий выход с единицы площади, возможность круглогодичного сбора урожая, высокая скорость роста, компактное размещение производства.

По данным [6] суммарное производство этанола и биодизеля из различных видов биомассы в 2012 году достигло около 3% всего объема потребляемых в мире моторных топлив. В последние годы интерес исследователей и внимание производителей привлекает биоэнергетический потенциал фотосинтезирующих микроводорослей, причем финансирование исследований и разработок в этой области во всем мире неуклонно растет [7–10].

Развитие CO_2 -нейтрального топлива является одной из наиболее актуальных глобальных задач, поскольку позволит уменьшить газообразные выбросы, способствующие последующему изменению климата [7 – 10]. В перспективе, по мере истощения ресурсов, возможен переход от ископаемого топлива к биотопливу, получаемому из органического возобновляемого сырья. Однако для достижения экологической и экономической устойчивости производство энергоносителей должно быть не просто из возобновляемых источников, а из источников, способных к ассимиляции атмосферного углекислого газа.

Получение энергоносителей из микроводорослей окажет гораздо меньшее воздействие на окружающую среду и продовольственную безопасность, чем из зерновых культур. Биомасса микроводорослей имеет высокую калорийность, низкую вязкость и низкую плотность, повышенное содержание топливопригодных липидов в биомассе.

Главные преимущества микроводорослей [11 – 17]:

- высокая конверсионная эффективность фотонов (приблизительно 3...8% против 0,5% для наземных растений), которая дает возможность получать более высокие урожаи биомассы на гектар), и высокий рост клеток микроводорослей;

- высокая емкость поглощения углекислого газа;

- микроводоросли не требовательны к качеству воды для роста, поэтому для их культивирования можно использовать сточные, загрязненные, соленые и другие воды;

- микроводоросли могут использовать в процессе жизнедеятельности азот и фосфор из различных источников сточных вод (например, сельскохозяйственные стоки, промышленные и муниципальные сточные воды), обеспечивая дополнительную выгоду биологической очистки сточных вод;

- для выращивания микроводорослей можно использовать пахотно непригодные, пустынные и засоленные земли, не подходящие для сельскохозяйственного производства пищевой продукции;

- производство несезонное, и сырье можно получать партиями почти круглый год;

- микроводоросли можно культивировать без использования удобрений и пестицидов;

- микроводоросли могут являться сырьем для широкого спектра продуктов (например, белки, полисахариды, пигменты, биополимеры, корма, удобрения и др.);

- организация производства биомассы микроводорослей не требует сложного оборудования и высокого уровня автоматизации производства.

На мировом рынке технически осуществимы и хорошо коммерциализуются альтернативные возобновимые топливные источники – биодизельное топливо и биоэтанол, поскольку могут заменить традиционные виды топлива в современных автомобилях с небольшими модификациями автомобильного двигателя.

Существует большое количество потенциальных путей для преобразования биомассы микроводорослей в топлива. Они могут быть разделены на следующие три основные категории:

1) использующие трансформацию экстрактов микроводорослей (например, липидов, углеводов) в биотопливо (например, биодизель, биоэтанол);

2) преобразующие целую водорослевую биомассу в биотопливо;

3) использующие водоросли для производства молекул топлива (например, этанол, водород, метан, алканы) в результате их жизнедеятельности.

Однако использование микроводорослей для производства биотоплива имеет ряд ограничений, связанных со сбором урожая биомассы, сушкой и добычей масел, что снижает их привлекательность для использования в промышленном производстве.

Эскизная технологическая схема производства биотоплива представлена на рис. 4. Стадия культивирования включает в себя накопление биомассы в оптимальных условиях роста до достижения стационарной стадии роста (на восьмые сутки), затем создание стрессовых условий, путем дефицита азотсодержащих веществ для стимулирования накопления внутриклеточных нейтральных липидов (стрессовое культивирование 5...7 суток). Полученная биомасса с повышенным содержанием липидов концентрируется, затем клетки биомассы разрушаются для более эффективной экстракции липидов. Экстракция проводится смесью полярных и неполярных экстрагентов в течение 2,5...3 часов. Экстрагент отгоняется, смесь липидов разделяется на фракции: фракция, содержащая неполярные липиды, используется в дальнейшем производстве. Неполярные липиды после проведения реакции с метанолом в присутствии катализатора образуют метиловые эфиры жирных кислот и технический глицерин, который применяется во многих отраслях промышленности (производство моющих и косметических средств, сельское хозяйство, текстильная, бумажная и кожевенная отрасли промышленности).

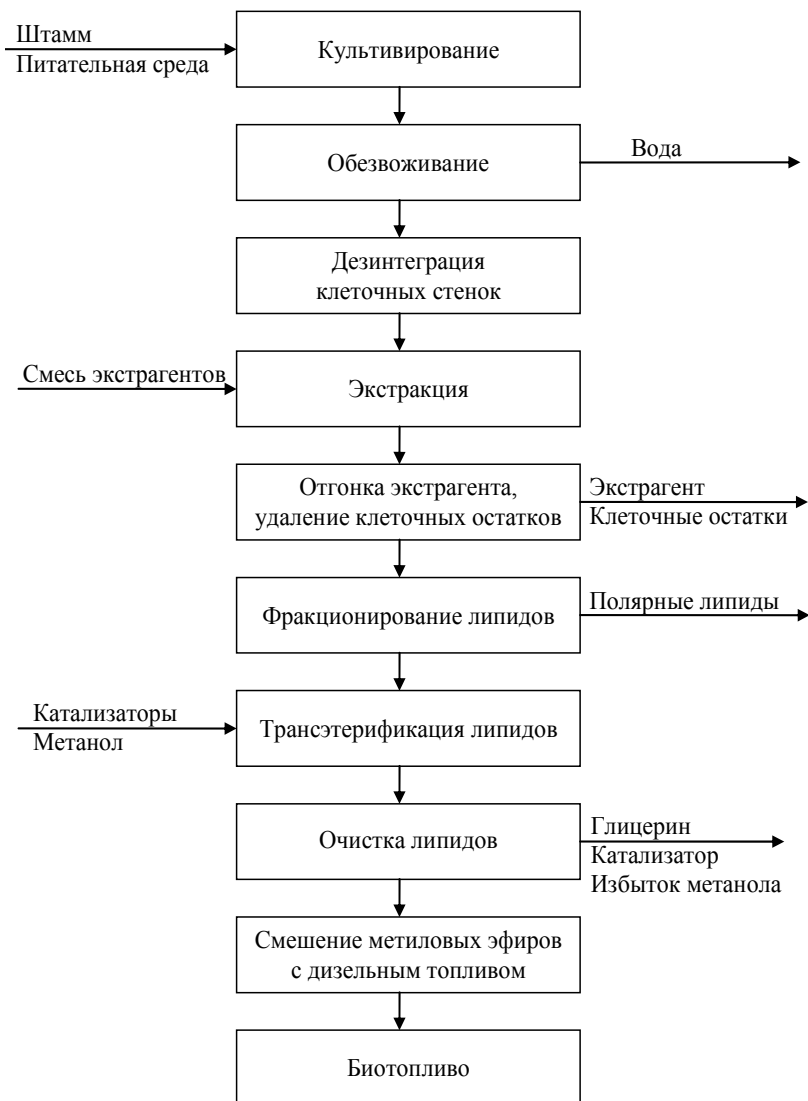


Рис. 4. Эскизная схема производства биотоплива из биомассы *Chlorella vulgaris*

2. ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ

2.1. ОБЗОР ТЕХНОЛОГИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Для обеспечения нормальных условий жизнедеятельности микроводорослей *Chlorella vulgaris* в процессе культивирования биомассы клеток необходимо поддержание следующих условий: оптимальной концентрации микро- и макроэлементов, уровня освещенности и pH, температуры, концентрации CO₂.

В 1957 году была разработана питательная среда *Тамийя* [18], которая широко используется в настоящее время для культивирования биомассы *Chlorella vulgaris*. Работы по модификации данной среды проводились в СССР В. Е. Семененко и Е. Д. Кузнецовым [20], которые исследовали продуктивность культуры *Chlorella vulgaris* на питательных средах *Тамийя* и *Тамийя с мочевиной*. Установлено, что основным недостатком среды *Тамийя* являются завышенные в несколько раз концентрации серы и магния. Поэтому была создана новая сбалансированная питательная среда № 3, прирост биомассы на которой был одинаков по сравнению со средой *Тамийя с нитратным азотом*, и ниже на 1% по сравнению со средой *Тамийя с мочевиной*. В исследованиях Музафарова [19] по культивированию суспензии *Chlorella vulgaris* и использованию ее в качестве кормовой добавки для крупнорогатого скота использовалась специально разработанная среда № 4 и модифицированная среда № 4, которые позволяли достичь урожайности 22...24,5 г/м² для среды № 4 и 22,5...26 г/м² для модифицированной среды № 4. Большое исследование по минеральному питанию микроводорослей проводил В. В. Упитис [20], который разработал сбалансированную среду А-5П. По мнению ав-

тора, данная среда может быть применена для культивирования без регуляции уровня pH, при этом добавление в процессе истощения элементов производится путем внесения в суспензию раствора минеральных солей с концентрацией в 100 раз больше исходной, чем в исходной среде.

Vonshak [21] предложил *среду N-8*, которая имеет широкое применение для массового культивирования хлореллы. Ramkumar K. Mandalam и другие [22] в 1998 году установили, что *среда N-8* дефицитна по железу, магнию, сере и азоту при высоких плотностях клеток. *N-8 среда* была переработана в *среду M-8*; это позволило в 3–5 раз увеличить общее содержание хлорофилла на единицу объема культуры по сравнению с *N-8 средой*. Долгосрочное культивирование (24 дня) *Chlorella vulgaris* на *M-8 среде* показало непрерывное увеличение содержания хлорофилла и биомассы в течение всего периода выращивания. При этом увеличение содержания хлорофилла и биомассы прекратилось после 7 и 12 дней соответственно для *среды N-8*, что продемонстрировало перспективность *среды M-8* для производства биомассы. Таким образом, прирост клеток может быть значительно повышен при соответствующей питательной среде. Также было установлено, что базовое содержание элементов питательной среды при культивировании биомассы влияет на биохимический состав клеток.

Wijanarko A. [23] изучал возможность культивирования *Chlorella vulgaris* на *среде Бенеке*, в результате было определено, что питательная *среда Бенеке* с растворенным азотом в виде нитрата калия является наиболее оптимальной для накопления липидов до 0,42 г/г биомассы. При наличии мочевины в качестве источника азота наблюдалось снижение роста клеток на 30%, при этом создавались условия для производства белка до 0,54 г/г биомассы. Выяснено, что использование сточных вод, содержащих аммиак, позволяет увеличить на 55...60% скорость роста хлореллы и увеличить количество внутриклеточных липидов на 8,5%.

Хелд П. и другие [24] изучали культивирование штамма *Chlorella vulgaris* на питательных *средах BG-11 TAP* и *TP*.

Прирост биомассы на *среде ТАР* был в 1,7 раза выше по сравнению со *средой ТР* и в 16 раз выше по сравнению со *средой ВГ-11* на шестые сутки культивирования [25].

Питательные среды, используемые для культивирования *Chlorella vulgaris*, содержат макро- и микроэлементы, которые обеспечивают нормальную жизнедеятельность клеток (табл. 1).

1. Необходимые для нормальной жизнедеятельности клеток микроводорослей макро- и микроэлементы

Элемент	Значение элемента
К	Влияет на водно-солевой баланс клеток и осмотическое давление
Mg	Участвует в аэробном распаде углеводов и липидов, активирует часть ферментов цикла Кребса, входит в состав хлорофилла
S	Входит в состав цистеина и метионина в реакциях энергетического метаболизма
P	Входит в состав клеточных мембран (фосфолипиды), участвует в синтезе белка, в сохранении и переносе энергии (АТФ)
Mn	Необходим для нормального протекания фотосинтеза, поскольку входит в состав активного центра кислородовыделяющего комплекса фотосистемы II. Играет роль в поддержании структуры хлоропластов. Активирует более 35 ферментов, в том числе ферментов, катализирующих реакции цикла Кребса.
Zn	Участвует в процессах дыхания и белкового обмена
B	Участвует в обмене нуклеиновых кислот, вызывает конкурентное ингибирование некоторых ферментов

Для каждого элемента есть диапазоны концентрации, при выходе за пределы которых рост клеток прекращается или наступает их гибель. Микроводоросли активно реагируют на концентрацию биогенных элементов в суспензии, изменяя биохимический состав клеток; содержание основных компонентов клеток (белки, углеводы, липиды) может меняться в широких пределах.

Недостаток азота вызывает значительное уменьшение урожая биомассы и содержание зольных веществ в ней. Резко увеличивается средний сухой вес клетки, а в органическом веществе уменьшается содержание хлорофилла и белка, увеличивается количество углеводов и липидов.

При недостатке серы происходит увеличение среднего размера одной клетки и разрушение хлорофилла. Отличительными чертами серного голодания являются: некоторое уменьшение содержания белка и резкое увеличение содержания липидов при постоянном уровне углеводов.

Недостаток магния, железа и калия не вызывает значительных изменений биохимического состава клеток, за исключением заметного уменьшения содержания липидов при магниевом голодании.

Факторы минерального питания можно разделить на две основные группы.

В первую группу входят азот и сера. Недостаток этих элементов не вызывает немедленного подавления процессов ассимиляции в клетках водорослей, но замедляет деление и останавливает развитие. В результате клетка накапливает органические вещества и увеличивает свой вес. Поскольку при недостатке азота происходит полное подавление синтеза белка, то клетки накапливают безазотистые соединения (углеводы и липиды). При серном голодании синтез белка подавляется в меньшей степени, а стимуляция образования липидов в этом случае сопровождается некоторым подавлением синтеза углеводов.

Во вторую группу элементов входит фосфор, магний, калий, железо. Дефицит этих элементов отрицательно сказывается в первую очередь на процессах ассимиляции, тогда как деление клеток происходит обычно (за исключением недостатка

магния) нормально. Следствием этого является замедление темпов роста и накопления сухого вещества в клетках: средний размер и средний вес одной клетки при этом не увеличивается или даже уменьшается по сравнению с контролем.

Необходимо отметить, что изменяя состав питательной среды, можно получать продукт желаемого состава с различным соотношением белков и жиров. Так, на среде богатой азотом, *Chlorella vulgaris* может накапливать от 40 до 88% сырого протеина и 5% жира, а при недостатке азота и избытке углерода в питательной среде, наоборот, – 88% жира и 5% протеина.

Изучением влияния состава питательной среды на биохимические свойства клеток *Chlorella vulgaris* занимались П. Хелд [24], Н. Б. Аужанова [26] и др. Было установлено, что особенно сильно на биохимический состав клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris* оказывает влияние дефицит азотсодержащих веществ, стимулирующий накопление внутриклеточных нейтральных липидов - триацилглицеридов (ТАГ), как запасных питательных веществ. По разным данным [24, 26] количество липидов увеличивается в 1,7 – 15 раз.

Glácio S. Araujo и другие [27] изучали создание стресса при культивировании *Chlorella vulgaris* с помощью добавления в питательную среду *F/2 NaCl*. В результате было определено, что содержание NaCl в культуральной среде имеет большое влияние на количество производимой биомассы и на количество липидов, добываемых из микроводорослей. Эксперимент показал, что увеличение содержания NaCl в культуральной среде позволяет значительно (на 35,6%) увеличить концентрацию липидов в сухой биомассе.

В СССР также проводились исследования по определению влияния состава питательной среды на биохимический состав клеток, Г. Л. Клячко-Гурвич и В. Е. Семененко [28] изучали влияние питательной среды *Тамия* без азота на рост *Chlorella pyrenoidosa*. Было выяснено, что клетки, лишённые азотсодержащих веществ, сохраняли фотосинтетическую активность; наблюдалось увеличение сухого веса биомассы за счет синтеза липидов, при этом около 75% липидов составляли жирные кислоты (табл. 2).

**2. Количественный состав жирных кислот липидов
Chlorella pyrenoidosa в обычных условиях роста
и при азотном голодании**

Название кислоты	Формула	Содержание, % масс.	
		Обычная культура	Азотное голодание
Пальмитиновая	16:0	23,5	18,0
9-гексадеценовая	16:1	2,5	1,5
7,10 – гексадекатриеновая	16:2	12,0	3,8
7, 10, 13 – гексадекатриеновая	16:3	11,1	5,0
Стеариновая	18:0	0,6	3
Олеиновая	18:1	3,9	43,2
Линолевая	18:2	21,0	11,0
Линоленовая	18:3	24,2	13,7

Из таблицы 2 видно, что при стрессовом культивировании увеличение содержания липидов произошло за счет увеличения в 11 раз концентрации олеиновой кислоты.

Физиологическая роль процесса накопления липидов при стрессовых условиях культивирования микроводорослей была объяснена А. Е. Соловченко. В работе [10] обобщены накопленные к настоящему времени экспериментальные данные, позволяющие выделить, по крайней мере, три аспекта адаптационной функции ТАГ у микроводорослей:

- 1) нейтральные липиды являются источником длинноцепочечных жирных кислот – строительных блоков для мембран;
- 2) биосинтез ТАГ обеспечивает сток для фотоассимилятов, препятствуя развитию фотоокислительных повреждений

при стрессах, снижающих способность клетки к утилизации продуктов фотосинтеза;

3) откладывающиеся в виде липидных глобул ТАГ образуют депо для вторичных каротиноидов у каротиногенных водорослей, обеспечивающих защиту от фотоповреждения.

В работе [29] установлено, что после прекращения стрессовых условий биохимический состав клеток восстанавливается, при этом добавление имидазола в концентрации 0,5... 2,5 ммоль влияет на образование фотосинтетического аппарата: угнетается синтез белка, хлорофилла, полиненасыщенных и транс-3-гексадеценовых кислот, однако происходит синтез углеводов. Также имидазол препятствует расходованию накопленных жирных кислот. Полученные результаты позволяют также объяснить процесс перестройки биохимического состава клеток при стрессовом культивировании.

Chlorella vulgaris – фотосинтетический организм, поэтому для его культивирования необходима подача определенного уровня освещенности. На практике, при культивировании хлореллы максимальная освещенность не должна превышать 30 тыс. лк. В качестве источников света можно использовать различные лампы при толщине слоя суспензии 30...40 см, чтобы ее внутренние слои получали достаточно света. Одним из первых фотосинтез *Chlorella vulgaris* изучал Роберт Эмерсон [30], который впервые высказал идею о существовании двух фотосинтезирующих систем. У одноклеточной водоросли хлореллы он анализировал влияние длины световой волны на квантовый выход фотосинтеза, то есть количество кислорода, выделившегося в процессе фотосинтеза в расчете на 1 квант поглощенной энергии. Эмерсон установил, что для *Chlorella vulgaris* наиболее эффективным для фотосинтеза был красный свет с длиной волны 650...680 нм, и синий свет с длиной волны 400...460 нм. Именно этот свет поглощается хлорофиллом. Он также вычислил, что фотосинтетическая эффективность красного света на 36% выше, чем синего. В следующих опытах

было показано, что если клетки освещать красным светом с длиной волны 650...680 нм, то квантовый выход достаточно высок. Однако при дальнейшем увеличении длины волны света свыше 685 нм квантовый выход фотосинтеза резко падал. Если же хлореллу освещать и коротковолновым (650 нм) и длинноволновым (700 нм) красным светом суммарный эффект будет больше, чем при действии каждого луча в отдельности. Это явление получило название эффекта усиления Эмерсона, и дало возможность Эмерсону предположить, что в микроводорослях (как и в наземных растениях) существуют две фотосинтезирующие системы, которые должны работать согласованно.

Семененко В. Е. другие [31] изучали возможность выращивания *Chlorella pyrenoidosa* в условиях освещения импульсным светом. При этом, было выяснено, что культура *Chlorella pyrenoidosa* способна расти в условиях освещения импульсным светом при длительности вспышки около 25 мкс с темновым интервалом 0,1 с и достигает на 17-й день плотности порядка 100 млн кл./мл. Выяснено, что культуре требуется время на адаптацию, при этом адаптация нужна ростовым процессам и процессам развития, но не фотосинтетическому аппарату, поскольку интенсивность фотосинтеза остается одинаковой.

Низкая интенсивность света вызывает образование полярных липидов, в то время как высокая интенсивность света уменьшает общее содержание полярных липидов, с сопутствующим увеличением количества нейтральных липидов хранения, главным образом триацилглицеридов [32 – 34]. Недостаточная освещенность способствует формированию полиненасыщенных жирных кислот, тогда как высокий уровень освещенности способствует синтезу насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот [35].

Также важным фактором в процессе культивирования является температура суспензии. Оптимальная температура выращивания зависит от типа культивируемого штамма *Chlorella vulgaris*. Штаммы подразделяются на термофильные, мезо-

фильные и криофильные. Подбор уровня температуры должен быть осуществлен с помощью анализа природной среды обитания штамма. Изменение состава жирных кислот наблюдается при изменении температуры культивирования: увеличивается число ненасыщенных жирных кислот в составе липидов с уменьшением температуры [36].

2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЖИМОВ ПЕРИОДИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

Цель исследования заключалась в определении оптимальных условий культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* с повышенным содержанием липидов для дальнейшего их использования при производстве биотоплива. Эксперименты проводились при следующих фиксированных условиях:

1) посевной материал составлял 20% от общего объема суспензии;

2) pH = 6,2...8,0;

3) барботаж суспензии для всех экспериментов осуществлялся газовоздушной смесью с содержанием углекислого газа 0,04% и расходом 80 л/ч для интенсивного перемешивания слоев суспензии;

4) фотопериод составлял 24 часа;

5) каждые четверо суток в суспензию добавлялся источник азота в том же соотношении, в котором он вносился для приготовления питательной среды.

Определение концентрации клеток осуществлялось путем прямого подсчета в камере Горяева. Культивирование осуществлялось в лабораторной установке, представленной на рис. 5.

Процесс периодического культивирования биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* в технологии производства биотоплива третьего поколения состоит из двух периодов: накопление биомассы микроводоросли до концентрации 55...60 млн кл./мл и выше, и создание стрессовых условий для клеток, которое тормозит размножение микроводоросли и приводит к накоплению в клетках липидов.

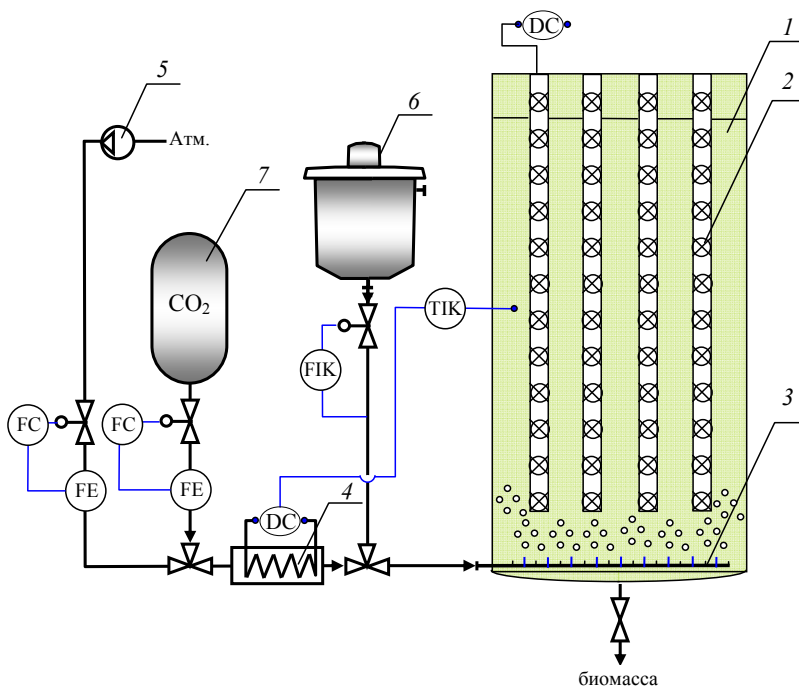


Рис. 5. Принципиальная схема лабораторной установки культивирования биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris*:
 1 – фотобиореактор, 2 – светодиодный кабель, 3 – устройство для подачи питательной среды и барботаж;
 4 – нагреватель;
 5 – компрессор; 6 – емкость для подачи питательной среды;
 7 – баллон с CO₂

На первом этапе эксперимента изучалась эффективность культивирования штамма на питательных средах Таммийя [38], A-5 (Urpit's V.V. [20], и TAP [24]. На восьмой день культивирования концентрация биомассы на среде Таммийя составил 49,1 млн кл./мл, на среде TAP – 5,1 млн кл./мл и на среде A-5 – 0,2 млн кл./мл (рис. 6). Анализ графика показывает, что для культивирования данного штамма в наибольшей степени подходит среда Таммийя.

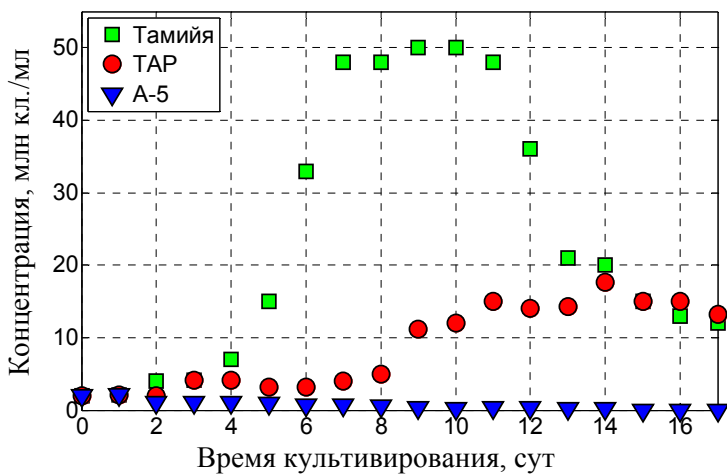


Рис. 6. Динамика прироста биомассы на различных питательных средах

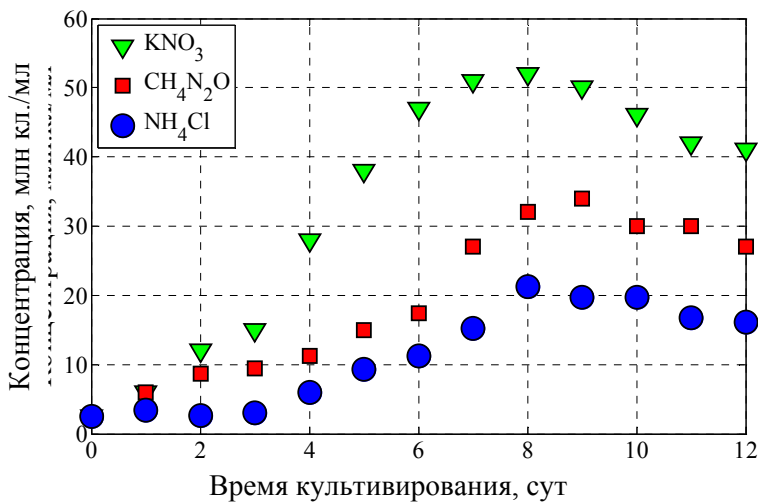


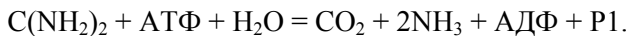
Рис. 7. Динамика прироста биомассы на питательной среде Тамийя с различными источниками азота

На втором этапе эксперимента осуществлялся подбор вида источника азота, как наиболее важного элемента для культивирования штамма *Chlorella vulgaris*. В качестве источников азота в питательной среде использовались нитрат калия (5 г/л), хлорид аммония (2,64 г/л) и мочевины (1,5 г/л). Наилучший результат получился при использовании в составе питательной среды нитрата калия (рис. 7): на седьмой день культивирования – 52 млн кл./мл, в то время как применение мочевины в составе питательной среды позволило получить 32 млн кл./мл, а хлорида аммония – всего 21 млн кл./мл. Результаты эксперимента показывают, что в качестве источника азотсодержащих соединений для накопления биомассы штамма *Chlorella vulgaris* оптимально подходит нитрат калия, обеспечивающий двукратный прирост биомассы на седьмой день культивирования по сравнению со средой с мочевиной и более чем пятидесятикратный – при использовании питательной среды с хлоридом аммония. Объяснить низкий прирост на среде с хлоридом аммония в качестве источника азота можно тем, что хлорид аммония NH_4Cl – соль слабого основания гидрата аммиака $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и сильной соляной кислоты HCl , в воде гидролизует-ся и дает кислую реакцию:



поэтому уровень pH в процессе культивирования на этой среде падал с 7,05 до 3,5.

Замедление прироста биомассы на среде с использованием мочевины можно объяснить тем, что *Chlorella vulgaris* содержит мочевиновую амидазу, которая катализирует расщепление мочевины [20]:



Установлено, что при культивировании штамма и использовании в качестве источника азота – мочевины, на 4–5 день культивирования аммонийная форма азота может достигать в среде 40...60% от общего содержания азота, что подкисляет среду и вызывает угнетение роста клеток. При этом использование на практике среды Тамия с нитратом калия также вы-

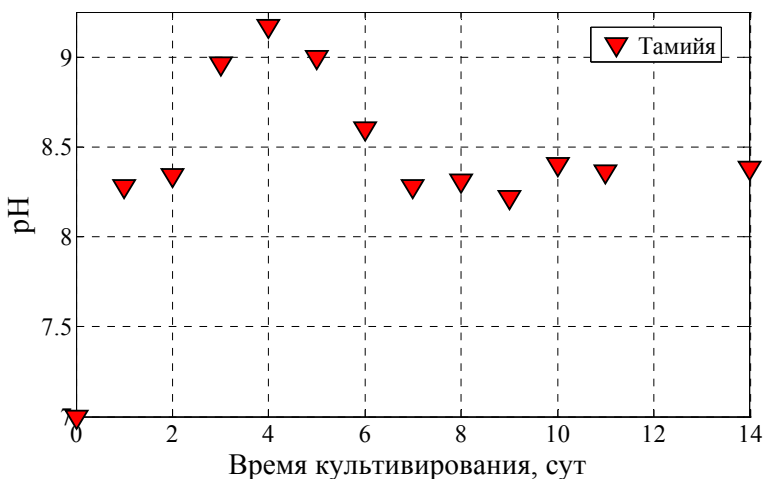


Рис. 8. Динамика изменения уровня pH на среде Тамийя

явило ряд существенных недостатков: рост уровня pH в процессе культивирования клеток (рис. 8): избыток практически всех макро- и микроэлементов (магния, серы, фосфора, калия, марганца, цинка и бора) [20], которые при избыточном потреблении проявляют токсические свойства [20].

На третьем этапе эксперимента осуществлялся подбор уровня освещенности 3 клк, 7 клк и 14 клк (при этом предел уровня освещенности для микроводорослей составляет 25...30 клк) суспензии при культивировании штамма на среде Тамийя. Из графика (рис. 9) видно, что оптимальным является поддержание уровня освещенности на уровне 14 клк, что позволяет штамму микроводоросли достичь стационарной фазы на седьмые сутки культивирования.

На четвертом этапе эксперимента осуществлен подбор температуры культивирования, обеспечивающей максимальный прирост биомассы штамма. Штамм культивировался на среде Тамийя при температуре 27, 30, 35 °С. Максимальный прирост биомассы штамма (51 млн кл./мл) наблюдался на восьмые сутки культивирования при поддержании температуры суспензии на уровне 30 °С (рис. 10).

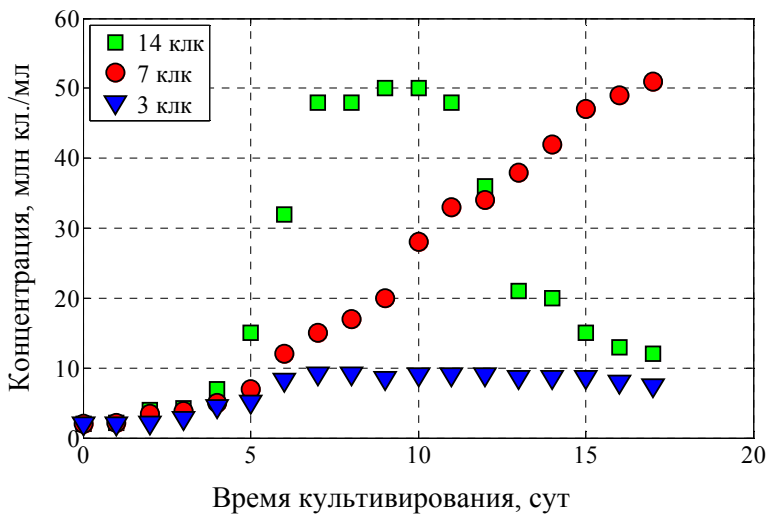


Рис. 9. Динамика прироста биомассы при различном уровне освещенности

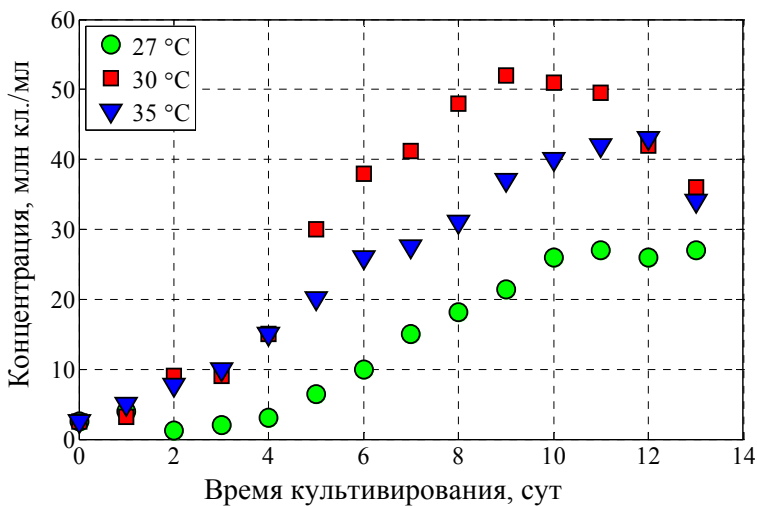


Рис. 10. Динамика прироста биомассы в зависимости от температуры

На пятом этапе эксперимента был осуществлен подбор расстояния между элементами освещения для культивирования штамма. Как показал результат эксперимента, уровень освещенности на глубине суспензии в 30 мм составляет всего лишь 7% от величины освещенности на поверхности фотобиореактора (рис. 11). Поэтому для оптимизации режима инсоляции необходимо поддержание интенсивного барботажа суспензии в реакционном пространстве, чтобы все клетки достаточное время находились в области с высоким уровнем освещенности.

На шестом этапе эксперимента штамм выращивался на стандартной и обедненной азотом *средах Тамийя* (рис. 12). Дефицит азота создает стрессовые условия культивирования, которые необходимы для стимулирования накопления липидов в клетках биомассы. Прирост клеток на стандартной *среде Тамийя* на восьмой день культивирования составил 48 млн кл./мл (содержание липидов 8%), а на обедненной азотом среде Тамийя – 9 млн кл./мл (содержание липидов 32% (экстракция по Сокслету)).

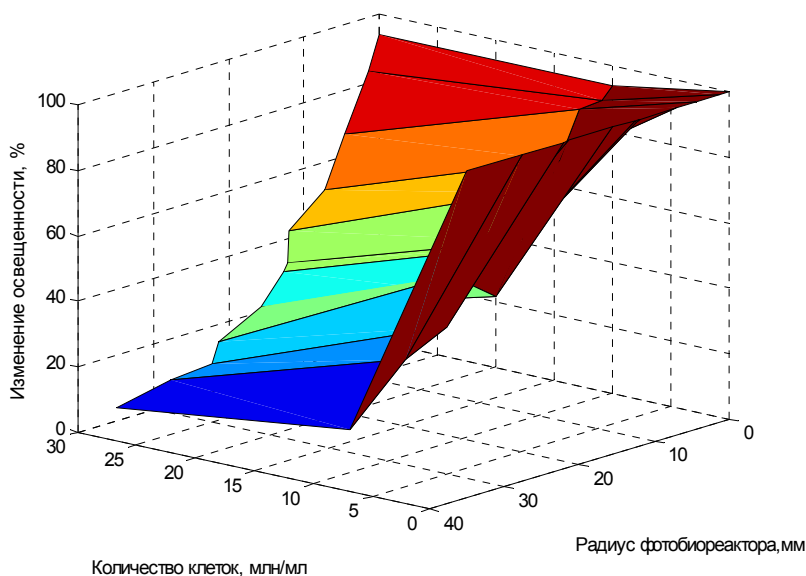


Рис. 11. Зависимость уровня освещенности от радиуса фотобиореактора и концентрации клеток в суспензии

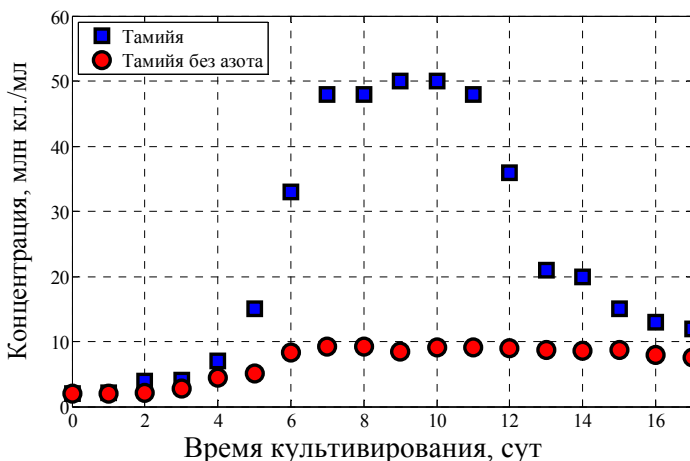


Рис. 12. Прирост биомассы на стандартной и обедненной азотом средах *Тамийя*

Также был проведен эксперимент по исследованию влияния стрессовых условий при культивировании *Chlorella vulgaris* на накопление внутриклеточных нейтральных липидов. В качестве стрессовых воздействий использовались:

- 1) добавление в суспензию хлорида натрия в концентрации 2 г/л;
- 2) повышение уровня освещенности до 32 клк (что соответствует режиму фотоокислительного стресса);
- 3) поддержание дефицита азота в питательной среде на уровне 50 мг/л суспензии.

Количество липидов в клетках измерялось каждый день (концентрирование биомассы осуществлялось с помощью центрифуги при 3000 мин^{-1} в течение пяти минут). Из полученной сконцентрированной биомассы влажностью 90...95% липиды экстрагировались с помощью смеси нефрас С2 80/120: этанол, взятые в соотношении 1 : 2 (об.). Полученные экстракты концентрировались с помощью роторного испарителя ИР-1Л. Качественное наличие нейтральных липидов в экстрактах определялось с помощью метода тонкослойной хроматографии (ТСХ), количественное – исследованием пластин для ТСХ с помощью денситометра «Сорбфил» Версия 2 [85].

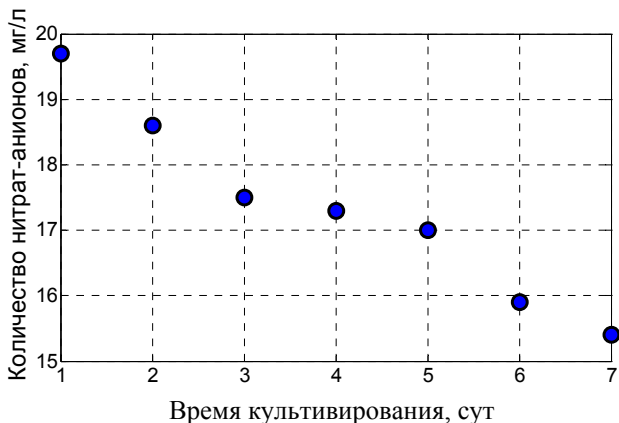


Рис. 13. Концентрация клеток в суспензии в стрессовых условиях культивирования (дефицит азота)

Создание всех видов стрессовых условий тормозит размножение клеток, концентрация клеток на седьмые сутки после создания стресса уменьшилась на 26% по сравнению с контролем.

Дефицит азота вызывал следующие изменения в суспензии штамма *Chlorella vulgaris*: цвет суспензии уже на третий день из темно-зеленого стал бледно-зеленым, концентрация клеток в суспензии начала уменьшаться (рис. 13).

Клетки увеличились в размерах (рис. 14), биосинтез белка прекратился, клетки начали накапливать запасные питательные вещества в виде неполярных липидов.

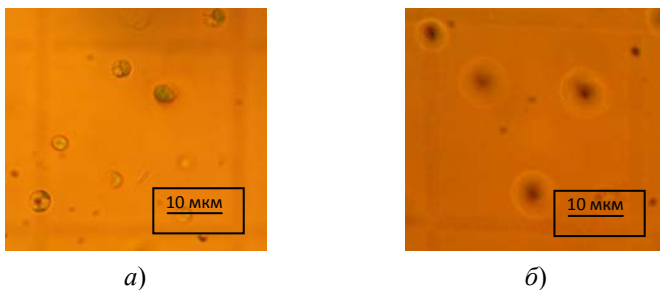


Рис. 14. Микроскопия *Chlorella vulgaris*:
a – до создания стрессовых условий;
б – после создания стрессовых условий



a)



б)

Рис. 15. Реакция штамма на фотоокислительный стресс:
a – второй день стресса; *б* – пятый день стресса

Наличие NaCl в концентрации 2 г/л не привело к внешним изменениям суспензии.

Фотоокислительный стресс вызывал появление пены рыжего цвета (рис. 15).

На четвертые сутки поддержания стрессовых условий наибольшая концентрация внутриклеточных липидов наблюдалась в биомассе, культивируемой в условиях дефицита азота (до 32% от сухого вещества клеток), что в 7 раз выше по сравнению с контрольным образцом. Остальные виды стрессовых воздействий привели к незначительному увеличению содержания липидов по сравнению с контрольным образцом. По результатам эксперимента можно сделать вывод, что для накопления внутриклеточных липидов наиболее перспективно создавать стресс с помощью дефицита азотсодержащих солей (рис. 16).

Для стимулирования накопления неполярных липидов стрессовые условия необходимо создавать с помощью дефицита азотсодержащих веществ.

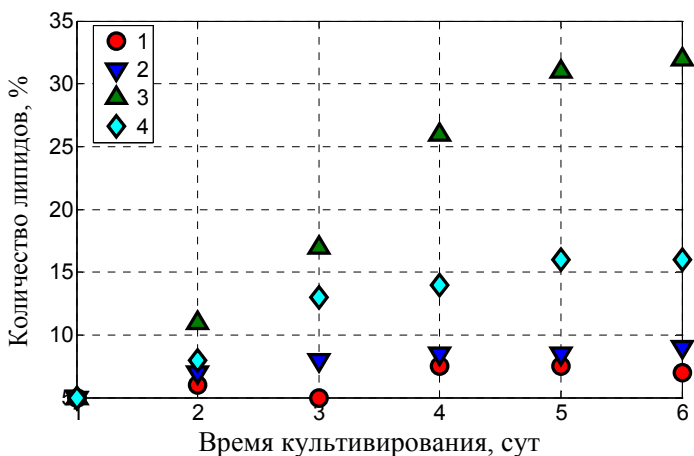


Рис. 16. Динамика накопления липидов после создания стресса:
 1 – добавлением хлорида натрия 2 г/л; 2 – освещенностью 32 клк;
 3 – дефицитом азота; 4 – контроль

По результатам экспериментальных исследований можно сделать вывод, что для накопления липидов в биомассе на 7–8 день (по достижению стационарной стадии роста) необходимо создавать стрессовые условия путем снижения содержания азота в питательной среде, что позволит накопить до 32% от сухого вещества клетки липидов.

2.3. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА РОСТА МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

В связи с тем, что экспериментальное исследование процесса культивирования микроводорослей является затратным процессом как с точки зрения ресурсов, так и времени, актуальной задачей является разработка математической модели, способной описывать процессы накопления биомассы клеток микроводорослей, убыли субстрата и накопления липидов.

Процесс культивирования микроводоросли может быть представлен в виде следующей схемы (рис. 17):

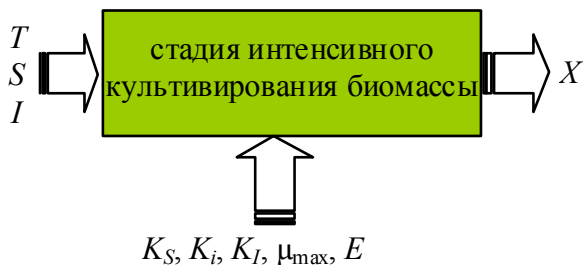


Рис. 17. Структурная схема процесса культивирования биомассы

Протекание стадии интенсивного культивирования биомассы определяется входными переменными: T – температура, S – концентрация азотсодержащих солей, I – освещенность, изменение которых влияет на количество накопленных липидов X , и внутренними параметрами: K_S – константа полунасыщения, $K_i = 8,4$ – константа ингибирования, K_I – константа полунасыщения по освещенности, μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста, E – емкость популяции, которые зависят от физических свойств среды, вещества и т.д.

При разработке математической модели кинетики роста биомассы микроводоросли и накопления липидов внутри клетки приняты следующие допущения:

1. Процесс культивирования биомассы *Chlorella vulgaris* состоит из двух периодов: накопления биомассы клеток, в течение которого не происходит образования и накопления липидов; создания стрессовых условий, при которых происходит образование и накопление липидов.

2. Гидродинамический режим в рабочем объеме фотобиореактора близок к идеальному перемешиванию, поскольку процесс культивирования осуществляется периодическим способом при интенсивной аэрации газовой воздушной смесью. Подвод пузырьков газовой воздушной смеси к клетке не затруднен.

3. Кислород равномерно распределен по рабочему объему фотобиореактора, и его количества достаточно для осуществления клетками энергетического обмена.

4. Освещение в рабочем объеме фотобиореактора осуществляется равномерно.

5. Возраст клеток не учитывается при моделировании процесса образования липидов.

6. Основным лимитирующим субстратом являются азотосодержащие соли.

7. При создании стрессовых условий в питательной среде поддерживается низкая концентрация азотосодержащих солей.

8. Процесс культивирования осуществляется в интервале значений рН, оптимальных для накопления биомассы.

9. Процессы питания, фотосинтеза, размножения и другие идут одновременно.

10. Влияние на скорость роста факторов освещения и концентрации азотосодержащих солей является независимым друг от друга.

Проведенные экспериментальные исследования процесса накопления биомассы микроводорослей (рис. 18) показали, что характер кривой соответствует логистическому уравнению Ферхюльста [39] для ограниченного роста популяции

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \cdot \left(1 - \frac{x}{E}\right), \quad (1)$$

где x – концентрация биомассы клеток, млн кл./мл; μ – удельная скорость роста, 1/сут; E – емкость популяции, млн кл./мл.

Процесс убыли субстрата при периодическом культивировании микроводорослей описывается уравнением [40]:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dx}{dt} + \frac{1}{Y_{PS}} \cdot \frac{dP}{dt} + m_s \cdot x, \quad (2)$$

где Y_{XS} – коэффициент, показывающий количество образующейся биомассы Δx при количестве затраченного субстрата ΔS за время Δt , рассчитывается по экспериментальным данным (млн кл.·л)/(мл·г); Y_{PS} – коэффициент, показывающий количество образующихся липидов ΔP при количестве затраченного субстрата ΔS за время Δt , рассчитывается по эксперименталь-

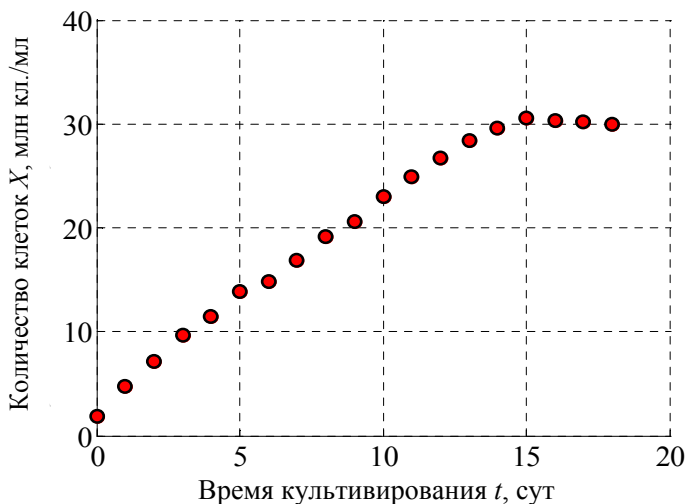


Рис. 18. Кинетика роста биомассы микроводорослей

ным данным; P – количество липидов, %; m_s – коэффициент поддержания жизнедеятельности.

В соответствии с седьмым допущением расходование азотсодержащего субстрата не происходит при накоплении продуктов метаболизма, поэтому второе слагаемое исключаем из уравнения (2). Для неэнергетических субстратов, таких как азот, $m_s = 0$ [40]. Таким образом, уравнение (2) преобразуется к виду (3):

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS}} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

Количество образующихся липидов P пропорционально величине накопленной биомассы x микроводорослей. Для образования липидов необходимо создание стрессовых условий – пониженного содержания субстрата S – азотсодержащей соли, т.е. количество P должно быть пропорционально $1/S^r$, где r – показатель степени. Концентрация биомассы микроводорослей x

достигает максимального значения K , после чего дальнейший прирост прекращается. Можно предположить, что аналогичным образом будет прекращаться рост количества образующихся липидов. Максимально возможное количество липидов будет определяться тогда величиной P_{\max} . С учетом вышесказанного уравнение для расчета количества образующихся липидов может быть записано в виде

$$\frac{dP}{dt} = \frac{q_P}{S^r} \cdot x \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right), \quad (4)$$

где q_P – величина, характеризующая максимальный прирост липидов в единицу времени, 1/сут; P_{\max} – максимальное количество накопленных липидов, %.

С целью определения коэффициентов, входящих в уравнения (1), (3), (4), проведен комплекс экспериментальных исследований.

Величина максимальной емкости популяции $E = 31$ млн кл./мл определялась из графика, представленного на рис. 18, и соответствовала максимальной достигнутой концентрации клеток биомассы.

Известно [40], что факторами, наиболее влияющими на величину удельной скорости роста μ , являются: температура T , уровень освещенности I , концентрация азотсодержащих солей S , т.е.:

$$\mu = \mu(T, I, S). \quad (5)$$

Влияние каждого из факторов рассматривалось при фиксированных и оптимальных значениях других факторов.

Проведены экспериментальные исследования, по культивированию микроводоросли *Chlorella vulgaris* в питательных средах при различных значениях концентраций нитрата калия (рис. 20).

Анализ графика, приведенного на рис. 19, позволяет сделать вывод, что процесс ингибирования роста биомассы повы-

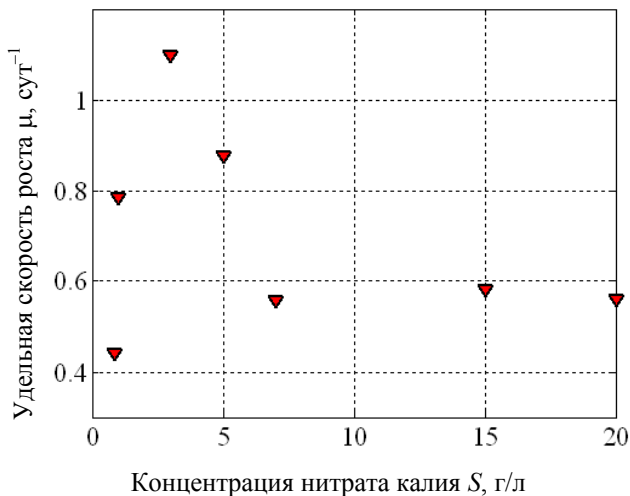


Рис. 19. Зависимость удельной скорости роста μ от количества субстрата S

шенными концентрациями субстрата S описывается уравнением Эндрюса [40]:

$$\mu(S)_{I=\text{const}} = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S + S^2 / K_{\text{ing}}} \right), \quad (6)$$

где $\mu_{\max} = 1,1 \text{ сут}^{-1}$ – максимальная удельная скорость роста микроорганизмов; S – количество субстрата (азотсодержащие соли), г/л; $K_s = 1,06$ г/л – константа полунасыщения; $K_{\text{ing}} = 8,4$ – константа ингибирования, г/л, $I = \text{const} = 5600$ лк. Величины μ_{\max} , K_s , K_{ing} определены по графику на рис. 19.

Влияние уровня освещенности I на кинетику прироста микроводорослей (рис. 20) наиболее часто описывается уравнением Михаэлиса–Ментен [41]:

$$\mu(I)_{S=\text{const}} = \mu_{\max} \left(\frac{I}{K_I + I} \right). \quad (7)$$

где $K_I = 15000$ лк – константа полунасыщения по освещенности.

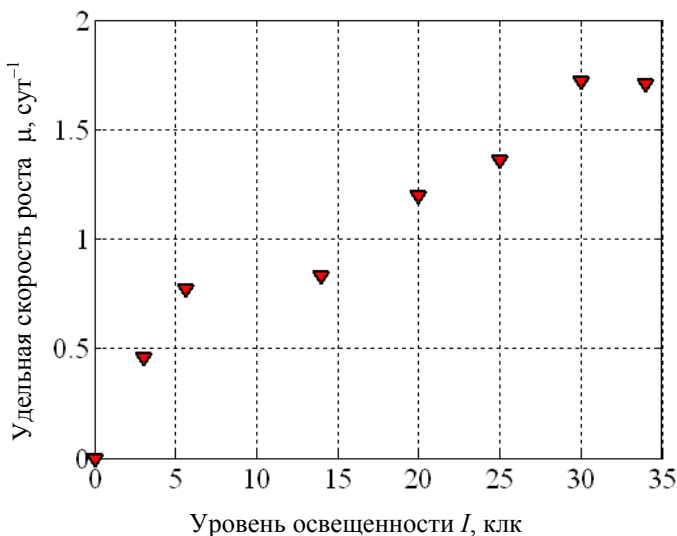


Рис. 20. Зависимость удельной скорости роста μ от освещенности I

В процессе культивирования микроводоросли от температуры T зависит максимальная удельная скорость роста μ_{\max} , входящая в формулы для расчета $\mu(S)_{I=\text{const}}$, $\mu(I)_{S=\text{const}}$. Величины K_s и K_{ing} в меньшей степени зависят от температуры T [40], поэтому уравнение для расчета максимальной удельной скорости роста μ_{\max} записано в виде степенной зависимости от температуры T :

$$\mu_{\max}(T) = A_0 + A_1 \cdot T + A_2 \cdot T^2, \quad (8)$$

где $A_0 = -1,3 \cdot 10^3$, $A_1 = 8,6$, $A_2 = -0,01$, – коэффициенты, найденные путем решения системы, состоящей из трех уравнений (9) для температур 300, 303, 308 К.

В соответствии с десятым допущением принимаем зависимость [40]:

$$\mu = 0,5 \cdot (\mu(S)_{I=\text{const}} + \mu(I)_{S=\text{const}}). \quad (9)$$

Величина Y_{XS} находится как среднее значение, полученное в результате обработки экспериментальных кривых накопления биомассы микроводорослей $x(t)$ и количества субстрата $S(t)$, по формуле [40]:

$$Y_{XS} = \frac{x_n - x_0}{S_0 - S_n}, \quad (10)$$

где 0, n – первый и последний дни эксперимента. $Y_{XS} = 6,05$ (млн кл. · л)/(мл · г).

Величина удельной скорости биосинтеза продуктов q_p рассчитывалась по аналогии с формулой для расчета удельной скорости роста клеток [40]:

$$q_p = \frac{\ln P_n - \ln P_{n-1}}{S_n - S_{n-1}}. \quad (11)$$

Величины $q_p = 1,5$; $P_{\max} = 32\%$ и $r = 2$ определены в результате обработки экспериментальных данных по кинетике накопления липидов.

Решение системы обыкновенных дифференциальных уравнений (1), (3), (4), (5) осуществлялось методом Рунге-Кутты четвертого порядка [42] в среде *Matlab* [36] с начальными условиями при $t = 0$:

$$x(0) = 2, S(0) = 5, P(0) = 4. \quad (12)$$

Результаты решения представлены на рис. 21 – 23.

Анализ полученных данных позволяет заключить, что максимальная величина прироста биомассы микроводорослей и накопления внутриклеточных липидов обеспечивается в период до 15 сут, после чего необходимо переходить к следующей стадии – разрушения клеток.

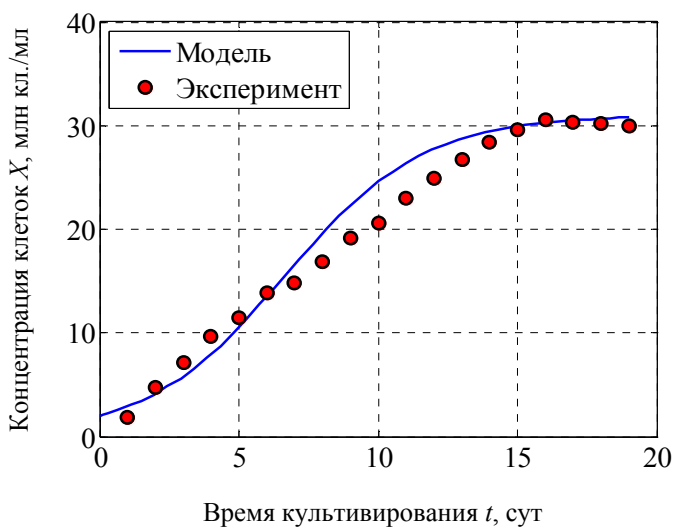


Рис. 21. Динамика роста клеток биомассы, млн кл./мл

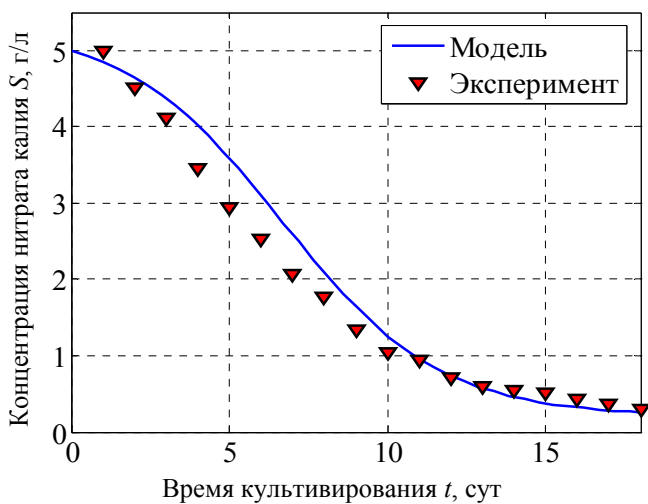


Рис. 22. Динамика убыли количества субстрата, г/л

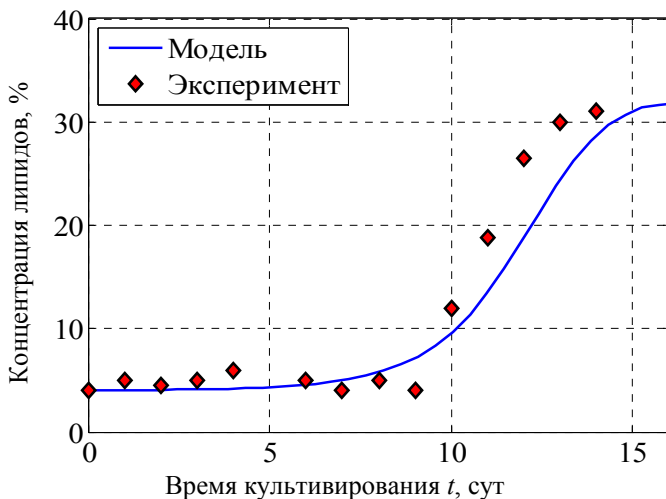


Рис. 23. Динамика накопления липидов, % масс

График, описываемый уравнением Эндруса, имеет явный экстремум, который наблюдается на экспериментальной зависимости. По этой зависимости можно определить при каком количестве лимитирующего субстрата удельная скорость роста будет максимальной. Для этого найдем производную μ по S и приравняем ее к нулю:

$$\frac{d\mu}{dS} = 0 = \mu_{\max} \frac{S \left(1 + 2 \frac{S^2}{K_i} \right) - \left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_i} \right)^2}; \quad (13)$$

$$S + 2 \frac{S^2}{K_i} - K_s - S - \frac{S^2}{K_i} = 0, \quad (14)$$

откуда

$$S_{\text{opt}} = \sqrt{K_s K_i} = \sqrt{1,06 \cdot 8,4} = 3,2 \text{ г/л}. \quad (15)$$

3. Состав питательной среды для культивирования микроводорослей *Тамийя OPTIMUM*

Соль (макроэлементы)	Количество, г/л
KNO_3	3,2
$NaH_2PO_4(KH_2PO_4)$	0,2 (0,22)
$MgSO_4$	0,125
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,013
ЭДТА	0,044
Раствор микроэлементов 1 мл в 1 л среды	
Соль (микроэлементы)	Количество, г/л
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,8
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,1
$CuSO_4$	0,8
MoO_3	0,018
H_3BO_3	0,28
NH_4VO_3	0,023

Таким образом, оптимальная концентрация нитрата калия в среде составляет 3,2 г/л. Далее, используя оптимальные соотношения макро- и микроэлементов [20], был рассчитан состав оптимизированной среды, получивший название *Тамийя OPTIMUM*, представленный в табл. 3.

При поэлементном анализе составов *сред Тамийя* и *Тамийя OPTIMUM* (табл. 4), можно сделать вывод, что новая питательная среда содержит в избытке всего один элемент – калий, в то время как *среда Тамийя* избыточна по семи элементам. В питательную *среду Тамийя OPTIMUM* введен дополнительный элемент – медь, которая является важным микроэлементом, входящим в состав фермента цитохромоксидазы и пластоцианина – переносчика электронов между фотосистемой 1 и 2, которые участвуют в конечном звене дыхательной цепи. Поэлементное сравнение питательных *сред Тамийя* и *Тамийя OPTIMUM* представлено в табл. 4.

4. Поэлементное сравнение питательных сред

Элемент	Минимальный уровень обеспеченности биомассы, мг/л	Максимальный уровень обеспеченности биомассы, мг/л	Содержание элементов в среде <i>Тамийя</i> , мг/л	Содержание элементов в среде <i>Тамийя OPTIMUM</i> , мг/л
N	85	850	700	444
P	12	120	<u>285</u>	50
K	11	110	<u>2294</u>	<u>1248</u>
Mg	5	50	<u>247</u>	25
S	7	70	<u>325</u>	33,75
Fe	0,5	5	0,6	2,5
Mn	0,02	0,2	<u>0,5</u>	0,1
Zn	0,004	0,04	<u>0,05</u>	0,02
Cu	0,002	0,02	–	0,01
Mo	0,002	0,02	0,011	0,01
B	0,01	0,1	<u>0,5</u>	0,05

Отметим, что себестоимость одного кубического метра новой питательной среды в 1,9 раза ниже по сравнению со средой *Тамийя*.

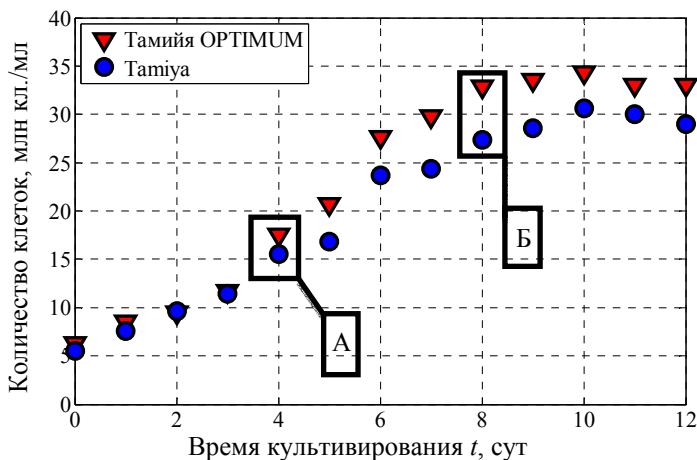


Рис. 24. Динамика роста клеток *Chlorella vulgaris* на средах *Тамийя* и *Тамийя OPTIMUM*

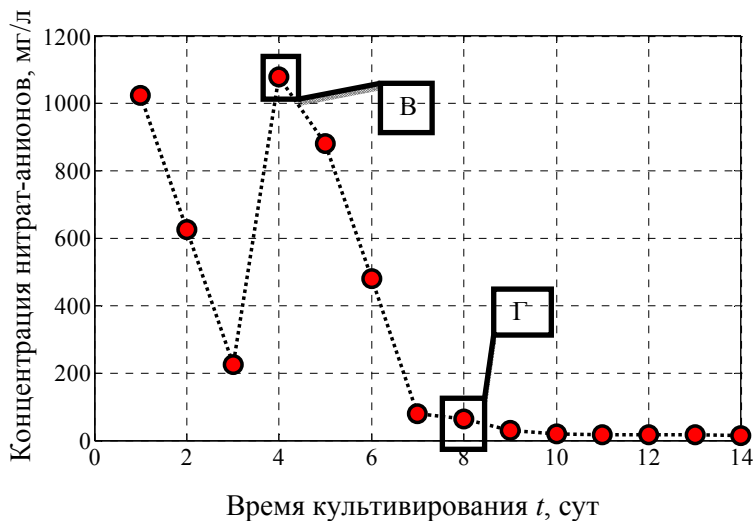


Рис. 25. Динамика убыли азотсодержащего субстрата

Культивирование на питательной среде *Тамия OPTIMUM* позволяет увеличить концентрацию клеток в 1 мл суспензии на 14% (рис. 24).

Для получения максимального количества биомассы с повышенным содержанием липидов в питательную среду *Тамия OPTIMUM* на четвертые сутки культивирования необходимо вносить нитрат калия (точки А, В на рисунках 24, 25), в количестве 3,2 г/л. При этом к наступлению стационарной фазы роста культуры (точка Б на рис. 24), количество нитрат-анионов в питательной среде будет соответствовать наступлению стрессовых условий культивирования (точка Г на рис. 25).

Таким образом, питательная среда *Тамия OPTIMUM* становится средой для стрессового культивирования, поэтому может быть рекомендована при культивировании биомассы с повышенным содержанием липидов.

3. ПОДХОДЫ К ПОДГОТОВКЕ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

3.1. ОБЗОР СПОСОБОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БИОМАССЫ И РАЗРУШЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

В технологии промышленного производства клеток биомассы микроводорослей одной из основных стадий является концентрирование биомассы с сохранением жизнеспособности клеток для того, чтобы предотвратить изменение биохимического состава клеток, полученного в ходе культивирования. Сложность концентрирования биомассы обусловлена небольшим размером клеток водоросли (2...10 мкм в диаметре) и низкой концентрацией 0,5...5 г/л биомассы микроводоросли в суспензии [43].

Существует большое количество методов разделения клеток и культуральной среды [44, 45 – 48]: центрифугирование, седиментационное осаждение, (ультра) фильтрация, флокуляция, флотация и ультразвуковая обработка. Тем не менее, каждый из этих методов имеет свои недостатки, которые влияют на себестоимость процесса. Недостатком разделения при помощи центрифугирования является высокое потребление энергии [49, 50]. Недостаток фильтрации заключается в частой замене фильтров, мембран и длительного времени проведения процесса. В процессе седиментационного (гравитационного) осаждения тратится наименьшее количество энергии, что является несомненным достоинством данного метода. Однако, длительное время его проведения и низкая степень разделения ограничивает его промышленное применение. Электрофлотация сопряжена с частой заменой электродов и большими затратами электроэнергии [47, 51].

Широко используется способ концентрирования биомассы с использованием флокулянтов. Флокуляция микроводорослей возникает из-за нейтрализации заряда и снижения электростатических сил отталкивания между заряженными клетками

микроводорослей в суспензии [47], отдельные клетки микроводорослей агрегируются с образованием более крупных частиц, которые осаждаются быстрее [44, 52, 53]. Она широко применяется из-за своей высокой эффективности и низкой стоимости [54].

В статье D. Surendhiran and M. Vijay [56] показано исследование влияния восьми различных флокулянтов на эффективность концентрирования морской микроводоросли *Nannochloropsis oculata*. Максимальная эффективность концентрирования наблюдалась при использовании в качестве флокулянта FeCl_3 и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ при концентрациях 0,4 и 0,6 г/л на 180 минуте – 93,80 и 87,33% соответственно. Соли цинка заняли второе место по эффективности флокуляции ZnCl_2 (0,6 г / л) – 89,12% и ZnSO_4 (0,8 г/л) – 84,17% на 210 и 240 мин соответственно, в то время как соли алюминия показали эффективность флокуляции 85,46% для AlCl_3 (0,6 г / л) и 82,27% для $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (0,4 г/л) на 210 и 240 мин соответственно. Соли магния показали наименьший эффект флокуляции. Соли железа спровоцировали полный лизис клеток, поэтому они были исключены из дальнейшего исследования. Влияние температуры, режима «свет–тьма» также были изучены при одновременном добавлении солей Al и Zn. Результаты исследования показали, что оптимальная температура флокуляции составила 35 °C в условиях освещения. Осаждение с использованием ZnCl_2 и ZnSO_4 составило при освещении 92,3 и 90,5% соответственно и в темноте – 83,1 и 80,1% соответственно. Кроме того, клетки оставались целыми при более высоких концентрациях солей и температуре. Осаждение с использованием AlCl_3 и $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ составило при освещении 88,5 и 85,5% соответственно и в темноте – 74,8 и 68,8% соответственно. Так как при использовании солей алюминия эффективность флокуляции была ниже, рекомендовано использование хлорида цинка.

Nyomi Uduman, Hsueh Lee, Michael K. Danquah и другие [57] исследовали электрокоагуляцию микроводорослей. Процесс электрокоагуляции включает в себя короткий период индукции, в течение которого ионы металлов с анода переходят в

суспензию. Затем они адсорбируются микроводорослями и индуцируют флокуляцию. Агломераты микроводорослей переносятся на поверхность пузырьками водорода, которые образуются на катоде. Эксперименты показали успешность данного метода для концентрирования биомассы микроводорослей при использовании всех типов электродов. При этом наибольшая эффективность электрокоагуляции получена при использовании в качестве материала анода алюминия. Использование алюминия позволяет обеспечить более высокую эффективность процесса электрокоагуляции, чем при использовании нержавеющей стали в качестве материала анода, при меньшей величине концентрации ионов в растворе. Это связано с тем, что ион алюминия имеет заряд $3+$, что обуславливает большую вероятность образования агломератов за счет нейтрализации поверхностного заряда клеток.

Nakamura H. [58] установил, что в качестве химического коагулянта можно использовать тетрахлорид титана в концентрации 0,001%, а также 10%-ный раствор сернистого марганца.

Эффективно действует на клетки водорослей гашеная известь, 1%-ный раствор которой через 4...6 ч после добавления в суспензию в соотношении 50...70 мл/л вызывал почти полное осаждение клеток микроводорослей на дно бассейна. По мнению Н. П. Арутюняна [59], кальций действует на оболочку клеток и тем самым изменяет их проницаемость. Ион OH^- при действии на оболочку вызывает гидролиз коллоидных веществ. Все это способствует образованию агломератов и ускорению процесса седиментации в растворе.

Важно отметить, что химические реактивы вызывают флокуляцию клеток, и при этом большая часть клеточного содержимого переходит в культуральную жидкость [19].

Можно заключить, что отделение биомассы водорослей от культуральной жидкости при помощи центрифугирования, сепарирования, сложно, энергоемко, а при использовании химических реактивов резко снижается качество продукции. Поэтому поиск эффективного способа осаждения клеток из суспензии остается актуальной проблемой [19].

После осаждения клеток полученный концентрат необходимо подвергнуть предварительной обработке, направленной на повышение эффективности последующего извлечения липидов. Предварительная обработка может быть выполнена в одну либо в несколько стадий. Суть обработки заключается в дезинтеграции клеточных оболочек водорослей с целью обеспечения доступа растворителя во внутреннее пространство клетки на стадии экстракции липидов.

При подборе методов дезинтеграции следует учитывать структуру клеточных оболочек, их механические и биохимические характеристики (сопротивление нагрузению, деформации, разрушению; формообразование и т.д.).

Виды и методы дезинтеграции, применяемые в биотехнологии, представлены на рис. 26 [40].

1. При использовании физических методов на клетку оказывается воздействие физического поля (гидродинамического, акустического и т.д.), приводящее к разрушению клеточной стенки. При баллистическом воздействии разрушение клеточной оболочки происходит при непосредственном механическом контакте мелющих тел и клеток в шаровых мельницах. Недостатком способа является энергоемкость оборудования.

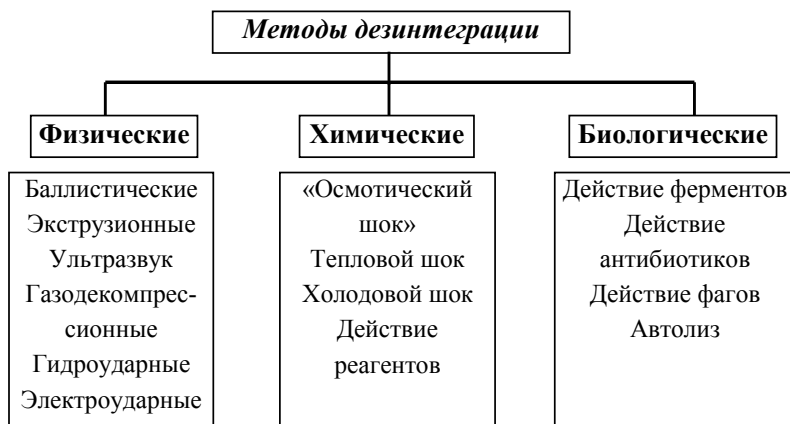


Рис. 26. Классификация методов разрушения клеточных оболочек

При воздействии СВЧ-излучения, осуществляется взаимодействие с полярными молекулами внутри клетки, в результате чего молекулы, вращаясь относительно своей оси, вызывают значительное межмолекулярное трение, приводящее к вскипанию внутриклеточной воды и разрыву клеточной оболочки. При ультразвуковом воздействии разрыв клетки происходит в результате возникающих кавитационных явлений внутри клетки. Этот метод пока применим преимущественно в лабораторной практике. При экструзионном методе, реализуемом с помощью инжекторных сопел и гомогенизаторов, суспензия клеток продавливается через узкие отверстия под высоким давлением в камеры низкого давления, в результате чего возникают сдвиговые напряжения, приводящие к разрыву клетки. При сушке клеток возникающий дегидратационный шок приводит к появлению разрывов и трещин в клетке, а сами клетки погибают.

2. При использовании химических методов на клетку оказывается воздействие химических веществ. При «осмотическом шоке» разрыв клеточной оболочки происходит под давлением воды, проникающей внутрь клетки при резком изменении осмотического давления из-за повышения (снижения) концентрации соли или сахара в окружающей среде. Наибольшую эффективность осмотический шок проявляет при дезинтеграции клеток с малопрочной и проницаемой клеточной оболочкой. При автоклавировании реализуется принцип «теплового шока» – нагревание среды насыщенным паром с давлением 1,1...2,0 атм и температурой 119...127 °С в специальных аппаратах – автоклавах. Белки клеток коагулируют и теряют свои функциональные свойства, липиды, входящие в состав клеточной стенки, окисляются, утрачивают свою структурообразующую функцию, после чего клеточная стенка становится проницаемой. Применение химических реагентов предполагает воздействие щелочей, кислот, солей, детергентов, хелатных агентов и органических растворителей. Эти реагенты, воздействуя на клеточную оболочку, вызывают денатурацию и коагуляцию белков, окисление компонентов клеточной стенки, разрушение мембранной структуры. Недостатком метода является воздействие реагентов на другие клеточные структуры, что вызывает загрязнение или разрушение целевого продукта и стоков.

3. При использовании биологических методов на клетку оказывается воздействие биологическими веществами. При ферментном лизисе осуществляется обработка суспензии клеток гидролитическими ферментами или ферментными комплексами, разрушающими связи между веществами клеточной стенки. Это очень эффективный и быстрый способ, но его применение ограничено лабораторными условиями из-за высокой стоимости ферментных препаратов. При воздействии антибиотиков реализуются различные механизмы разрушения [60]. Например, воздействие антибиотиков на ферменты клеточной стенки – транспептидазу и карбоксипептидазу приводит к их связыванию, в результате чего клетка теряет способность к образованию новых стенок, за счет поперечных сшивок между ферментами пептидогликана микроорганизм гибнет. Антибиотики могут угнетать начальную стадию синтеза белка за счет образования ковалентной связи с большими субъединицами рибосом и ингибирования связывания т-РНК с иницирующим экзоном м-РНК. Антибиотики могут приводить к нарушению синтеза нуклеиновых кислот за счет связывания активных центров антибиотиков с активными центрами РНК-полимеразы, что приводит к блокировке синтеза РНК. Также при воздействии активного центра антибиотиков с липидами цитоплазматической мембраны в ней образуются повреждения – поры.

Таким образом, для переработки биомассы микроводорослей перспективными являются комплексные методы, включающие комбинацию механического воздействия, теплового шока и ферментативного гидролиза биомассы.

3.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БИОМАССЫ

Для проведения эксперимента взят штамм *Chlorella vulgaris*, который культивировался в лабораторном фотобиореакторе объемом два литра на стандартной среде Таммийя [61] при температуре суспензии $28(\pm 3)$ °С, уровне рН = 6,2...8,0, круглосуточном освещении со световым потоком 1650 Лм. При этом аэрация осуществлялась воздушной смесью с содержани-

ем углекислого газа 0,04%. Посевной материал составлял 20% от общего объема суспензии (с концентрацией 1 млн кл./мл).

На первом этапе эксперимента осаждение проводилось следующими реагентами: уксусной кислотой, щелочью, гашеной известью, хлоридом калия, перманганатом калия, алюмокалиевыми квасцами.

В шесть колб Эрленмейера отбирали по 250 см³ суспензии. Эффективность осаждения оценивали по величине оптической плотности суспензии, взятой из средней части объема суспензии до и после выдержки в растворах солей, кислот и щелочей. Оптическая плотность суспензии перед добавлением реактивов составляла $A_0 = 1,661$. Измерение оптической плотности производилось на электрофотокориметре КФК 03-01. Степень осаждения S определялась по формуле

$$S = (A_0 - A)/A_0 \cdot 100\%, \quad (16)$$

где A – оптическая плотность после центрифугирования.

В первой колбе произведено разведение уксусной кислотой до $pH = 3$, во второй колбе – разведение щелочью до $pH = 12$, в третьей колбе – гашеной известью массой 0,15 г, в четвертой – хлоридом калия массой 3 г, в пятой – 0,2 н раствором $KMnO_4$ объемом 2 см³, в шестой – алюмокалиевыми квасцами массой 0,5 г. Выдержка образцов производилась в течение 24 часов. Результаты представлены в табл. 5.

По результатам данного этапа эксперимента можно сделать вывод, что данные химические вещества значительно снижают качество биомассы и имеют низкую эффективность при осаждении клеток в суспензии. Для полного осаждения клеток в технологическую схему при использовании данных методов осаждения необходимо вводить дополнительную стадию осаждения (центрифугирование, сепарирование).

На втором этапе эксперимента исследовались коагулирующие способности различных химических веществ и флокулянта *Flopat FO 4550 SH*. Для каждой соли было приготовлено по четыре образца объемом 10 мл. Количество внесенных для коагуляции реактивов представлено в приложении табл. III. Контроль осуществляли путем измерения оптической плотности через 24 ч.

5. Влияние химических реактивов на эффективность концентрирования биомассы

Добавляемое вещество	До эксперимента, A_0	После эксперимента, A	Описание изменений	Степень осаждения, %
Хлорид калия	1,661	0,517	Осадок темно-зеленого цвета (3 мм), надосадочная жидкость светло-зеленая, мутная, на поверхности хлопья	68,87
Щелочь	1,661	0,774	Осадок темно-зеленого цвета (2 мм), надосадочная жидкость мутно-зеленая, границы раздела фаз нет, на поверхности слой слипшихся клеток биомассы (12 мм) (общий слой жидкости 80 мм)	53,4
Уксусная кислота	1,661	0,751	Осадок темно-зеленого цвета (1 мм), надосадочная жидкость буро-зеленая, границы раздела фаз нет, наблюдается выделение газа (общий слой жидкости 75 мм)	54,8
Гашеная известь	1,661	0,621	Осадок зеленого цвета (2 мм), надосадочная жидкость мутная, нет четкой границы раздела фаз, наблюдается образование хлопьев на поверхности (общий слой жидкости 55 мм)	62,6

Продолжение табл. 5

Добавляемое вещество	До эксперимента, A_0	После эксперимента, A	Описание изменений	Степень осаждения, %
Перманганат калия (0,2н)	1,661	0,521	Осадок темно-зеленого цвета (4 мм), надосадочная жидкость светлая, четкой границы раздела фаз нет (общий слой жидкости 77 мм)	68,6
Квасцы (0,5 г на 250 мл)	1,661	0,517	Осадок зеленого цвета (3 мм), надосадочная жидкость мутно-зеленая, на поверхности наблюдается образование скоагулированной биомассы	68,87

Через 24 часа максимальная степень осаждения (87%) наблюдалась при добавлении катионного флокулянта *Flopat FO 4550 SH* с концентрацией 6 г/л. Остальные химические реагенты вызвали резкое ухудшение качества биомассы или не оказывали существенного влияния на осаждение клеток.

На следующем этапе эксперимента определялась жизнеспособность клеток биомассы, которая была сконцентрирована катионным флокулянтом *Flopat 4550 SH*. Биомасса окрашивалась красителем метиленовым синим в течение 10 минут, а затем микроскопировалась при увеличении $\times 1000$.

Как видно из рис. 27, большинство клеток биомассы окрасились, то есть клеточная стенка микроводорослей стала проницаема для внешних агентов, что говорит об утрате клетками жизнеспособности и об изменении биохимического состава, что является серьезным недостатком.

На четвертом этапе эксперимента осаждение биомассы проводилось под действием центробежных сил при частоте 3000 об/мин. Результаты представлены в табл. 6.

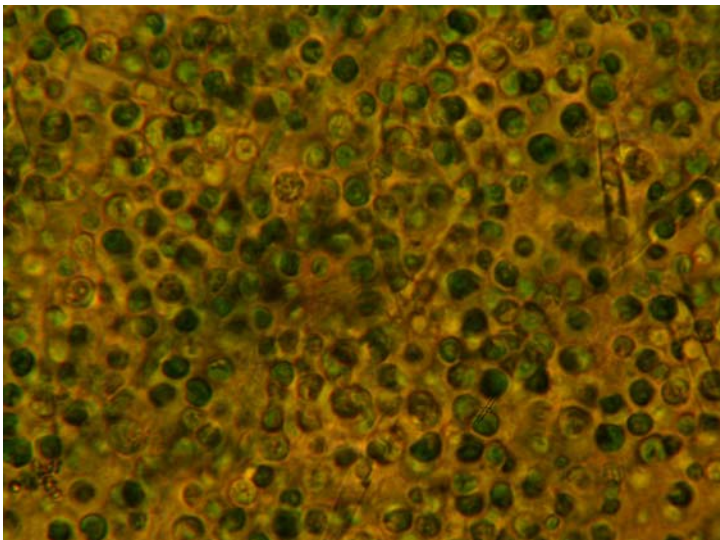


Рис. 27. Микроскопия сконцентрированной биомассы клеток *Chlorella vulgaris* ($\times 1000$) с помощью катионного флокулянта *Flopat 4550 SH*

При визуальном осмотре сконцентрированная биомасса не имела признаков порчи, поэтому возникла необходимость проверить жизнеспособность клеток биомассы.

6. Влияние времени обработки на эффективность концентрирования биомассы

Параметры	Длительность центрифугирования, мин				
	3	4	5	8	10
A_0	0,626	0,626	0,626	0,626	0,644
A	0,112	0,143	0,178	0,101	0,049
C_0 , млн кл./мл	8,5	8,5	8,5	8,5	9
C , млн кл./мл	1,5	1	0,5	0,2	0,01
S , %	82,4	88,2	94,1	97,6	99,8

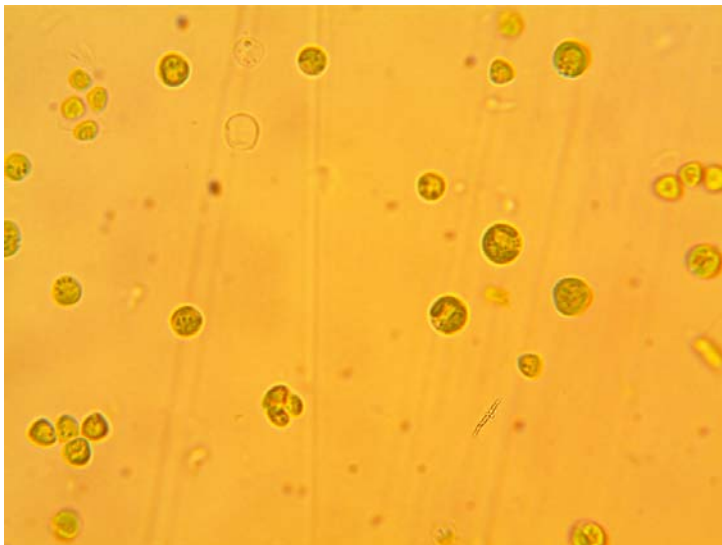


Рис. 28. Микроскопия сконцентрированной биомассы клеток *Chlorella vulgaris* ($\times 1000$)

Биомасса окрашивалась красителем метиленовым синим в течение 10 минут, а затем микроскопировалась при увеличении $\times 1000$. Как видно из рис. 28, клетки биомассы не поменяли цвет, что свидетельствует о том, что клетки являются жизнеспособными и не изменили свой биохимический состав.

По результатам эксперимента можно сделать следующий вывод: осаждение биомассы под действием центробежных сил является наиболее эффективным (осаждение до 99,8% от исходного количества) способом осаждения жизнеспособных клеток.

4. ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКЦИИ ЛИПИДОВ ИЗ БИОМАССЫ

4.1. ОБЗОР СПОСОБОВ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ БИОМАССЫ

Экстракция липидов из клеток микроводорослей – это процесс, который характеризуется высокими затратами энергии, что сильно затрудняет использование биомассы микроводорослей в качестве сырья для производства широкого спектра продуктов в промышленном масштабе [62]. Экстракцию липидов биомассы микроводорослей можно разделить на экстракцию из влажной биомассы (при которой извлечение целевого продукта затруднено наличием культуральной жидкости, что приводит к невысокому выходу продукта в процессе экстракции), а также экстракцию липидов из сухой биомассы микроводорослей, недостатком которой являются высокие затраты энергии на сушку биомассы.

Метод экстракции с использованием смеси хлороформ/метанол (1/1 об./об.) разработан в 1951 году Фолчем и другими и является быстрым и эффективным [4]. Хлороформ, однако, обладает высокой токсичностью, и его использование нежелательно. По этой причине его эффективность при экстракции липидов из биомассы микроводорослей все еще нуждается в дальнейшей оценке. Также используется смесь с соотношением метанола и хлороформа 2:1 (об./об.) – метод Блайя и Дайера. В качестве замены хлороформа используют дихлорметан в соотношении метанол-дихлорметан 1:2 (об./об.) – метод Чена.

Смесь растворителей с низкой токсичностью гексан/изопропанол 3:2 (об./об.) предложена в качестве замены смеси хлороформ/метанол [4]. После двухфазного разделения, легкая органическая фаза (гексан с некоторым количеством изопропанола) содержит большую часть липидов (нейтральных и полярных), а нижняя водная фаза (вода с некоторым количеством изопропанола) содержит белки и углеводы.

Чистый спирт (например, бутанол, изопропанол и этанол) является дешевым летучим экстрагентом и способен образовывать водородные связи с белково-липидными комплексами мембран из-за своей полярной природы. Однако, его полярная природа также является недостатком, поскольку ограничивает взаимодействие с автономными глобулами нейтральных липидов. По этой причине при его использовании в качестве растворителя, при экстракции липидов микроводорослей, алкоголь почти всегда используют в сочетании с неполярным органическим растворителем, таким как гексан или хлороформ, для обеспечения общей экстракции обеих форм нейтральных липидов (как автономных шариков, так и как мембранно-ассоциированных комплексов).

Экстракция по Сокслету – метод, который позволяет полностью извлечь все липиды, представленные в клетках микроводорослей, в результате чего достигается 100% извлечения. Благодаря циркуляции растворителя в экстракторе за счет испарения и конденсации, клетки биомассы взаимодействуют со свежим органическим растворителем в следствии чего поддерживается наибольшая движущая сила, при этом минимизируется расход растворителя.

Ли и другие в своем исследовании [63] изучали влияние предварительного разрушения клеток биомассы на эффективность процесса экстракции липидов микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Смесь хлороформ-метанол 1:1 (об./об.) использовали в качестве экстракционного растворителя. Рассматривались следующие методы разрушения клеток: автоклавирование, гомогенизирование в шариковой мельнице, обработка СВЧ-излучением, обработка ультразвуком, создание «осмотического шока»). В результате было установлено, что СВЧ-излучение (2450 МГц в течение 5 мин) позволяет извлечь максимальное количество липидов 10% (масс.).

В работе [64] Рускеbosch E. и другие исследовали целесообразность предварительного разрушения клеток биомассы следующими методами: 1) трехкратное замораживание-размораживание в жидком азоте; 2) гомогенизация в среде ме-

таноло с помощью шариковой мельницы в течение 30 с при частоте 60 Гц; 3) обработка ультразвуком в течение 15 мин после в среде метанола, хлороформа и воды.

В качестве экстрагентов использовали следующие составы: хлороформ-метанол 1:1 (об/об); хлороформ-метанол 2:1 (об/об); дихлорметан-этанол 1:1 (об/об); гексан-изопропанол 3:2 (об/об); метил-трет-бутиловый эфир-метанол 10:3 (об/об).

Также проверялось, действительно ли эндогенные липазы вызывают липолиз и необходима ли их дезактивация до экстракции. Был исследован эффект добавления изопропанола (для дезактивации липазы) к *Chlorella vulgaris* на общее содержание липидов и их вид.

Смесь хлороформ-метанол с соотношением 1:1 (об./об.) позволяла извлечь наибольшее количество липидов – 22% (масс.), а с соотношением 2:1 (об./об.) – 17% (масс.).

Далее было выяснено, что нет необходимости в дезактивации эндогенных липаз. Это объясняется тем, что липазы уже частично дезактивированы при обезвоживании во время лиофилизации [64].

Для *Chlorella vulgaris* количество экстрагированных липидов после разрушения клеточных стенок было в 1,1 раза выше по сравнению с экстракцией из неразрушенных клеток биомассы.

В исследовании, проведенном Celine Dejoye Tanzi и другими [65], в качестве экстракционных растворителей использовались терпены – природные растворители с уникальными техническими и химическими свойствами.

Выход липидов, получаемых из микроводорослей при использовании двух различных растворителей, составил 0,88% и 0,91% для н-гексана и α -пинена соответственно. D-лимонен и пара-кумол дают те же результаты. Извлеченная масса липидов была в 1,4 раза выше при использовании терпенов в качестве экстрагентов по сравнению с н-гексаном. Этот эффект уже отмечен в работе Лю и других [66] и может быть связан с более полярной природой терпенов по сравнению с н-гексаном.

По результатам данного исследования можно сделать вывод, что терпены могут рассматриваться в качестве альтер-

нативы органическим растворителям для извлечения липидов из биомассы микроводорослей, так как количественный и качественный состав жирных кислот практически не отличался.

В исследовании Glacio S. Araujo и других [67] изучены пять методов экстракции липидов из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*: Блайя и Дайера, Чэна, Фолча, Хара и Радина, и Сокслета. Во всех случаях клеточные стенки разрушались с помощью обработки биомассы ультразвуком (40 кГц). Метод Блай-Дайера с использованием ультразвука для разрушения клеток позволил извлечь наибольшее (52,5% масс.) количество липидов.

В работе Fangfang Yang и других [62] предложен новый способ с использованием этанола для извлечения липидов из влажной биомассы микроводоросли *Picochlorum Sp.* при нормальных условиях. Экстракцию проводили с помощью этанола, отделяли биомассу и использовали, как корм для сельскохозяйственных животных, а в мисцеллу добавляли гексан, где растворяются неполярные липиды. Результаты показали, что время экстракции и температура, а также отношение растворителя к биомассе оказывали влияние на эффективность экстракции липидов. При экстракции из влажной биомассы при R = 5:1 в течение 37 мин при слабом перемешивании и комнатной температуре выход липидов составил 33% от сухого веса. Выход при экстракции был сопоставим с результатами полученными при использовании метода Блай-Дайера.

Alessandro Concas и другие [68] исследовали возможность разрушения клеточных стенок с помощью реакции Фентона. При использовании для разрушения клеток раствора, содержащего 0,5 моль/л H_2O_2 и 0,024 моль/л $FeSO_4$ в течение трех минут наблюдалось максимальное количество извлеченных липидов равное 17,4%, что в 2,5 раза больше, чем при экстракции без дезинтеграции клеток. Когда время разрушения превышало три минуты, наблюдалось уменьшение извлекаемых липидов, в результате перекисного окисления липидов.

Antonio Zuorro и другие [69] исследовали возможность применения ферментного комплекса (состоящего из galactomannanase, 1.4 β -cellobiosidase и β -глюкозидаза) для увеличения выхода

при экстракции липидов из клеток *Nannochloropsis sp.* Выход липидов 70% от присутствующих в клетке липидов наблюдался при следующих условиях обработки: время обработки – 90 мин, масса вносимого ферментного комплекса – $1,3 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$, $\text{pH} = 5$, $T = 36 \text{ }^\circ\text{C}$.

Hyеon-Soo Cho и другие [70] изучали влияние ферментативного гидролиза на выход экстракции липидов из микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Клеточная стенка микроводорослей была гидролизована с помощью целлюлаз, липиды были извлечены с помощью органических растворителей – гексан, метанол и хлороформ. Установлено, что для достижения максимального выхода 85,3% через 72 часа необходимо поддерживать $\text{pH} = 4,8$ и $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$. После ферментативного гидролиза, выход липидов при экстракции органическими растворителями увеличился в 1,29 – 1,73 раза по сравнению с выходом при экстракции без разрушения клеток.

Клячко-Гурвич Г. Л. и другие [71] разработали быстрый микрометод извлечения нативных липидов из биомассы *Chlorella vulgaris*. Влажную биомассу обрабатывали в дезинтеграторе со стеклянными бусами и одновременно проводили экстракцию с использованием смеси растворителей изопропанол-хлороформ (1:1). Выход липидов составил 99% от общего количества находившихся в клетке.

Chattip Prommuak и другие [72] изучали влияние ультразвука и СВЧ-излучения на выход липидов из биомассы *Chlorella vulgaris*. Результаты этого исследования показали, что смесь хлороформа и метанола в соотношении 2:1 (об./об.) позволяет извлечь наибольшее количество общих липидов из водорослей 38,9%. Максимальное извлечение липидов в этом исследовании (82% от общего количества липидов в клетке) наблюдалось при разрушении клеток с помощью СВЧ-излучения (мощность аппарата 300 Вт) при температуре экстракции $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

В патенте [73] описаны методы и способы для прямой переэтерификации и экстракции липидов в производстве биотоплива. В качестве экстрагента предлагалось использовать смесь, по крайней мере, из одной жидкости с полярными ковалентными молекулами и одной ионной жидкости. Массовое отно-

шение жидкости с полярными ковалентными молекулами к общей ионной жидкости может быть 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50, 1:10, 1:5 или 1:1. В качестве жидкости с полярными ковалентными молекулами могут быть использованы: диметилсульфоксид, карбоновая кислота, амид, спирт, кетон, алкилгалогенид, сложный эфир и амин. Ионная жидкость представляет собой смесь катионов и анионов (например, соль), в котором размеры катиона и аниона существенно различаются.

В патенте [74] описана система и способ для экстракции липидов различной полярности из маслянистого материала, в том числе биомассы водорослей. Экстракция липидов из влажной биомассы проводится экстрагентами различной полярности с использованием ряда мембранных фильтров. Преимуществом данного способа является отсутствие сушки и дезинтеграции клеточных оболочек. Экстракция и фракционирование могут быть выполнены в одну стадию с последующей мембранной очисткой. Мембрана может быть сделана из следующих материалов: полиэфирсульфон (PES), полиамид (PA), поливинилидендифторид (ПВДФ), полиимид (PI) и полиакрилонитрил (PAN); водорастворимый растворитель может быть представлен спиртом.

В патенте [75] описывается одношаговый процесс лизиса стенок клеток микроводорослей с использованием гидрофильной ионной жидкости, 1-бутил-3-метилимидазолия и отделения клеточных липидов. Гидрофильная ионная жидкость разрушает клеточные стенки и образует две несмешивающиеся фазы, одна из которых состоит из липидов. После смешивания гидрофильной ионной жидкости с суспензией клеток микроводорослей, гидрофобная фаза липидов, из-за действия силы тяжести оказывается сверху, где она удаляется из смеси и очищается. Гидрофильную ионную жидкость возвращают для лизирования новых клеток из суспензий микроводорослей.

Способ извлечения липидов из суспензии микроводорослей, включает стадии: а) смешивание некоторого количества указанной суспензии клеток микроводорослей с хлоридом 1-бутил-3-метилимидазолия при температуре между 100 °С и 140 °С в течение времени, достаточного для того, чтобы раз-

рушить клетки микроводорослей для получения лизата; б) выдержка лизата в течение некоторого времени, достаточного для того, чтобы вода испарилась из лизата и получение гидрофильной фазы, содержащей хлорид 1-бутил-3-метилимидазолия и липидной фазы, не смешивающейся с гидрофильной фазой, липидная фаза имеет более низкую плотность, чем гидрофильная фаза; в) отделение липидной фазы от гидрофильной фазы для получения липидного экстракта из клеток микроводорослей.

В патенте [76] описываются способы и устройства для обработки водорослей в которых гидрофильная ионная жидкость используется для лизиса клеток водорослей при более низких температурах, чем в других существующих методах обработки водорослей. В качестве агента разделения употребляется соль или раствор соли, также этот агент удаляет воду из ионной жидкости, что позволяет ее эксплуатировать повторно. Соль может быть высушена или концентрирована и повторно использована. Сравнительно низкие температуры лизиса и обработки ионной жидкости и соли уменьшают воздействие на клетки при обработке водорослей. Обычно лизис клеток и извлечение с помощью химических средств предполагает наличие двух несмешивающихся фаз: один растворитель является гидрофильным для растворения растворимых в воде молекул из лизата, другой растворитель – гидрофобный, чтобы растворить клеточные мембраны и липофильные молекулы из клеточного лизата. Клетки и ионная жидкость смешивают в течение времени, достаточного для получения клеточного лизата. Лизис выполняют при температуре от 25...105 °С. Реактор для лизиса может содержать резервуар с перемешивающим устройством для смешивания клеток и ионной жидкости и/или трубку, в которой смешивание клеток водорослей и ионной жидкости достигается путем турбулентного потока. Разрушенные клетки передаются в разделительную камеру, в которой образуются два несмешивающиеся слоя жидкости: гидрофильный слой, содержащий ионную жидкость и растворенные гидрофильные компоненты лизата, такие как крахмал и водорастворимые белки, углеводы, глицерин, и метаболиты, и гидро-

фобный слой, содержащий липидные компоненты из клеточно-го лизата, таких как триглицериды, жирные кислоты, убихинон и жирорастворимые метаболиты. Гидрофобный слой обычно имеет более низкую плотность и меньший объем, чем гидрофильный слой. Два слоя могут быть отделены с помощью центрифугирования. Верхний, гидрофобный липидный слой удаляется из разделенного клеточного лизата и обрабатывается. Водный раствор может содержать белки, углеводы и другие компоненты клеток, которые осаждаются ступенчатым добавлением соли. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что ряд гидрофильных ионных жидкостей лизируют клетки водорослей в температурном интервале от 20 до 105 °С. Способность разрушать водоросли при более низких температурах уменьшает количество энергии, необходимой для обработки клеток водорослей и снижает или предотвращает их термическое разложение. Например, 1-этил-3-метилимидазолия ацетат, 1-этил-3-метилимидазолия хлорид, хлорид 1-бутил-3-метилимидазолия, хлорид 1-гексил-3-метилимидазолия и 1-гексил-3-метилимидазолия йодид полностью лизируют клетки суспензии *Chlorella vulgaris*, имеющую концентрацию ниже, чем 20% (масс.) в течение 60 минут при внесении в соотношении 20:1 (об.) ионной жидкости к навеске микроводорослей.

В патенте [77] описывается процесс выделения липидов из биомассы водорослей для производства биотоплива, который состоит из двух этапов: 1) разрушение клеток водорослей; 2) выделение липидов из разрушенных клеток. Разрушение клеток осуществлялось с помощью ультразвукового устройства, которое использует низкие энергетические звуковые волны, имеющие максимальную частоту 2 МГц.

Fajardo и другие [78] изучали кинетику экстракции липидов из биомассы клеток микроводорослей. Во время 24-часовой экстракции большинство липидов извлекалось в течение первых 8 ч (60...70% всех экстрагируемых липидов). Сделан вывод, что увеличение времени экстракции более чем на 12 ч, не улучшает общий выход липидов.

Важными факторами при экстракции липидов из биомассы микроводорослей являются: соотношение органического растворителя (мл) и высушенной биомассы (г) микроводорослей R . Соответствующее значение R для каждого штамма микроводорослей варьируется в зависимости от содержания липидов и внутреннего взаимодействия растворителя и клетки. Важно найти оптимальное значение R для конкретного штамма микроводоросли. При этом выявлена следующая тенденция: при увеличении соотношения R наблюдается чрезмерное потребление органического растворителя, в то время как его снижение приводит к повышенным энергозатратам при извлечении экстрагента и неполной экстракции. Температура экстракции также сильно влияет на выход липидов. Увеличение температуры от 30 до 60 °С приводит к повышению скорости экстракции липидов из тканей животных [4]. Однако рост температуры после 70 °С приводит к окислительной деградации термолабильных компонентов, что приводит к снижению выхода липидов.

Brian McConnell и другие [79] исследовали возможность замены гексана, как экстрагента, на гептан, который менее опасен, а также определяли кинетику процесса экстракции липидов гексаном и гептаном при разных R . Установлено, что при $R = 5:1$ максимальный выход липидов для гексана равен 2,75% (масс.), для гептана – 1,8% (масс.). При $R = 30:1$ максимальный выход липидов для гексана равен 3,90% (масс.), для гептана – 2,61% (масс.). Сделан вывод, что для конкретной R экстракция гептаном быстрее, но при экстракции гексаном достигается больший выход липидов.

4.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ ЛИПИДОВ ИЗ БИОМАССЫ

При осуществлении экспериментальных исследований была использована биомасса *Chlorella vulgaris*, которая выращивалась в фотобиореакторе объемом 2 л с использованием среды Тамийя OPTIMUM при температуре 30 °С, уровне освещенности 14 клк в течение 8 суток до достижения стационарной стадии роста, затем создавались стрессовые условия куль-

тивирования (дефицит азотсодержащих веществ) в течение 6–7 суток [61]. Концентрирование биомассы до влажности 95...98% осуществлялось с помощью центрифуги при скорости вращения 3000 об./мин в течение 5 минут. Разрушение клеточных стенок в экспериментах осуществлялось с помощью следующих способов обработки:

1) смесью ферментов Целлолюкс А – Протосубтилин г3х в соотношении 12 мг/мл – 4 мг/мл и выдержки 10 минут при температуре 55 °С;

2) раствором амоксициллина концентрацией 0,5% (масс.);

3) СВЧ-излучением (мощность 700 Вт, частота 280 МГц, время обработки 30 с);

4) вихревым слоем ферромагнитных частиц ($m = 3,85$ г) в электромагнитном поле (АВС), время обработки 15 с, величина магнитной индукции вращающегося электромагнитного поля – 0,13 Тл, скорость вращения поля – 30 с^{-1} , магнитный момент $8,635 \cdot 10^{-5} \text{ А} \cdot \text{м}^2$, момент инерции $0,28 \cdot 10^{-8} \text{ кг} \cdot \text{м}^2$, напряженность магнитного поля 398,01 А/м, размеры ферромагнитных частиц $l = 12$ мм, $d = 1$ мм [87, 89];

5) «осмотическим шоком» (добавлением к пасте 15% (масс.) раствора хлорида натрия или сахарозы, а затем, через 24 часа разбавлением биомассы с хлоридом натрия или сахарозой в 20 раз дистиллированной водой).

Определение количества целых клеток до и после воздействия осуществлялось путем прямого подсчета в камере Горяева. Количество клеток утративших жизнеспособность, но сохранивших форму проводилось путем добавления к биомассе красителя метиленового синего и прямого подсчета окрашенных клеток с помощью камеры Горяева. Количество разрушенных клеток находилось как разность количества клеток до и после воздействия.

Экстракция липидов из биомассы микроводорослей с поврежденными клеточными стенками осуществлялась в емкости с магнитной мешалкой (скорость перемешивания 400 об/мин), с помощью мацерации в колбе объемом 250 мл и в аппарате Сокслета.

Отгонка растворителя осуществлялась с помощью ротационного испарителя ИР-1М3 при температуре отгонки 85 °С и скорости вращения колбы 65 об/мин.

Количественное определение извлеченных из биомассы липидов осуществлялось с помощью метода Цоллнера-Кирша для определения общих липидов [83].

Качественное определение липидных веществ проводилось с помощью метода тонкослойной хроматографии [82].

С целью подбора экстрагента, позволяющего извлечь максимальное количество внутриклеточных липидов из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* проводился эксперимент с использованием в качестве экстрагентов неполярных растворителей (нефраса С2 (80/120), петролейного эфира) и полярных растворителей (этанола и изопропанола), а также смесей этанола и петролейного эфира в соотношении 2:1 (об.) и 1:1 (об.). Результаты эксперимента представлены на рис. 29.

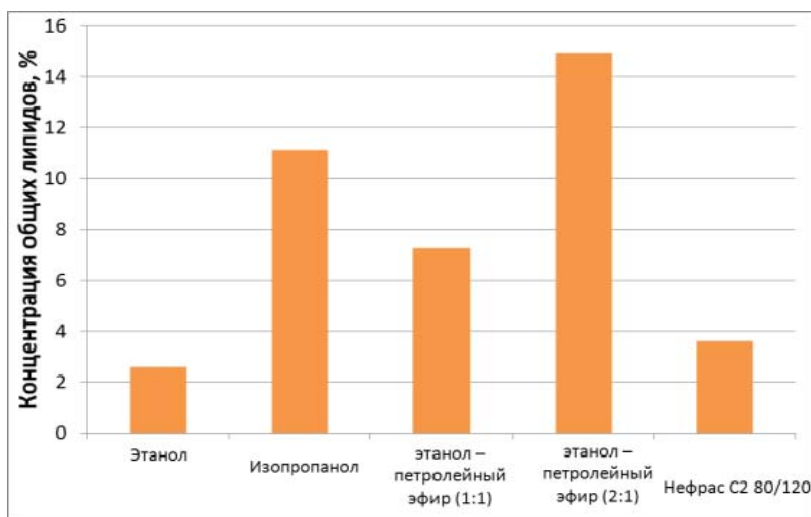


Рис. 29. Зависимость выхода липидов от типа экстрагента

По результатам эксперимента можно сделать вывод, что наибольший выход липидов 14,9% от сухого вещества биомассы наблюдается при использовании в качестве экстрагента смеси этанол – петролейный эфир 2:1 (об.). Данный результат можно объяснить тем, что некоторые нейтральные липиды находятся в цитоплазме не только в виде липидных глобул, но и в качестве комплексов с полярными липидами. Эти комплексы тесно соединены водородными связями с белками клеточной мембраны. Ван-дер-Ваальсово взаимодействие, возникающее между неполярным органическим растворителем и нейтральными липидами, которые находятся в составе белково-липидных комплексов, является недостаточным для того, чтобы разрушить взаимодействие между липидами и белками. С другой стороны, полярный органический растворитель (такой как этанол, изопропанол и др.) способен нарушить липидно-белковые ассоциации путем образования водородных связей с полярными липидами, находящимися в комплексе. Однако, вместе с нейтральными липидами, находящимися в клетках в виде глобул и входящих в состав мембранно-ассоциированных комплексов, экстрагентами извлекаются и полярные липиды (фосфолипиды и гликолипиды).

С целью подбора соотношения экстрагента и биомассы для максимального извлечения внутриклеточных липидов из биомассы *Chlorella vulgaris* проведен эксперимент с разными соотношениями *R* биомассы (г) с остаточной влажностью 5% и смеси экстрагентов (мл) (этанол – петролейный эфир в соотношении 2 : 1 (об.)).

Результаты эксперимента представлены на рис. 30.

По результатам эксперимента можно сделать вывод, что наибольший выход липидов 28% от сухого вещества биомассы при экстракции наблюдается при соотношении *R* смеси из расчета 1 г биомассы на 200 мл смеси экстрагентов. Этот результат можно объяснить тем, что большее количество экстрагента позволяет образовать большее количество Ван-дер-ваальсовых

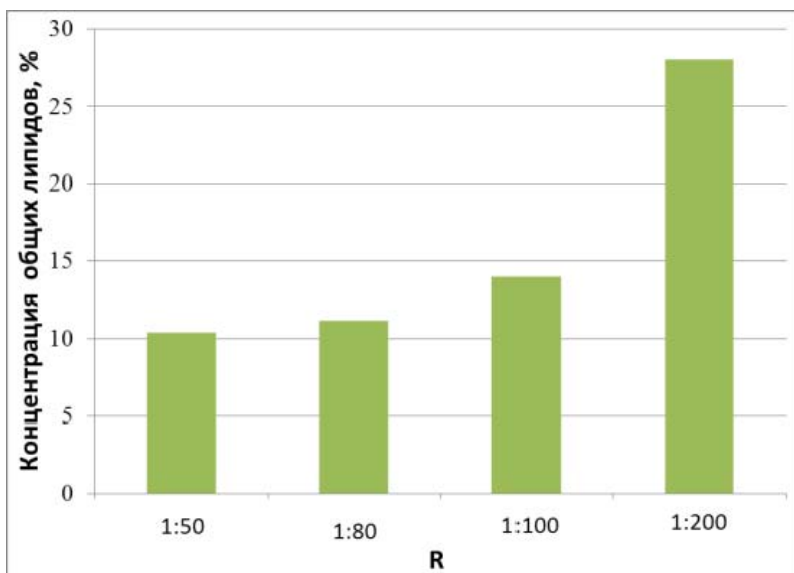


Рис. 30. Зависимость выхода липидов от соотношения R экстрагента и биомассы

(неполярный экстрагент) и водородных связей (полярный экстрагент) с полярными и неполярными липидами, образование большего числа комплексов липид-экстрагент позволяет извлечь большее количество липидов.

С целью подбора температуры экстракции, позволяющей извлечь максимальное количество липидов из биомассы *Chlorella vulgaris*, проведен эксперимент по экстракции липидов смесью этанол – петролейный эфир в соотношении 2 : 1 (об.), соотношение R смеси экстрагента и биомассы 1 г : 100 мл, при температурах 25...67 °С. Результаты эксперимента представлены на рис. 31.

Наибольший выход липидов 26% от сухого вещества биомассы наблюдался при температуре экстракции 47 °С, что можно объяснить тем, что при повышении температуры выше

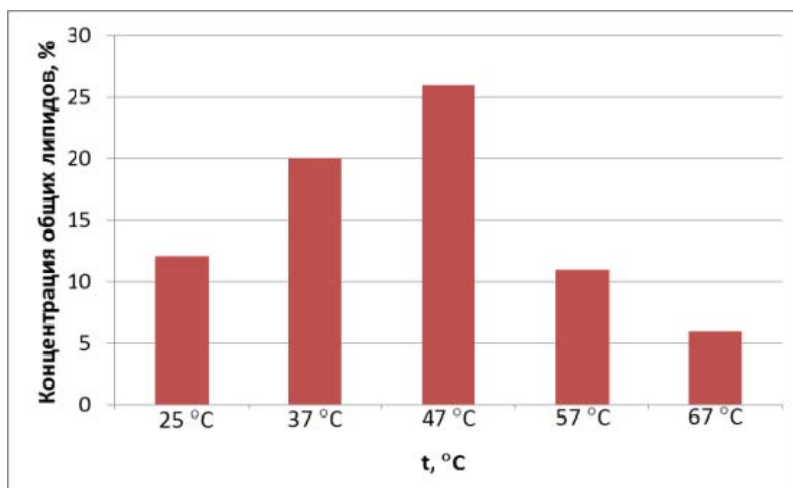


Рис. 31. Зависимость количества липидов от температуры экстракции

55 °C происходит разрушение термолабильных компонентов клетки, в частности, термолабильных антиоксидантов и жирных кислот с относительно длинными цепями и/или высоким уровнем ненасыщенности. Тепловая обработка стимулирует активацию окислительных реакций за счет снижения содержания термолабильных антиоксидантов, а также из-за образования феофитина из хлорофилла; при этом ионы магния в молекуле хлорофилла замещаются двумя молекулами водорода, которые поступают в цитоплазму в виде кислот клеточного сока из вакуолей, которые разрушаются при повышении температуры. Ионы магния и меди являются примерами сильных проокислителей, способствующих более быстрому окислению липидов, а поэтому и меньшей их стабильности.

С целью подбора наилучшего способа разрушения клеточной стенки штаммов микроводорослей *Chlorella vulgaris* проводился эксперимент с пастой микроводорослей влажностью 98%.

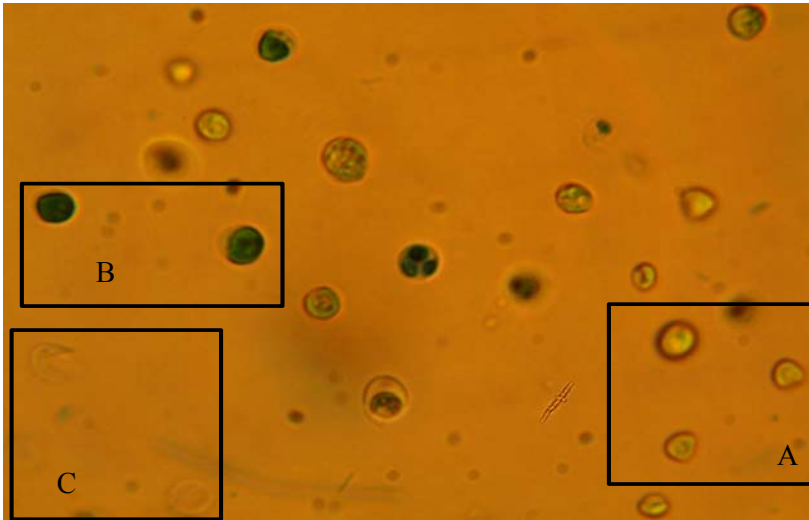


Рис. 32. Микроскопия клеток *Chlorella vulgaris* после воздействия повреждающего фактора

Клеточная стенка у зрелой клетки *Chlorella vulgaris* имеет два слоя [84]: первый слой – трехслойная оболочка, которая состоит из спорополленина, второй слой состоит из маннозы и хитина. Наличие такой крепкой клеточной стенки позволило одной части клеток после воздействия разрушающего фактора остаться целыми (рис. 32, сектор А), другой части клеток утратить жизнеспособность, но сохранить свою форму, при этом пропускать вещества (экстрагент или краситель) из внешней среды (рис. 32, сектор В) и третья часть клеток разрушилась (рис. 32, сектор С).

Результаты микроскопии по определению количества разрушенных клеток, погибших клеток, но сохранивших свою структуру и целых клеток, представлены на рис. 33 – 39 и в табл. 9.

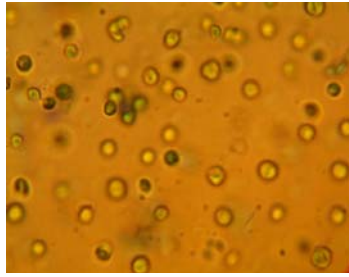
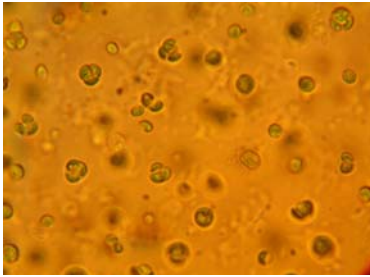


Рис. 33. Клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* без разрушения:

a – без красителя; *б* – с красителем

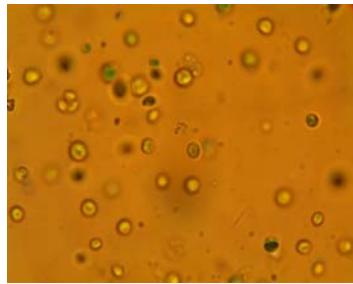
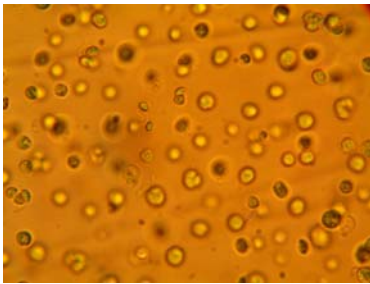


Рис. 34. Клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* после разрушения при воздействии антибиотика:

a – без красителя; *б* – с красителем

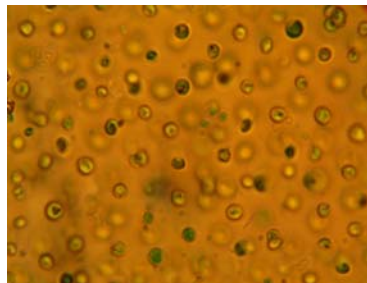
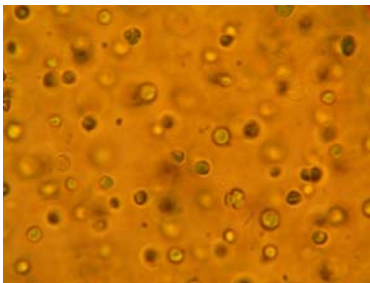


Рис. 35. Клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* после разрушения при воздействии ферментов:

a – без красителя; *б* – с красителем

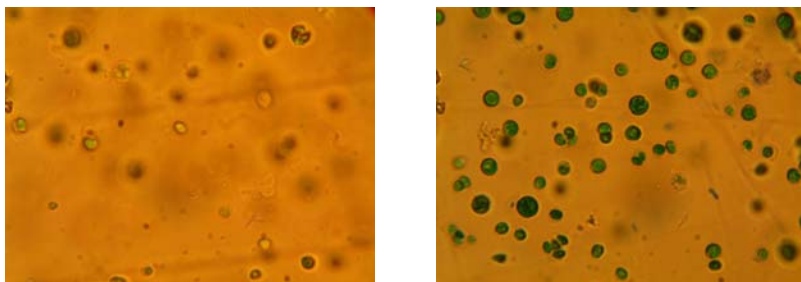


Рис. 36. Клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* после разрушения с помощью СВЧ – излучения
a – без красителя; *б* – с красителем

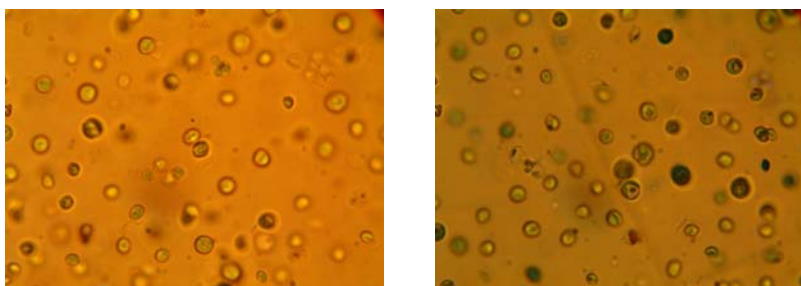


Рис. 37. Клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* после разрушения в аппарате с вихревым слоем ферромагнитных частиц:
a – без красителя; *б* – с красителем

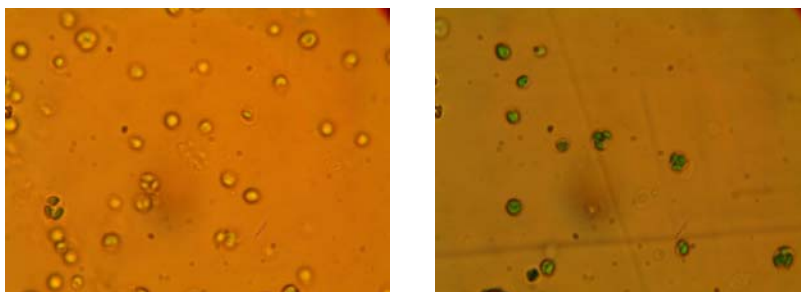


Рис. 38. Клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* после разрушения с помощью хлорида натрия (15%):
a – без красителя; *б* – с красителем

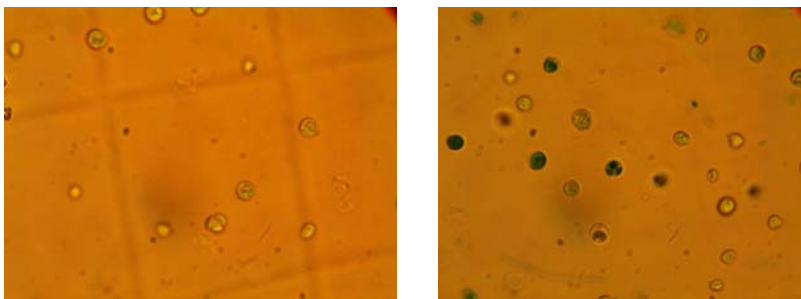


Рис. 39. Клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris* после разрушения с помощью раствора сахарозы (15%):
a – без красителя; *б* – с красителем

По результатам измерений наименьшее количество клеток осталось целыми при обработке биомассы СВЧ-излучением (табл. 7), поэтому можно сделать вывод, что это наиболее эффективный способ разрушения клеточных стенок *Chlorella vulgaris*.

7. Сравнительный анализ эффективности способов разрушения

Метод	Целые клетки, %	Клетки, утратившие жизнеспособность, но сохранившие форму, %	Разрушенные клетки, %
Антибиотик	88,6	5,4	6,0
Ферменты	81,0	10,0	9,0
СВЧ-излучение	7,7	43,8	48,5
Обработка в АВС	79,0	12,0	9,0
«Осмотический шок» раствор хлорида натрия	76,1	17,9	6,0
«Осмотический шок» раствор сахарозы	85,5	9,5	5,0

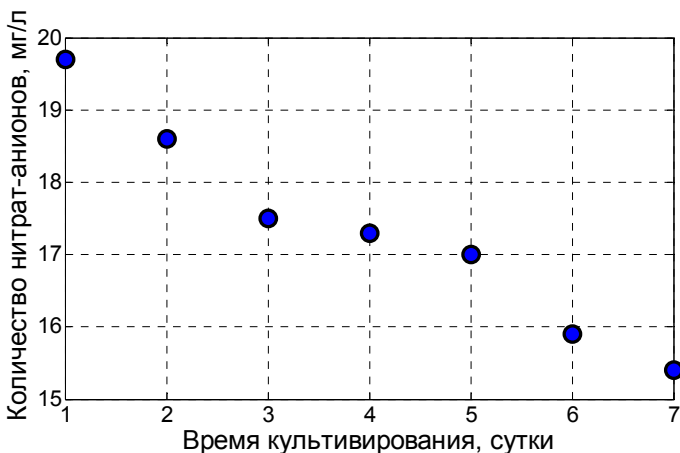


Рис. 40. Динамика убыли нитрат-анионов в суспензии микроводорослей

Это подтверждается дальнейшей экстракцией липидов из биомассы *Chlorella vulgaris* с клетками, разрушенными различными способами. Для данного эксперимента взята биомасса, выращиваемая в стрессовых условиях (дефицит азотсодержащих веществ) в течение трех суток (рис. 40).

Затем исходная биомасса с концентрацией 60 млн кл./мл концентрировалась с помощью центрифугирования и определялось содержание сухих веществ, которое составило 3,5% (масс.).

Полученная биомасса с содержанием сухих веществ подвергалась воздействию различных факторов, вызывающих дезинтеграцию клеточных стенок, после чего каждый вид полученной биомассы высушивался при температуре 50 °С.

После этого к высушенной биомассе добавляли смесь экстрагентов: этанол-петролейный эфир 2:1 (об.), экстракция проводилась настаиванием в течение 24 часов. Через 24 часа экстрагент с извлеченными веществами отфильтровывался от биомассы, полученные экстракты подвергались анализу. На первом этапе проводился анализ по качественному определению липидов в экстракте с помощью метода тонкослойной хроматографии (рис. 41).



Рис. 41. Трек экстракта из биомассы, обработанной СВЧ-излучением

По результатам обработки трека получена хроматограмма, представленная на рис. 42. При анализе данной хроматограммы можно выделить пик при $R_f = 0,30 \dots 0,35$, который соответствует триглицеридам. Таким образом, показано, что в экстракте присутствует целевой продукт.

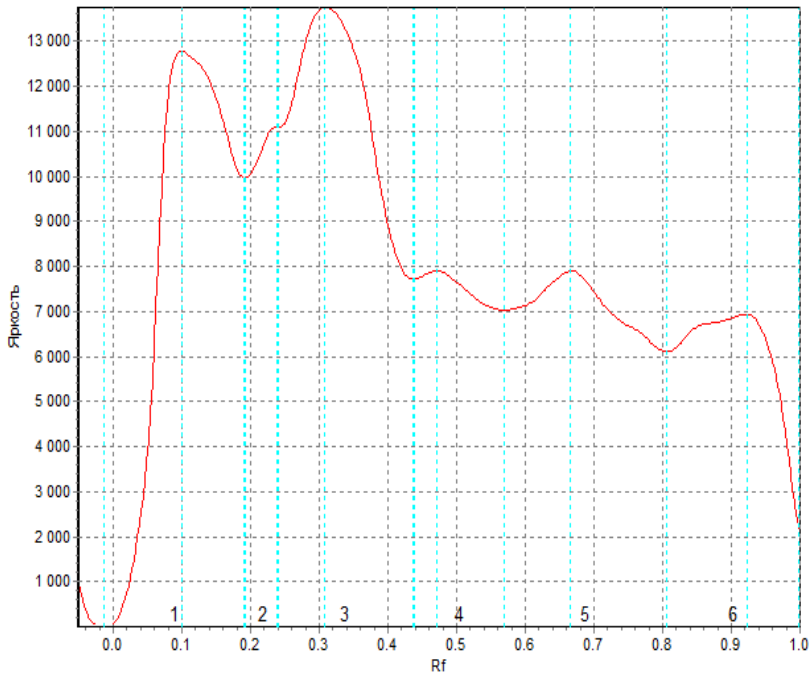


Рис. 42. Хроматограмма экстракта из биомассы, обработанной СВЧ-излучением

8. Результаты анализа экстракта с помощью метода тонкослойной хроматографии

Пик	Фактор удерживания Rf	Описание
1	0,1	Стерины
2	0,24	Кофермент Q
3	0,31	Триглицериды
4	0,47	Витамин К
5	0,67	Метилвые эфиры жирных кислот
6	0,92	Сквален

При разрушении клеточных стенок с помощью СВЧ-излучения в экстракте были обнаружены вещества, представленные в табл. 8.

Количественное содержание в экстрактах липидов определялось с помощью метода Цоллнера–Кирша (рис. 43).

По результатам эксперимента можно сделать вывод, что наибольший выход липидов наблюдался при разрушении клеточных стенок с помощью СВЧ-излучения и обработке вихревым слоем ферромагнитных частиц в электромагнитном поле (табл. 9).

С целью исследования влияния комплексного воздействия (двух способов разрушения) на клеточную стенку при экстракции липидов из биомассы штамма *Chlorella vulgaris* влажностью 90% был спланирован и осуществлен эксперимент по схеме, представленной в табл. 10.

Из табл. 10 видно, что наибольший выход общих липидов (22,9%) наблюдался при комплексном воздействии на клеточные стенки *Chlorella vulgaris* 0,5% раствора антибиотика и СВЧ-излучения при экстракции петролевым эфиром и этанолом 1 : 2 (об.).

9. Результаты по экстракции липидов в зависимости от способа разрушения клеток *Chlorella vulgaris*

Метод разрушения	Выход липидов, %
Антибиотик	10,0
Ферменты	9,0
СВЧ-излучение	15,0
АВС	15,0
«Осмотический шок»	7,0

10. Результаты экстракции липидов при комплексном разрушении клеток биомассы

Метод	Chlorella vulgaris ИФР № С-111					
	1	2	3	4	5	6
«Осмотический шок» с NaCl	+	+	-	-	-	-
«Осмотический шок» с сахарозой	-	-	+	+	-	-
Антибиотик	-	-	-	-	+	+
Обработка в АВС	+	-	+	-	+	-
СВЧ-излучение	-	+	-	+	-	+
Выход липидов, %	19,6	20,1	15,3	17,7	17,9	22,9

Для определения кинетики экстракции липидов из биомассы микроводорослей проведен эксперимент по извлечению липидов с использованием смеси экстрагентов этанол-петролейный эфир 2 : 1 (об.), $R = 1 \text{ г} : 200 \text{ мл}$ в колбе объемом 250 мл настаиванием в аппарате Сокслета и в аппарате с мешалкой.

Экстракция липидов из биомассы микроводорослей в колбе объемом 250 мл настаиванием осуществлялась следующим образом: в колбу помещался патрон с биомассой и добавлялась смесь экстрагентов; каждые 30 минут проводился отбор проб по 3 мл; определение содержания общих липидов в экстракте осуществлялось по методу Цоллнера–Кирша.

Кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей мацерацией представлена на рис. 43.

Из анализа рис. 43 видно, что время экстракции, позволяющее извлечь максимальное количество общих липидов составило 180 мин. Далее была изучена кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей в аппарате Сокслета (рис. 44).

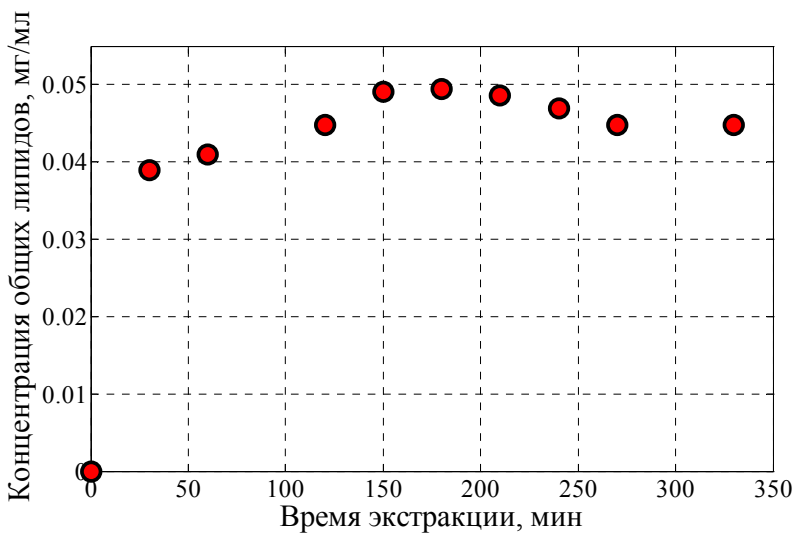


Рис. 43. Кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей мацерацией

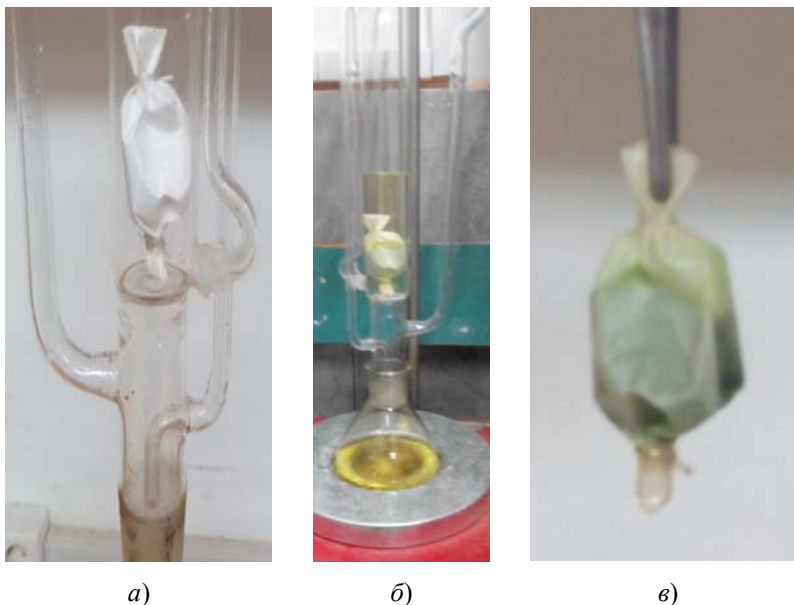


Рис. 44. Экстракция в аппарате Сокслета:

а – патрон с биомассой; *б* – общий вид;
в – патрон с биомассой после экстракции

Методика эксперимента заключалась в следующем: в экстрактор Сокслета помещался патрон с биомассой и добавлялась смесь экстрагентов: этанол – петролейный эфир в соотношении 2 : 1 (об.); каждые 30 минут проводился отбор проб по 3 мл; содержание общих липидов в экстракте определялось по методу Цоллнера–Кирша. Кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей в аппарате Сокслета представлена на рис. 45.

По результатам эксперимента можно сделать вывод, что время экстракции, позволяющее извлечь максимальное количество общих липидов, составило 150 мин.

На следующем этапе эксперимента определялась кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей в экстракторе с мешалкой. Для эксперимента взято 60 мл суспензии штамма *Chlorella vulgaris* влажностью 98,8%.

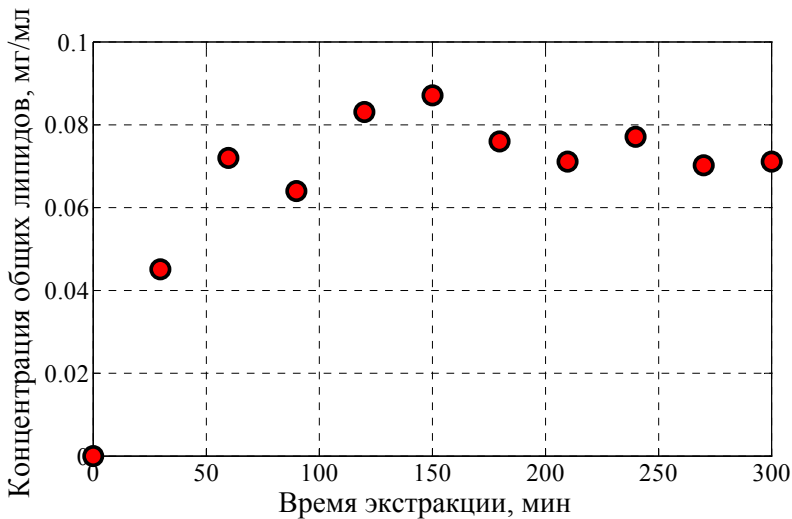


Рис. 45. Кинетика экстракции липидов из биомассы в аппарате Сокслета

Биомассу обрабатывали в СВЧ-генераторе (280 МГц, $\tau = 30$ с, $t_{\text{нач}} = 23,5$ °С, $t_{\text{кон}} = 42$ °С). Для экстракции использовалась смесь экстрагентов этанол и петролейный эфир (2:1 (об.)), $R = 280:1$, скорость перемешивания составляла 2 м/с, температура экстракции 30 °С. Отбор проб производился по следующей схеме: первый час каждые 15 мин, затем каждые полчаса. Стандарт, необходимый для анализа общих липидов по методу Цоллнера–Кирша, содержал 1 мг/мл. Кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей в экстракторе с мешалкой представлена на рис. 46.

По результатам эксперимента можно сделать вывод, что стационарная фаза экстракции наступает приблизительно через 150 мин.

Обобщенные данные по всем трем видам экстракции липидов из биомассы микроводорослей представлены в табл. 11 и на рис. 47.

При анализе полученных результатов можно сделать вывод, что экстракция с перемешиванием позволяет к 150 мин

достичь стационарной фазы и извлечь в 2,5 раза больше липидов по сравнению с экстракцией по Сокслету и в 4,8 раза больше липидов по сравнению с мацерацией.

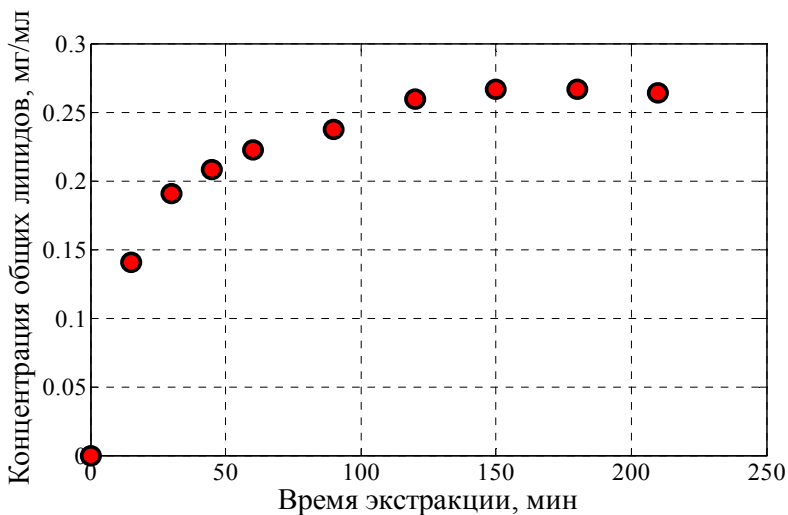


Рис. 46. Кинетика экстракции липидов из биомассы микроводорослей в экстракторе с мешалкой

11. Обобщенные результаты эксперимента по определению кинетики экстракции липидов

Метод экстракции	Сокслет	Перемешивание	Мацерация
Влажность биомассы, %	5	98,8	5
СВЧ-излучение	–	+	–
Температура, °С	40	30	26
Скорость перемешивания, м/с	–	2	–
Выход на стационарную фазу, мин	150	150	180
Выход липидов, %	5	15	3

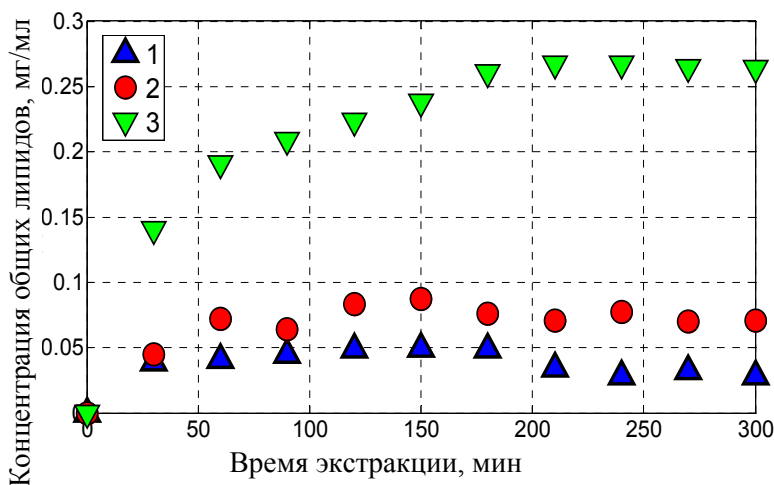


Рис. 47. Кинетика экстракции липидов из биомассы

Chlorella vulgaris:

1 – мацерация; 2 – экстракция по Соклету;

3 – экстракция с перемешиванием

В результате всех проведенных исследований по экстракции липидов из биомассы микроводорослей установлено, что наибольший выход липидов наблюдается при комплексном воздействии на биомассу *Chlorella vulgaris* (с влажностью 95%) антибиотиком и СВЧ-излучением. При этом температура биомассы в процессе воздействия не должна превышать 50 °С. Установлено, что для максимального извлечения общих липидов необходимо использовать смесь полярного (этанол) и неполярного (петролейный эфир) экстрагентов в соотношении 2:1 (об.). При этом соотношение количества сухой биомассы (г) к количеству смеси экстрагента (мл) должно составлять (1:100)...(1:200), а температура экстракции 45...50 °С. Экспериментально установлено, что время экстракции, в течение которого осуществляется извлечение основной части липидов, составляет ≈150 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В монографии обобщены и проанализированы исследования в области культивирования, осаждения клеток микроводорослей из суспензии, а также экстракции внутриклеточных липидов из микроводорослевой биомассы. По результатам литературно-патентного обзора определены основные проблемы и тенденции развития технологий производства липидов из биомассы микроводорослей.

В результате экспериментальных исследований определен минеральный состав питательной среды, необходимой для достижения максимальной концентрации клеток в суспензии при периодическом культивировании (*среда Тамийя*). Проведено сравнение влияния источников азота на культивирование биомассы на *среде Тамийя*. Проведен сравнительный анализ роста микроводоросли на стандартной и обедненной азотом *средах Тамийя*. Выяснено, что дефицит азота создает стрессовые условия культивирования, которые необходимы для стимулирования накопления липидов в клетках биомассы. По результатам эксперимента можно сделать вывод, что стрессовые условия нужно создавать при достижении стационарной стадии роста биомассы (примерно через 8 суток) путем смены исходной питательной среды на питательную среду с низким содержанием азота. Определены уравнения математической модели, описывающие динамику роста биомассы, экспериментально определены кинетические константы.

По результатам исследования оптимизирован состав питательной *среды Тамийя* с получением новых соотношений минеральных питательных солей – *среда Тамийя OPTIMUM*, на которой прирост биомассы на 14% выше по сравнению со стандартной *средой Тамийя*.

Проанализированы различные способы создания стрессовых условий культивирования клеток биомассы для стимулирования накопления неполярных внутриклеточных липидов.

Установлено, что для накопления липидов в биомассе на 7–8 день по достижении стационарной стадии роста, необходимо создавать стрессовые условия путем снижения содержания азота ниже 100 мг/л в питательной среде, что позволит накопить до 32% липидов от сухого вещества клетки.

Проведены экспериментальные исследования по определению способа концентрирования биомассы с помощью использования химических реактивов, флокулянтов и центрифугирования. По результатам экспериментов сделан вывод, что использование химических реактивов и флокулянтов резко ухудшает качество биомассы из-за гибели клеток и изменения их биохимического состава. Использование центрифугирования при 3000 об./мин в течение 5 – 7 минут позволяет почти полностью (99,8%) осадить клетки биомассы с сохранением их жизнеспособности.

В результате подбора наилучших условий экстракции выяснено, что экстракцию внутриклеточных липидов из биомассы *Chlorella vulgaris* следует проводить смесью полярного и неполярного экстрагентов: этанол-петролейный эфир, взятых в соотношении 2 : 1 (об.), температура экстракции должна быть в пределах 45...50 °С, а соотношение количества сухой биомассы (г) к количеству смеси экстрагента (мл) должно составлять (1 : 100)...(1 : 200). Экспериментально установлено, что время экстракции, в течение которого осуществляется извлечение основной части липидов, составляет ≈150 мин.

Осуществлена сравнительная оценка эффективности способов разрушения клеточных стенок микроводорослей с помощью СВЧ-излучения, «осмотического шока» (растворы хлорида натрия, сахарозы), вихревого слоя ферромагнитных частиц, ферментных препаратов (Целлюлюкс А и Протосубтилин г3х), антибиотика (Амоксициллин). По результатам данного эксперимента сделан вывод, что при воздействии СВЧ-излучения (мощность 700 Вт, частота 280 МГц) через 30 секунд обработки в биомассе 7,7% целых клеток, 43,8%

клеток, утративших жизнеспособность, но сохранивших форму и 48,5% разрушенных клеток. При этом важно, чтобы температура суспензии не поднималась выше 55 °С, для того чтобы не допустить разрушение термолабильных компонентов клетки.

Проведенные исследования по определению наилучшего способа разрушения клеточных стенок позволили сделать вывод, что наибольший выход липидов наблюдался при разрушении клеточных стенок с помощью СВЧ-излучения и обработке вихревым слоем ферромагнитных частиц в электромагнитном поле 15%. При комплексном разрушении клеток (сочетание двух способов) выяснено, что наибольший выход общих липидов (22,9%) наблюдался при комплексном воздействии на клеточные стенки *Chlorella vulgaris* 0,5% раствора антибиотика и СВЧ-излучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Седова, Т. В.** Основы цитологии водорослей / Т. В. Седова – Л. : Наука, 1977. – 172 с.
2. **Gouveia, Luisa.** Microalgae as a Feedstock for Biofuels / Luisa Gouveia. – Springer, 2011. – 69 p.
3. **Швец, В. И.** Фосфолипиды в биотехнологиях / В. И. Швец // Вестник МИТХТ. – 2009. – С. 4 – 25.
4. **Extraction** of oil from microalgae for biodiesel production: a review/ Halim Ronald [et al.] // Biotechnology Advances. – 2012. – Vol. 30. – P. 710 – 731.
5. **Чернова, Н. И.** Эффективность производства биодизеля из микроводорослей / Н. И. Чернова, С. В. Киселева, О. С. Попель // Энергосбережение, новые и возобновляемые источники энергии. – 2014. – С. 14 – 21.
6. **Renewables 2013** Global Status Report (Paris: REN21 Secretariat) [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.ren21.net/REN21Activities/GlobalStatusReport.aspx> (дата обращения: 1.12.2015).
7. **The Oilgae Digest** – Home of Algal Energy [Электронный ресурс]. – Режим доступа : http://www.oilgae.com/ref/report/digest/Oilgae_Digest_Preview- (дата обращения: 1.12.15).
8. **Algae 2020** – V. 2: Global Biofuels, DropIn Fuels, Biochems and Commercial Market Forecasts (2011 Update) [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.emerging-markets.com/algae/> (дата обращения: 1.12.2015).
9. **Чернова, Н. И.** Использование биомассы для производства жидкого топлива: современное состояние и инновации / Н. И. Чернова, Т. П. Коробкова, С. В. Киселева // Теплоэнергетика. – 2010. – № 11. – С. 28 – 35.
10. **Соловченко, А. Е.** Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими / А. Е. Соловченко // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 192 – 202.

11. **Campbell, C. J.** The coming oil crisis / C. J. Campbell // Multi-science Publishing Company and Petroconsultants. – S. A Essex, 1997. – 456 c.

12. **Chisti, Y.** Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // *Biotechnol Adv* 25/ – 2007. – P. 294 – 306.

13. **Huntley, M. E.** CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal / M. E. Huntley, D. G. Redalje // *Mitig Adapt Strat Glob Change*. – 2007. – N 12. – P. 573. – 608.

14. **Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production** / P. M. Schenk, R. Skye, Thomas-Hall [et al.] // *Bioenergy Res* 1. – 2008. – P. 20 – 43.

15. **Li, Y.** Biofuels from microalgae / Y. Li, M. Horsman, CQ. Lan, N. Dubois-Calero // *Biotechnol Prog* 24. – 2008. – P. 815 – 820.

16. **Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor** / L. Rodolfi, GC. Zitelli, N. Bassi [et al.] // *Biotech Bioeng* 102. – 2009. – P. 100 – 112.

17. **Prospects of biodiesel production from microalgae in India** / S. A. Khan, M. Z. Rashmi Hussain, S. Prasad, UC. Banerjee // *Renew Sust Energy Rev* 13. – 2009. – P. 2361 – 2372.

18. **Tamiya, H.** Mass culture of algae / H. Tamiya // *Ann Rev Plant Physiol*. – 1957. – N 8. – C. 309 – 334.

19. **Музафаров, А. М.** Культивирование и применение микроводорослей / А. М. Музафаров, Т. Т. Таубаев – Ташкент : Изд-во «Фан» Узбекской ССР, 1984. – 136 с.

20. **Упитис, В. В.** Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Рига : Зинатне, 1983. – 240 с.

21. **Vonshak, A.** Laboratory techniques for the cultivation of microalgae In: A. Richmond (ed.) / A. Vonshak // *Handbook of microalgal mass culture*. – CRC Press, Boca Raton FL, 1986. – P. 117 – 145.

22. **Ramkumar, K.** Mandalam. Elemental Balancing of Biomass and Medium Composition Enhances Growth Capacity in

High-Density *Chlorella vulgaris* Cultures / K. Mandalam Ramkumar, Bernhard Ø. Palsson // John Wiley & Sons, Inc. – 1998. – P. 605 – 611.

23. **Wijanarko, A.** Effect of the Presence Of Substituted Urea and Also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivied Medium on Chlorella Lipid Content, Progress in Biomass and Bioenergy Production [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.intechopen.com>. (дата обращения 02.12.14).

24. **Held, P.** Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red – Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in *Chlorella Vulgaris* [Электронный ресурс] – Режим доступа : <http://www.biotech.com/resources/articles/nile-red-dye-algal.html> (дата обращения 25.05.15).

25. **Held, P.** Monitoring of Algal Growth Using Their Intrinsic Properties [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.biotech.com/resources/articles/monitoring-of-algal-growth-using-intrinsic-properties.html>. (дата обращения 25.05.15).

26. **Ауджанова, В. К.** Морфологические и систематические характеристики хлореллы. Ее производство и применение / В. К. Ауджанова // Научный вестник. – 2014. – № 1 (1). – С. 113 – 126.

27. **Araujo, S. G.** Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains [Электронный ресурс] / S. G. Araujo. – Режим доступа : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353534> (дата обращения: 1.12.15).

28. **Клячко-Гурвич, Г. Л.** Физиолого-биохимические аспекты направленного получения ценных метаболитов в условиях интенсивной культуры водорослей / Г. Л. Клячко-Гурвич, В. Е. Семененко // Биология автотрофных микроорганизмов. Труды МОИП. – 1966. – Т. XXIV. – С. 154 – 159.

29. Влияние имидазола на обмен жирных кислот при восстановлении клеток хлореллы после азотного голодания / Г. Л. Клячко-Гурвич, Т. С. Рудова, Е. С. Кованова, В. Е. Семененко // Физиология растений. – 1973. – № 20(3). – С. 326 – 331.

30. **Emerson, R.** The photochemical reaction in photosynthesis // R. Emerson, W. J. Arnold // *Gen. Physiol.* – N 16. – 1932. – P. 191 – 205.

31. **Семененко, В. Е.** К вопросу о выращивании Культуры *Chlorella pyrenoidosa* в условиях освещения импульсным светом / В. Е. Семененко, М. Г. Владимирова, М. А. Попова // *Физиология растений.* – 1960. – Т. 7, Вып. 4. — С. 459 – 465.

32. **Effects** of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana* / M. R. Brown, G. A. Dunstan, S. J. Norwood, K. A. Miller // *J Phycol.* – 1996. – N 32. – P. 64 – 73.

33. **Biochemical** composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture / M. R. Brown, S. M. Barrett, J. K. Volkman [et al.] // *Aquaculture* 143. – 1996. – P. 341 – 360.

34. **Khotimchenko, S. V.** Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance / S. V. Khotimchenko, I. M. Yakovleva // *Phytochemistry* 66. – 2005. – P. 73 – 79.

35. **Sukenik, A.** Alterations in lipid molecular species of the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp / A. Sukenik, Y. Yamaguchi, A. Livne // *J Phycol* 29. – 1993. – P. 620 – 626.

36. **Lynch, D. V.** Low temperature-induced alterations in the chloroplast and microsomal membranes of *Dunaliella salina* / D. V. Lynch, G. A. Thompson // *Plant Physiol* 69. – 1982. – P. 1369 – 1375.

37. **Raison, J. K.** Alterations in the physical properties and thermal responses of membrane lipids: correlations with acclimation to chilling and high temperature / J. K. Raison. – In: St Joh JB, Berlin E, Jackson PG (eds) // *Frontiers of membrane research in agriculture.* Rowman and Allanheld, Totowa. – P. 383 – 401.

38. **Богданов, Н. И.** Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных [Электронный ресурс] / Н. И. Богданова – Режим доступа : http://www.хлорелла.рф/up/files/Suspension_of_Chlorella_in_the_diet.pdf (дата обращения 25.05.15).

39. **Kingsland, Sh. E.** Modeling nature: episodes in the history of population ecology / Sh. E. Kingsland. – Chicago : University of Chicago Press, 1995. – 315 p.

40. **Бирюков, В. В.** Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : КолосС, 2004. – 296 с.

41. **Йоргенсен, С. Э.** Управление озерными системами / С. Э. Йоргенсен ; пер. с англ. – М. : Агропромиздат, 1985. – 160 с.

42. **Дьяконов, В. В.** Математические пакеты расширения Матлаб : специальный справочник / В. В. Дьяконов, В. А. Круглов. – СПб. : Изд-во Питер, 2001. – 480 с.

43. **The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of Chlorella** / Y. S. Cheng, Y. Zheng, J. M. Labavitch [et al.] // Process Biochemistry. – 2011. – N 46. – P. 1927 – 1933.

44. **Flocculation of microalgae using cationic starch** / D. Vandamme, I. Foubet, B. Meesschaert, K. Muylaert // J Appl Phycol. – 2010. – N 22. – P. 525 – 530.

45. **Poelman, E.** Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae / E. Poelman, N. De Pauw, B. Jeurissen // Resources, Conservation and Recycling. – 1997// – N 19. – P. 1 – 10.

46. **Lee, A. K.** Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // J Appl Phycol. – 2009. – N 21. – P. 559 – 567.

47. **Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement** / N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquah, A. F. A. Hoadley // Chemical Engineering Journal. – 2010. – N 162. – P. 935 – 940.

48. **A simple and rapid harvesting method for microalgae by in situ magnetic separation** / L. Xu, C. Guo, F. Wang [et al.] // Bioresource Technology. – 2011. – N 102. – P. 10047 – 10051.

49. **Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds** / R. M. Knuckey,

M. R. Brown, R. Robert, D. M. F. Frampton // *Aquacultural Engineering*. – 2006. – N 35. – P. 300 – 313.

50. **Papazi, A.** Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants / A. Papazi, P. Makridis, P. Divanach // *J Appl Phycol.* – 2010. – N 22. – P. 349 – 355.

51. **Effects** of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii* / L. Borges, J. A. Moron-Villarreyes, M. G. Montes D'Oca, P. C. Abreu // *Biomass and Bioenergy*. – 2011. – N 35. – P. 4449 – 4454.

52. **Harvesting** of microalgae by bio-flocculation / S. Salim, R. Bosma, M. H. Vermue, R. H. Wijffels // *J Appl Phycol.* – 2011. – N 23. – P. 849 – 855.

53. **Pittman, J. K.** The potential of sustainable algal biofuel production using waste water resources / J. K. Pittman, A. P. Dean, O. Osundeko // *Bioresource Technology*. – 2011. – N 102. – P. 17 – 25.

54. **Cultivation**, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review / C. Y. Chen, K. L. Yeh, R. Aisyah [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2011. – N 102. – P. 71 – 81.

55. **Yang, Z.** Flocculation properties of biodegradable amphoteric chitosan-based flocculants / Z. Yang, Y. Shang, Y. Lu, Y. Chen [et al.] // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – N 172. – P. 287 – 295.

56. **Surendhiran, D.** Study on Flocculation Efficiency for Harvesting *Nannochloropsis oculata* for Biodiesel Production / D. Surendhiran, M. Vijay // *International Journal of ChemTech Research*. – 2013. – Vol. 5, N. 4. – P. 1761 – 1769.

57. **Electrocoagulation** of marine microalgae / Nyomi Udu-man, Hsueh Lee, Michael K. Danquah, Andrew F. A. Hoadley // Department of Chemical Engineering, Monash University, Wellington Road, Clayton, Victoria 3800. – Australia. – 2011. – 11 p.

58. **Nakamura, H.** Report on the present situation of Microalgae Research institute of Japan / H. Nakamura // *Reports from the*

microalgae Research institute of Japan. – 1961. – Vol. 2, N 1. – P. 1 – 12.

59. **Арутюнян, Н. П.** Культивирование одноклеточных водорослей / Н. П. Арутюнян. – Ереван : Изд-во АН Арм. ССР, 1966. – С. 3 – 86.

60. **Алехин, Е. К.** Как действуют антибиотики / Е. К. Алехин // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 4. – С. 19 – 23.

61. **Dvoretzky, D. S.** Optimization of the Process of Cultivation of Microalgae *Chlorella Vulgaris* Biomass with High Lipid Content for Biofuel Production / D. S. Dvoretzky, S. I. Dvoretzky, E. V. Peshkova // Chemical Engineering Transactions. – 2015. – N 43. – P. 361 – 366.

62. **Yang F.** A Novel Lipid Extraction Method from Wet Microalga *Picochlorum* sp at Room Temperature / F. Yang, W. Xiang, X. Sun // Marine Drugs. – 2014. – N 12. – P. 1258 – 1270.

63. **Comparison** of several methods for effective lipid extraction from microalgae / Lee Jae-Yon [et al.] // Bioresource Technology. – 2010. – Vol. 101. – P. 575 – 577.

64. **Optimization** of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae / E. Ryckeboosch [et al.] // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2012. – Vol. 89. – P. 189 – 198.

65. **Terpenes** as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae / D. T. Céline [et al.] // Molecules. – 2012. – Vol. 17. – P. 8196 – 8205.

66. **Mamidipally, P. K.** First approach on rice bran oil extraction using limonene / P. K. Mamidipally, S. X. Liu // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2004. – N 106. – P. 122 – 125.

67. **Extraction** of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method / S. Araujo Glacio, J. B. L. Leonardo Matos, Jader O. Fernandes [et al.] // Ultrasonics Sonochemistry. – 2013. – Vol. 20 (1). – P. 95 – 98.

68. **Concas, A.** Microalgal Cell Disruption Through Fenton Reaction: Experiments, Modeling and Remarks on its Effect on the Extracted Lipids Composition / A. Concas, M. Pisu, G. Cao // Chemical Engineering Journal. – 2015. – Vol. 263. – P. 392 – 401.

69. **Enhanced** Lipid Extraction from Unbroken Microalgal Cells Using Enzymes / A. Zuorro, R. Lavecchia, G. Maffei [et al.] // Chemical engineering transactions. – 2015. – Vol. 43. – P. 211 – 216.

70. **Effects** of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris* / Hyeon-Soo Cho, You-Kwan Oh, Soon-Chul Park [et al.] // Renewable Energy. – 2013. – Vol. 54. – P. 156 – 160.

71. **Клячко-Гурвич, Г. Л.** О количественной экстракции нативных липидов из клеток хлореллы / Г. Л. Клячко-Гурвич, В. Е. Семененко // Физиология растений. – 1978. – № 25[2]. – С. 412 – 417.

72. **Prommuak, C.** Microalgal Lipid Extraction and Evaluation of Single-Step Biodiesel Production / C. Prommuak [et al.] // Engineering Journal. – 2012. – Vol. 16. – P. 157 – 166.

73. **Пат. № 8598378 US 12/404,176.** Methods and compositions for extraction and transesterification of biomass components / Cooney Michael J., Young Gregory ; заявитель и патентообладатель University Of Hawaii. – № 61/036,913 ; заявл. 13.03.09 ; опубл. 17.09.09. – 9 с. : ил.

74. **Пат. № 8524929 US, 13/653,595.** Extraction with fractionation of lipids and proteins from oleaginous material / Aniket Kale, Qiang Hu, Sommerfeld Milton ; заявитель и патентообладатель Arizona Board Of Regents For And On Behalf Of Arizona State University. – № 13/493,586 ; заявл. 17.10.12 ; опубл. 03.09.13. – 3 с. : ил.

75. **Пат. № 8450111 US 12/970,484.** Lipid extraction from microalgae using a single ionic liquid / Di Salvo Roberto, Reich Alton J., Waite Dykes H. H., Jr., Teixeira Rodrigo ; заявитель и патентообладатель Streamline Automation. – № 61/309,439 ; заявл. 16.12.10 ; опубл. 28.05.13. – 5 с. : ил.

76. **Пат. № 8388846 US 13/083,895.** Method and apparatus for lysing and processing algae / Chew Geoffrey, Reich Alton J., Waite Dykes H. H., JR., Di Salvo Roberto ; заявитель и патенто-

обладатель Streamline Automation, Llc. – № 13/493,586 ; заявл. 04.12.11 ; опубл. 05.03.13. – 5 с. : ил.

77. **Пат. № 8476060 US 12/758,480.** Process for separating lipids from a biomass / Chianelli Russell, Hildebrand Calvin, Rodriguez Joaquin ; заявитель и патентообладатель Board Of Regents, The University Of Texas System. – № 61/168,804 ; заявл. 12.04.10 ; опубл. 02.07.13. – 3 с.: ил.

78. **Fajardo, A. R.** Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* / A. R. Fajardo, L. E. Cerdan, A. R. Medina [et al.] // *European Journal of Lipid Science Technology*. – 2007. – N 109. – P. 120 – 125.

79. **McConnell, B.** Kinetics Study of the Solvent Extraction of Lipids from *Chlorella vulgaris* / B. McConnell, I. H. Farag // *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)*. – 2013. – N 1(10). – P. 28 – 38.

80. **Folch, J.** Preparation of lipide extracts from brain tissue / J. Folch, I. Ascoli, M. Lees, J. A. Meath, F. N. Lebaron // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – P. 833 – 41.

81. **Bligh, E. C.** A rapid method of total lipid extraction and purification / E. C. Bligh, W. J. Dyer // *Can J. Biochem. Physiol.* – 1959. – Vol 37. – P. 911 – 917.

82. **Kates, M.** Lipid extraction procedures. Techniques of lipiodology isolation, analysis, and identification of lipids / M. Kates // Elsevier Science Publisher, Amsterdam, the Netherlands. – 1986. – 342 p.

83. **Handel, E. V.** Rapid determination of total lipids in mosquitoes / E. V. Handel // *J. Aru. Mosq. CoNrrol Assoc.* – 1985. – Vol 1, N 3. – P. 302 – 304.

84. **Burczyk, J.** The ultrastructure of the outer wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin / J. Burczyk, M. Hesse // *Plant Systematics and Evolution*. – 1981. – N 138 (1). – P. 121 – 137.

85. **ГОСТ 23268.9–78.** Воды минеральные питьевые лечебные, лечебно-столовые и природные столовые. Методы оп-

ределения нитрат-ионов. – Введ. 1980-01-01. – М. : Изд-во стандартов, 1978. – 12 с.

86. **Потенциал** применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики / К. Н. Сорокина [и др.] // Катализ в промышленности. – 2012. – № 2. – С. 63 – 72.

87. **Пат. 2388812 (13) С1 РФ**, МПК С12N1/12 (2006.01), С12P7/64 (2006.01). Способ извлечения липидов из биомассы / Нагорнов С. А. ; заявитель и патентообладатель ГНУ ВИИТиН. – № 2008137841/13 ; заявл. 22.09.2008 ; опубл. 10.05.2010. [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://bd.patent.su/2388000-2388999/pat/servlet/servletccef.html>. – Загл. с экрана (дата обращения : 1.12.2015).

88. **Нагорнов, С. А.** Исследование процесса получения биодизельного топлива в проточном аппарате с магнитно-вихревым слоем ферромагнитных частиц / С. А. Нагорнов [и др.] // Вестник Тамбовского государственного технического университета. – 2013. – Т. 19, № 2. – С. 316 – 324.

89. **Пат. на полезную модель № 116789 РФ, МПК В 01 F 13/08 (2006.01)**. Аппарат вихревого слоя для производства биодизельного топлива / Акулинин Е. И., Дворецкий Д. С., Дворецкий С. И., Ермаков А. А., Нагорнов С. А. – № 116789 ; опубл. 10.06.2012, Бюл. № 16.

90. **Махлин, П. В.** Ценообразование на российском рынке нефтепродуктов. Проблемы и решения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.budgetrf.ru/Publications/Magazines/VestnikSF/2011/VSF_NEW201110141341/VSF_NEW201110141341_p_005.htm. – Заглавие с экрана (дата обращения : 01.12.15).

91. **International Gasoline Rankings International Fuel Quality Center** [Электронный ресурс]. – Режим доступа : http://www.ifqc.org/NM_Top5.aspx. – Заглавие с экрана (дата обращения: 1.12.2015).

92. **Патент 2460771 РФ, МПК С12N1/12, А23К1/00, А61К8/00**. Способ извлечения биологически активных веществ из биомассы одноклеточной водоросли рода *chlorella* / Березин С. С., Бычков А. Л., Ломовский О. И. – № 2011128468/10 ; заявл. 08.07.11 ; опубл. 10.09.12, Бюл. № 25. – 3 с. : ил.

93. **Halim, R.** Mechanical cell disruption for lipid extraction from microalgal biomass / R. Halim, W. T. Thusitha, L. Dedreia, A. Paul // *Bioresource technology*. Elseiver, USA. – 2013. – N 140. – P. 53 – 63.

94. **Муравьев, И. А.** Технология лекарств / И. А. Муравьев. – М. : Медицина, 1980. – 704 с.

95. **Охапкин, А. Г.** Основы альгологии : учеб. пособие / А. Г. Охапкин. – Нижний Новгород : Изд-во Нижегородского гос. ун-та им. Н. И. Лобачевского, 2010. – 340 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

III. Результаты эксперимента по влиянию химических веществ на коагуляцию клеток биомассы

Вещество	Масса коагулянта, г	0 мин	Сутки	S, %
Контроль	–	0,772	0,708	8
FeSO ₄	0,001	0,772	0,497	36
FeSO ₄	0,004	0,772	0,825	–
FeSO ₄	0,006	0,772	0,639	17
FeSO ₄	0,009	0,772	1,096	–
Контроль	–	0,772	0,708	8
CuSO ₄	0,011	0,772	0,682	12
CuSO ₄	0,019	0,772	1,148	–
CuSO ₄	0,024	0,772	0,870	–
CuSO ₄	0,028	0,772	1,05	–
Контроль	–	0,772	0,708	8
MgSO ₄	0,002	0,772	0,752	3
MgSO ₄	0,005	0,772	0,560	27
MgSO ₄	0,006	0,772	0,635	18
MgSO ₄	0,008	0,772	0,456	41
Контроль	–	0,772	0,708	8
ZnSO ₄	0,004	0,772	0,524	32
ZnSO ₄	0,006	0,772	0,585	24
ZnSO ₄	0,007	0,772	0,94	–
ZnSO ₄	0,009	0,772	0,395	49
Контроль	–	0,278	0,157	43
Al ₂ O ₃	0,001	0,278	0,108	61
Al ₂ O ₃	0,003	0,278	0,115	58
Al ₂ O ₃	0,006	0,278	0,116	60

Продолжение табл. III

Вещество	Масса коагулянта, г	0 мин	Сутки	S, %
Al ₂ O ₃	0,009	0,278	0,082	71
Контроль	–	0,278	0,157	43
Al(OH) ₃	0,001	0,278	0,075	73
Al(OH) ₃	0,003	0,278	0,078	72
Al(OH) ₃	0,006	0,278	0,084	70
Al(OH) ₃	0,009	0,278	0,095	66
Контроль	–	0,278	0,157	43
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,001	0,278	0,086	69
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,003	0,278	0,067	76
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,006	0,278	0,06	78
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0,009	0,278	0,067	76
Контроль	–	0,278	0,157	43
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,001	0,278	0,089	68
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,003	0,278	0,1	64
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,006	0,278	0,077	72
KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,009	0,278	0,149	46
Контроль	–	0,278	0,157	43
K ₃ [Co(NO ₂) ₆]	0,001	0,278	0,154	45
K ₃ [Co(NO ₂) ₆]	0,003	0,278	0,176	37
K ₃ [Co(NO ₂) ₆]	0,006	0,278	0,138	50
K ₃ [Co(NO ₂) ₆]	0,009	0,278	0,254	9
Контроль	–	0,278	0,157	43
Floпам FO 4550 SH	0,001	0,278	0,046	83
Floпам FO 4550 SH	0,003	0,278	0,038	86
Floпам FO 4550 SH	0,006	0,278	0,037	87
Floпам FO 4550 SH	0,009	0,278	0,053	81

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРΟΣЛЕЙ	4
1.1. Морфология, физиология и биохимия микрОВОдо- рослей	4
1.2. Комплексное использование биомассы микрОВОдо- росли <i>Chlorella vulgaris</i>	6
1.3. Перспективы использования биомассы микрОВОдо- рослей как источника сырья для производства энергоно- сителей	9
2. ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДО- РОСЛИ <i>CHLORELLA VULGARIS</i> С ПОВЫШЕННЫМ СО- ДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ	14
2.1. Обзор технологий культивирования микрОВОдо- рослей	14
2.2. Исследование режимов периодического культиви- рования микрОВОдоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	22
2.3. Математическое моделирование процесса роста микрОВОдоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	32
3. ПОДХОДЫ К ПОДГОТОВКЕ БИОМАССЫ МИКРО- ВОДОРΟΣЛЕЙ	45
3.1. Обзор способов концентрирования биомассы и раз- рушения клеточных стенок микрОВОдорослей	45
3.2. Экспериментальное исследование процесса концен- трирования биомассы	50
4. ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКЦИИ ЛИПИДОВ ИЗ БИО- МАССЫ	56
4.1. Обзор способов извлечения липидов из биомассы ..	56
4.2. Экспериментальное исследование процесса экстракции липидов из биомассы	64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	86
ПРИЛОЖЕНИЕ	97
	99

Научное электронное издание

ДВОРЕЦКИЙ Дмитрий Станиславович
ДВОРЕЦКИЙ Станислав Иванович
ТЕМНОВ Михаил Сергеевич
ПЕШКОВА Евгения Владимировна
АКУЛИНИН Евгений Игоревич

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Монография

Редактор З. Г. Чернова
Инженер по компьютерному макетированию И. В. Евсева

Подписано к использованию 14.12.2015.
Тираж 100 экз. Заказ № 560

Издательско-полиграфический центр
ФГБОУ ВПО «ТГТУ»
392000, г. Тамбов, ул. Советская, д. 106, к. 14
Тел. 8(4752) 63-81-08
E-mail: izdatelstvo@admin.tstu.ru

ISBN 978-5-8265-1507-5



9 785826 515075

