Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт биомедицинских систем и биотехнологий
Высшая школа биотехнологий и пищевых производств

На правах рукописи

Трухина Елена Владимировна

Тема научно-квалификационной работы (диссертации)

Разработка биотехнологии получения фотосинтетических пигментов микроводорослей *Chlorella* и их применение в рецептурах мучных изделий

Направление подготовки
19.06.01 Промышленная экология и биотехнологии

Код и наименование

Направленность
19.06.01_02 Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Научный руководитель: д.т.н., профессор
Базарнова Ю.Г.

Санкт-Петербург – 2020

Научно-квалификационная работа выполнена в Высшей школе биотехнологии и пищевых технологий (ВШБиПП) ИБСиБ федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор ВШБиПП	*Базарнова Юлия Генриховна,* *Д.т.н., профессор*
Научный руководитель:	*Базарнова Юлия Генриховна,* *Д.т.н., профессор*
Рецензент:	*Гинак Анатолий Иосифович,* *Д.х.н., профессор,* Кафедра молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский технологический институт (Технический университет)»,

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: http://elib.spbstu.ru

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биологическое разнообразие микроводорослей и разработки в области генной инженерии, выполненные за последнее десятилетие, определили эту группу фототрофных организмов, как один из наиболее многообещающих сырьевых источников для получения новых продуктов. Несмотря на ряд преимуществ использования биомассы микроводорослей в промышленных биотехнологиях, их коммерциализация до сих пор ограничена, в основном, производством кормовых добавок и биодизеля.

Известно, что в условиях низкой инсоляции микроводорослей увеличивается скорость биосинтеза хлорофилла, в то время как высокая инсоляция способствует повышению доли каротиноидов, выполняющих функцию защиты от фотоингибирования.

Известно, что микроводоросли *Chlorella* содержат до 61,6% белков, 12,5% липидов, 13,7% углеводов, а также микроэлементы, витамины B1, B2, B6, C, D, E, K, нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) и различные ферменты и отличаются высоким содержанием хлорофиллов и каротиноидов. В клетках *Chlorella* обнаружены β-, ά- и γ-каротины, лютеин, лютеоксантин, зеоксантин, виолаксантин, неоксантин и неохром, лороксантин, которые локализуются в пластоглобулах или тилакоидных мембранах.

Фотосинтетические пигменты микроводорослей *Chlorella* представляют широкий спектр потенциального применения для замещения синтетических красителей, антиоксидантов, провитамина А в пищевой и фарминдустрии.

Перспективным направлением исследований является разработка биотехнологии направленного культивирования и переработки биомассы микроводорослей *Chlorella* для получения продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Степень разработанности темы исследования. Разработки режимов культивирования микроводорослей, в том числе, модификаций питательных сред и конструктивных особенностей фотобиореакторов являлись предметом исследований многих российских — Артари А.П. (1902), Владимирова М.Г. и др. (2019), Голлербаха М.М. (1951), Музафарова А.М. и др. (1984), Музыченко Л.А., и др. (1978), Becker E.W. (1994), Borowitzka M.A. (1988), Acie´n F.G. et al. (2012), Richmond A. (2001), Pulz O. (2001), Sierra E. et al. (2008).

Анализу состава биомассы водорослей и технологиям выделения ценных веществ из биомассы посвящены работы Бриттона Г. (1986), Иванова Л.А. и др. (2013), Ладыгина В.Г. (2014), Gupta P. et al. (2015), Parisi V. et al. (2008), Rodrıǵuez H. et al. (2000), Boussiba S. et al. (1999), Craft N.E. (1992).

Примеры применения микроводорослей в пищевых технологиях представлены в работах авторов De Marco Estefanía Rodríguez и др. (2014), Gouveia L., Batista A.P. (2017), Pulz O. (2004), Текутьева Л.А. (2016), Мусина О.Н. (2015).

Уже имеется опыт использования *Chlorella* для профилактики железодефицитной анемии, снижения уровня холестерина в крови, обогащения каротиноидами и полиненасыщенными жирными кислотами эмульсионных продуктов.

Сухая биомасса *Chlorella* представляет интерес в качестве универсального и биодоступного для пищеварительных ферментов человека продукта, который может использоваться в составе сыпучих смесей пищевых ингредиентов в любых соотношениях.

В связи с вышесказанным проведение комплексных исследований направленного культивирования микроводорослей *Chlorella* и разработка технологии получения биомассы с высоким содержанием фотосинтетических пигментов для применения в рецептурах пищевых продуктов является актуальным.

Связь работы с научными проектами. Диссертационная работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы» по теме проекта: «Разработка и внедрение инновационных биотехнологий переработки микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и ряски *Lemna minor*» (Соглашение № 14.587.21.0038, от 17 июля 2017 г.) Уникальный идентификатор проекта RFMEFI58717X0038.

Цель работы: разработать биотехнологию получения биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* с высоким содержанием пигментов и рецептуры мучных изделий с добавками биомассы.

Для выполнения поставленной цели решались следующие задачи:

- ✓ на основании обзора отечественной и зарубежной научной и технической литературы изучить проблему направленного культивирования микроводорослей для получения биомассы и ее применения в пищевых технологиях;
- ✓ исследовать влияние режимов культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* на получение биомассы с высоким содержанием фотосинтетических пигментов;
- ✓ изучить кинетические закономерности процесса роста популяции микроводорослей *C. sorokiniana* в исследуемых условиях культивирования;
- ✓ разработать технологию культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* в лабораторном фитобиореакторе, определить химический состав, физико-химические и микробиологические показатели полученной биомассы;
- ✓ изучить спектральные характеристики, фракционный состав и содержание фотосинтетических пигментов в полученной биомассе *C. sorokiniana*;
- ✓ разработать рецептуры макаронных изделий с добавками биомассы микроводорослей *C. sorokiniana*, определить их показатели качества и пищевую ценность;
- ✓ разработать пакет технической документации (ТУ и ТИ) на макаронные изделия с добавками микроводорослей, провести их внедрение в производство.

Научная новизна. Разработаны режимы направленного культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* в лабораторном фотобиореакторе (ФБР) для получения биомассы с высоким содержанием фотосинтетических пигментов. Для достижения максимальной концентрации клеточной суспензии рекомендовано использовать добавки мочевины в питательную среду в количестве 0,015 г/л и режим искусственного освещения лампами дневного (освещенность 2200-2800 Лк) с фотопериодом 12 ч, продолжительность цикла роста популяции — 10 сут. Получены эмпирические уравнения скорости роста популяции *C. sorokiniana* (μ),

которая варьировалась в интервале (0,15-0,26) сут$^{-1}$ в исследуемых условиях культивирования микроводорослей.

Модифицирован метод анализа фракционного состава фотосинтетических пигментов в полученной биомассе *C. sorokiniana* с использованием обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ, Reverse Phase HPLC). Установлено, что содержание хлорофилла *a* в полученной биомассе составляет (9,1 ±1,0), хлорофилла *b* — (8,0 ±0,8), каротиноидов — (12,1±1,2) мг/г сухой биомассы. В биомассе идентифицированы каротиноиды — лютеин (5,4 ± 0,5), фукоксантин (1,4 ± 0,2) и *β*-каротин (0,52 ± 0,05) мг/г сухой биомассы.

Технико-технологические решения способа направленного культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* защищены патентом на изобретение RU 2668162C1 «Способ культивирования микроводоросли *Chlorella*» (2018).

Теоретическая и практическая значимость. Обоснована целесообразность направленного культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana* для получения биомассы с высоким содержанием фотосинтетических пигментов (29,2 ± 2,9) мг/г для применения в пищевых технологиях.

Разработана технология получения биомассы микроводоросли *C. sorokiniana* с высоким содержанием фотосинтетических пигментов и рецептуры макаронных изделий с добавками сухой биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* от 2,5 до 7 %. Показано, что замена муки на добавку сухой биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* в количестве 5 % позволяет обогатить макаронные изделия хлорофиллом (на 34,3%) и каротиноидами (на 23,6%) от их рекомендуемой нормы потребления в сутки.

Разработан комплект технической документации (ТУ и ТИ 10.73.11-022-38524349-2019 «Макаронные изделия, обогащенные хлореллой, с морепродуктами в сливочном соусе»). Проведено внедрение разработанных рецептур на ООО «Аппетипром» (Санкт-Петербург).

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты исследований режимов культивирования на динамику накопления и кинетические закономерности роста биомассы микроводорослей *C. sorokiniana;*
- технология получения биомассы микроводорослей *C. sorokiniana,* химический состав, физико-химические и микробиологические показатели полученной биомассы;
- результаты идентификации и анализа фракционного состава фотосинтетических пигментов в биомассе микроводорослей *C. sorokiniana;*
- рецептуры макаронных изделий с добавками биомассы микроводорослей *C. sorokiniana,* показатели их качества и пищевой ценности.

Степень достоверности результатов работы подтверждается необходимым объемом теоретических и экспериментальных разработок. Научные результаты диссертационной работы обладают высокой степенью достоверности. Экспериментальные данные характеризуются воспроизводимостью и сопоставимостью. В работе использованы высокотехнологичные спектральные и хроматографические методы анализа и математической обработки экспериментальных данных.

Апробация работы. Основные результаты диссертации апробированы на

научно-практических конференциях с международным участием «НЕДЕЛЯ НАУКИ СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2017 и 2018, СПбПУ); «International Scientific Conference Energy Management of Municipal Transportation Facilities and Transport» (Хабаровск, 2017); международной научно-практической конференции «Пищевая и морская биотехнология» (Калининград, 2019, КГТУ), международных SCOPUS-конференциях: «IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (EES)» (Казань, 2018, КГЭУ-СПбПУ) и «International Conference on Efficient Production and Processing» (ICEPP – 2020, СПбПУ Прага, 2020).

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 12 печатных работах, в том числе, — в издании, рекомендованном ВАК РФ для публикаций результатов диссертационных исследований, 5 — в изданиях, индексируемых Scopus, 6 — в иных изданиях. Соискателем получено 2 патента на изобретение в соавторстве.

Структура и объем НКР. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 131 страницах, содержит 26 таблиц и 45 рисунков. Список литературы включает 218 наименования, в том числе, 164 иностранных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность выбранного направления исследований, сформулированы цель и задачи исследований, их новизна, практическая значимость научно-квалификационной работы.

В **главе 1** приведен аналитический обзор литературы по применению биомассы микроводорослей для получения биологически активных веществ, рассмотрены примеры их использования в пищевой и фармацевтической промышленности. Дана оценка биотехнологического потенциала одноклеточных водорослей в качестве сырьевого источника для получения биологически активных веществ. Рассмотрены способы культивирование микроводорослей и факторы получения биомассы с высоким содержанием ценных фитокомпонентов. Представлена информация о классификации, строении одноклеточных водорослей, их составе и физиологической активности компонентов, в том числе, биологически активных липидах, белках и полипептидах, полисахаридах, витаминах, минералах и фотосинтетических пигментах. Приведены сведения о морфологических и физиологических особенностях микроводорослей рода *Chlorella*, рассмотрены различные факторы, оказывающие влияние на метаболические процессы, связанные с биосинтезом ценных фитокомпонентов микроводорослей, в том числе, состав питательных сред, конструкция фотобиореакторов (ФБР), характеристики освещенности. Приведено описание кинетических закономерностей процессов роста биомассы микроводорослей, рассмотрены различные кинетические модели.

В **главе 2** изложены методы и постановка экспериментальных исследований.

В качестве объектов исследования в диссертационной работе использовали:

- культуру одноклеточных водорослей *C. sorokiniana* (штамм 211–8k) из коллекции водорослей университета Гёттингена (Culture Collection of Algae at Göttingen University international acronym SAG);

– биомассу микроводорослей *C. sorokiniana*, полученную путем направленного культивирования в лабораторном ФБР;
– изделия из макаронного теста с добавками биомассы *C. sorokiniana* с высоким содержанием хлорофиллов и каротиноидов.

Предметом исследований являлись режимы направленного культивирования микроводорослей *C. sorokiniana*, способствующие биосинтезу фотосинтетических пигментов, технология получения биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* и методы анализа состава фотосинтетических пигментов, рецептуры изделий из макаронного теста с добавками биомассы *C. sorokiniana*.

Экспериментальные исследования осуществляли на базе Высшей школы биотехнологии и пищевых производств Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого и Institute Environmental Technology and Energy Economics Hamburg University of Technology (TUHH, Гамбург, Германия).

Общая схема проведения исследований приведена на рисунке 1.

Рисунок 1 — Схема проведения исследований

Культивирование микроводорослей осуществляли в лабораторном ФБР с размерными параметрами (0,50 × 0,16) м и объемом 10 л.

В качестве источника искусственного освещения использовали люминесцентные лампы дневного света (ЛДС, освещенность 2200-2800 Лк, Т(К) 400); ИК лампы накаливания (ИК, спектральная область светового потока 3,5-5,0 мкм, освещенность 14100 Лк); ртутную газоразрядную лампу (спектральная область светового потока 320-400 нм, режим освещенности – 3 ч с дальнейшим

использованием ламп дневного света (далее по тексту УФ+ЛДС). Фотопериод составлял 12 ч.

В качестве питательных сред использовали смеси, сбалансированные по содержанию макро- и микроэлементов, приготовленные на водопроводной воде. Состав питательной среды варьировался по содержанию азотсодержащих добавок: NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, CN_2H_4O (мочевина). Используемые азотсодержащие добавки вносили в ФБР в количестве 0,015 г/л. Температура культивирования составляла (26±3) °С; интенсивность аэрации смеси − 1,5 л/мин; режим перемешивания – периодический, 15 мин один раз в сут.

Динамику роста биомассы фиксировали по изменению оптической плотности клеточной суспензии каждые сутки при длине волны λ=750 нм. Концентрацию клеточной суспензии микроводорослей определяли с помощью калибровочного графика. Клетки подсчитывали в гемоцитометре в 5 больших квадратах при отсутствии признаков клеточной флокуляции.

Изменение pH суспензии в ФБР определяли на приборе Mini PH Meter (АКВА-ЛАБ, Россия). Для изучения морфологических характеристик клеток микроводорослей *C. sorokiniana* использовали цифровые изображения препаратов «раздавленная капля» при увеличении не менее чем в 640 раз с помощью цифровой камеры IS-500 (АО «ЛОМО», Санкт-Петербург). Для обработки цифровых изображений использовали программу Микроанализ FOTO (АО «ЛОМО», Санкт-Петербург) и Levenguk (производитель «Levenhuk LabZZ»).

Химический и биохимический состав полученной биомассы исследовали в рамках выполнения работ по проекту «Разработка и внедрение инновационных биотехнологий переработки микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и ряски *Lemna minor*» на базе Institute Environmental Technology and Energy Economics Hamburg University of Technology (TUHH, Гамбург, Германия).

Остаточное содержание металлов (кадмия, свинца, цинка и меди) в полученной биомассе определяли методом инверсионной вольтамперометрии на анализаторе ТА-Lab производства НПП «Томьаналит» (г. Томск) с использованием метода добавок. Санитарно значимые микробиологические показатели воздушно-сухой биомассы определяли согласно требованиям ТР ТС 021/2011.

Для спектрального анализа пигментов использовали предварительную дезинтеграцию клеточной оболочки микроводорослей перед их экстракцией методом гомогенизации на приборе Silent Crusher M (IKA® Werke, T25 Basic) в режиме 10000 об/ мин. в течение 2 мин. Экстракцию пигментов 95,6 %-м этиловым спиртом при воздействии УЗ на устройстве УЗУ-0,25 (ТУ 1-01-0579-79, 220 В, 50 Гц) в течение 10 мин. Количественный состав пигментов в биомассе определяли по содержанию хлорофилла *a* (Ch*a*), хлорофилла *b* (Ch*b*), соотношению Ch*a*/Ch*b* и сумме каротиноидов на спектрофотометре UVmini-1240 (SHIMADZU CORPORATION Analyticaldivision), используя характеристические полосы поглощения пигментов в области 440, 649 и 664 нм.

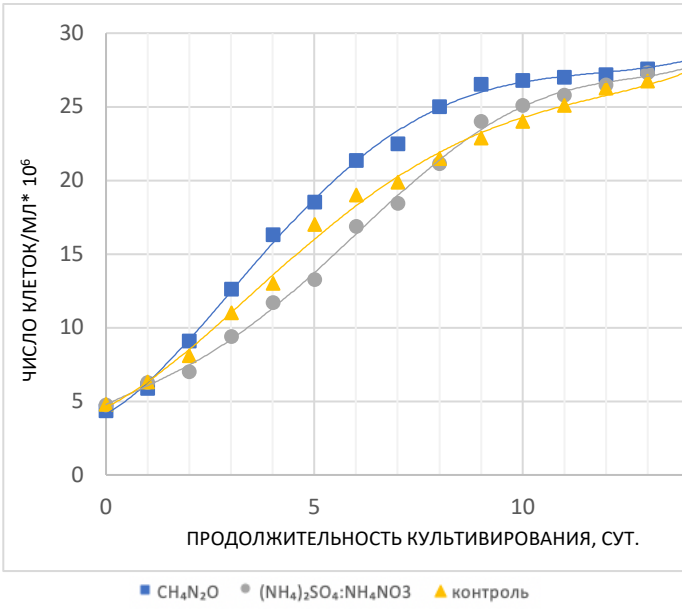
Для разделения и идентификации пигментов использовали метод препаративной хроматографии в тонком слое (ТСХ) на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-В и Silufol «MERCK» и жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ ВЭЖХ, Reverse Phase HPLC).

Для приготовления теста для макаронных изделий использовали коммерческую муку из твердых сортов пшеницы (производитель Molino Grassi S.p.A.). При разработке рецептур макаронных изделий с добавками биомассы микроводорослей определяли органолептические показатели макаронных изделий после кулинарной обработки согласно ГОСТ 31986 и ГОСТ 31743, увеличение массы и объема изделий при варке, сохранность формы изделий, потери белковых веществ и хлорофилла общепринятыми методами, а также пищевую ценность макаронных изделий расчетным методом.

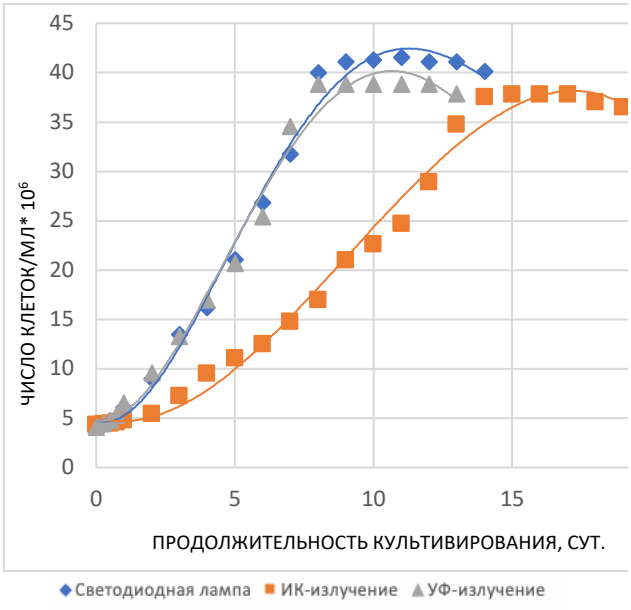
При выполнении статистической обработки экспериментальных данных и построении эмпирических моделей использовали метод наименьших квадратов для случая равноточных измерений. Графические зависимости представлены после статистической обработки с использованием метода наименьших квадратов, реализованного в Microsoft Excel. Степень достоверности экспериментальных результатов подтверждается их троекратной повтореностью и воспроизводимостью полученных данных. При выполнении расчетов эмпирических коэффициентов и удельной скорости роста биомассы использовали программные ресурсы (пакет Mathcad).

Глава 3. Направленное культивирование микроводорослей *C. Sorokiniana*. Известно, что пигментные комплексы микроводорослей содержат различное количество хлорофиллов, которое зависит от условий культивирования. При недостатке железа, калия, магния и азота содержание хлорофилла в микроводорослях снижается.

На рисунке 2 приведены кривые культивирования популяции микроводоросли *C. sorokiniana*, полученные в условиях использования азотсодержащих добавок в питательную среду (рисунок 2, а) и в различных условиях освещенности клеточной суспензии (рисунок 2, б).



а)

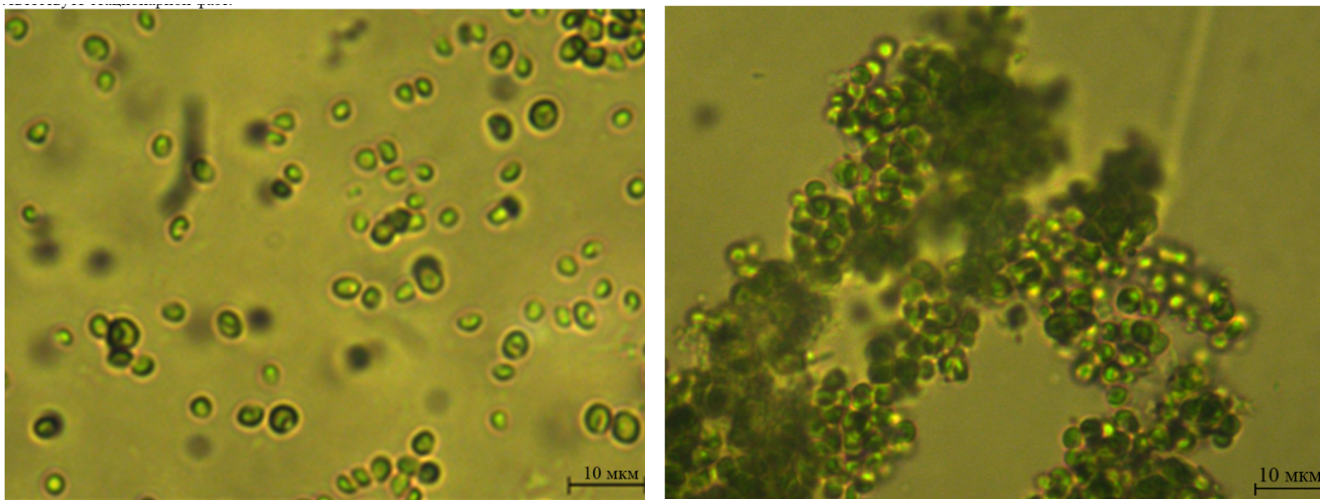


б)

Рисунок 2 — Кривые культивирования популяции микроводоросли *C. sorokiniana*: а) в условиях использования азотсодержащих добавок; б) в различных условиях освещенности

Установлено, что максимальная концентрация клеточной суспезии достигается на 10 сут культивирования при внесении добавок мочевины в питательную среду (рисунок 2, а) в режиме освещенности ЛДС (рисунок 2, б). При этом концентрация клеток в суспензии увеличивается до (41×10^6) клеток на мл суспензии.

В режиме освещенности ИК наблюдается снижение темпа роста популяции, сопровождающееся флокуляцией клеток, что связано со сдвигом pH в щелочную область (рисунок 3, б). Образование флоков из группы клеток может рассматриваться как ответная реакция на защелачивание, снижающая его воздействие на единичные клетки (рисунок 3, б).



а) ЛДС б) ИК

Рисунок 3 — Микроскопическая картина популяции *C. sorokiniana* при культивировании в различных условиях освещенности

В таблице 1 приведены результаты расчетов удельной скорости роста биомассы (μ) в исследуемых условиях культивирования микроводорослей. Установлено, что максимальная концентрация клеток в условиях освещенности ЛДС при внесении добавок мочевины в питательную среду варьировалась в диапазоне (38-41) × 10^6 клеток/мл, что в 1,7 раза больше, чем в условиях ИК.

Таблица 1 — Влияние азотсодержащих добавок на удельную скорость роста (μ) микроводорослей *C. sorokiniana*

Вносимые азотсодержащие добавки	μ, сут$^{-1}$
Контроль (без добавок)	0,19±0,01
CH_4N_2O	0,22±0,01
$(NH_4)_2SO_4$:NH_4NO_3 (1:1)	0,19±0,01
Освещенность	μ, сут$^{-1}$
ЛДС	0,26±0,01
ИК	0,15±0,01
УФ+ЛДС	0,25±0,01

Выявлено, что кратковременное УФ-облучение микроводорослей на начальном этапе процесса культивирования не приводит к заметному увеличению скорости синтеза биомассы.

Глава 4. Технология получения биомассы микроводорослей *C. sorokiniana.* Выбор эффективных способов концентрирования биомассы влияет на спектральные характеристики пигментов. В таблице 2 приведены результаты исследований влияния способов концентрирования клеточной суспензии на эффективность процесса и выход сухой биомассы *C. sorokiniana*.

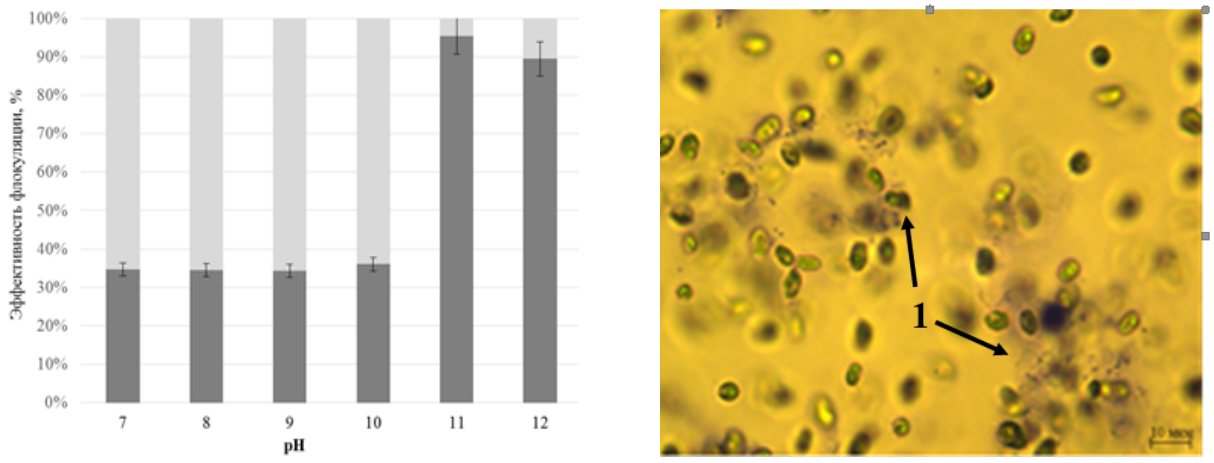
Таблица 2 — Влияние способов концентрирования клеточной суспензии на эффективность процесса и выход сухой биомассы *C. sorokiniana*

Способ концентрирования	Эффективность седиментации, %	Выход сухой биомассы*, г
Центрифугирование	97,8±3,2	6,55±0,33
Фильтрация	96,2±4,7	7,13±0,36
Автофлокуляция	95,7±2,8	7,55±0,37

* — объем ФБР 10 л

Установлено, что выход сухой биомассы из 1 л клеточной суспензии, концентрация которой варьировалась в пределах (38-41) × 10^6 клеток/мл, составил около 6-8 г и практически не зависел от исследуемых способов концентрирования. Учитывая энергозатратность процесс центрифугирования и длительность фильтрации, для отделения биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* целесообразнее использовать автофлокуляцию.

На рисунке 4 приведены результаты исследований влияния pH на динамику и эффективность процесса автофлокуляции микроводорослей, интенсивность которого зависит от концентрации клеток в суспензии. При низкой концентрации клеток (до 10 × 10^6 клеток/мл) автофлокуляция происходит менее интенсивно, что связано с удаленностью клеток друг от друга. Установлено, что процесс автофлокуляции популяции *C. sorokiniana* в фазе истощения роста происходит интенсивнее и заканчивается в течение 30 мин. Наибольшая эффективность процесса (рисунок 4, а) достигалась при pH 11 (92,3%) и 12 (85%), минимальное время необходимое для седиментации составило 0,5 ч.



а) б)

Рисунок 4 — Влияние pH на эффективность автофлокуляции клеток микроводорослей *C. sorokiniana:* а) эффективность флокуляции; б) микроскопическая картина прижизненных препаратов *C. sorokiniana* (pH 11), 1 – флоки.

Микроскопирование клеточной суспензии позволило выявить образование единичных флоков при pH 10. Количество флоков и их размер увеличивается при

достижении pH 11, дальнейшее увеличение щелочности (pH 12) приводит к уплотнению флоков, но сопровождается появлением мертвых клеток (рисунок 4, б).

В таблице 3 приведены результаты исследований влияния способов обезвоживания на содержание пигментов в полученных образцах биомассы *C. sorokiniana.*

Таблица 3 —Влияние способов обезвоживания на содержание пигментов в сухой биомассе *C. sorokiniana*

Способ обезвоживания	Σ пигментов мг/г сухой биомассы	Хлорофиллы, мг/г сухого остатка			Каротиноиды	
		Cha	*Chb*	*Cha/Chb*	мг/г сухой биомассы	% от ∑ пигментов
Воздушная сушка	35,85	18,05	11,01	1,64	6,79	18,93
ИК	28,17	11,01	11,12	0,991	6,04	21,45
Лиофилизация	28,78	13,12	10,12	1,30	5,54	19,26

Установлено, что высушивание биомассы микроводорослей под ИК-лампой накаливания является малоэффективным, поскольку приводит к снижению суммарного содержания пигментов, а лиофилизация — к снижению содержания *Cha*. Наиболее щадящим методом обезвоживания биомассы является воздушная сушка при температуре (23±2) °С.

На рисунке 5 приведена операционно-технологическая схема технологии получения биомассы микроводоросли *C. sorokiniana* в лабораторном ФБР.

Технология включает операции по подготовке ФБР и приготовлению питательной среды; подготовку маточной культуры; цикл культивирования микроводорослей (10 сут); операции по отделению клеточной суспензии и ее концентрированию с использованием флокуляции в щелочной среде; последующее отделение и промывку сырой биомассы и ее обезвоживание путем воздушной сушки.

Полученную воздушно сухую биомассу упаковывают в пакеты дой-пак с замком зип-лок, изготовленные из крафт бумаги плотностью 50 г/м^2 с фольгированным слоем изнутри.

Установленный срок годности воздушно сухой биомассы при температуре воздуха (18±1) °С и относительной влажности не более 75% составляет 6 мес.

Технология культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* защищена патентом на изобретение RU 2668162C1 «Способ культивирования микроводоросли *Chlorella*» (2018).

В процессе культивирования, микроводоросли способны аккумулировать металлы из питательной среды и вносимых добавок. Использование биомассы микроводорослей в рецептурах пищевых продуктов с целью обогащения их биологически активными веществами предполагает оценку соответствия полученных образцов биомассы требованиям действующего регламента ТР ТС 021/2011, в соответствии с которым в биомассе водорослей нормируется содержание токсичных элементов, нитратов и санитарно-показательной микрофлоры.

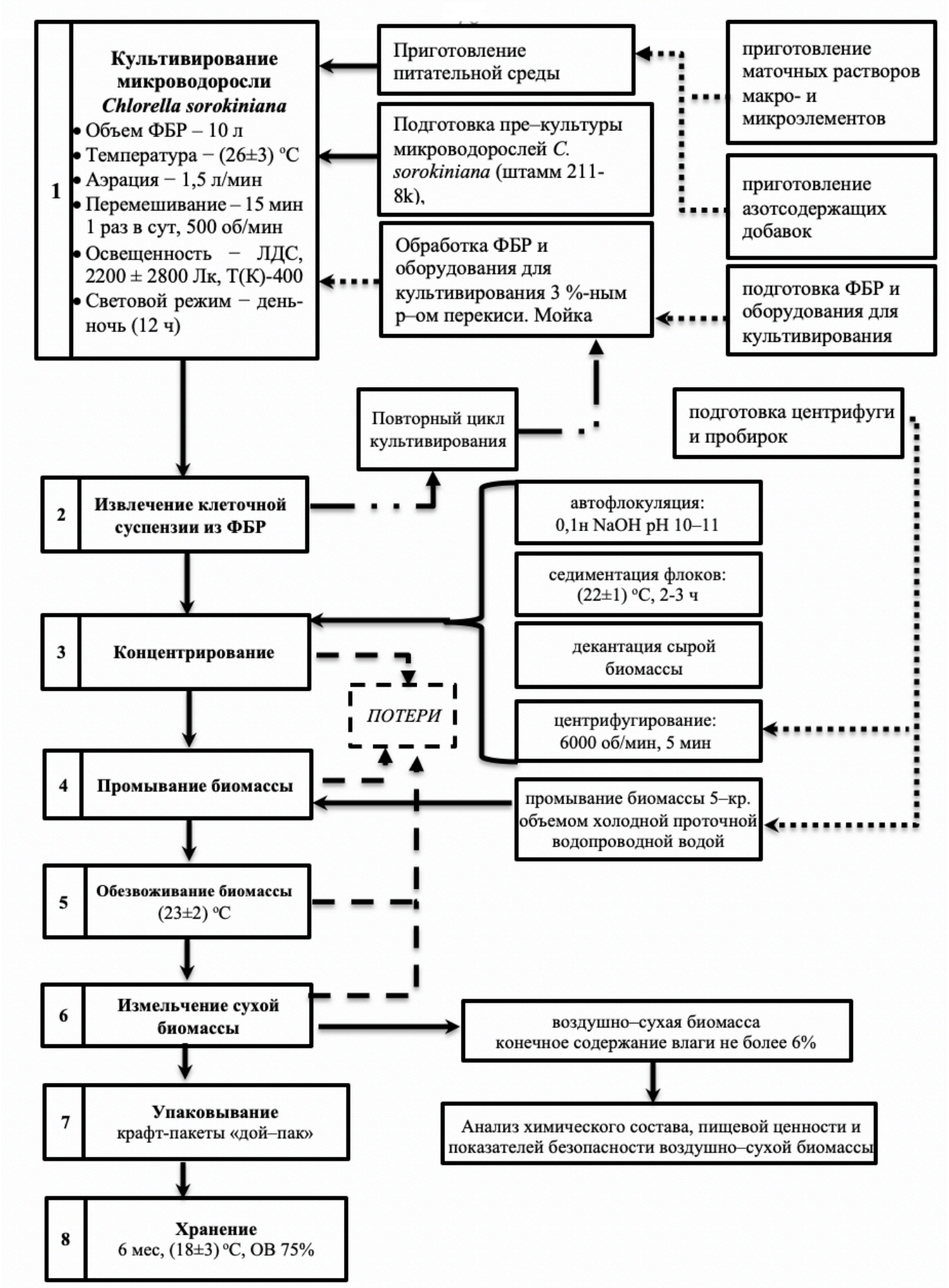


Рисунок 5 – Операционно –технологическая схема получения биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* в лабораторном ФБР

В таблице 4 приведен общий химический состав, органолептические и физико-химические показатели безопасности полученной воздушно-сухой биомассы микроводоросли *C. sorokiniana*.

Таблица 4 — Химический состав, органолептические и физико-химические показатели воздушно-сухой биомассы микроводоросли *C. sorokiniana*

Химический состав	**Содержание**
Содержание влаги, %	не более 6%
Белок, г/100г	47,82±2,30
Липиды, г/100г	13,32±1,40
Углеводы, г/100г	6,90±0,60
Минеральные вещества, мг/100 г	4,36±0,56
Органолептические показатели	**Описание характеристики**
Внешний вид	Свободно-сыпучий порошок
Цвет	Светло–зеленый
Запах	Рыбный, свойственный водорослям
Посторонние примеси	отсутствуют
Примеси металлов	**Содержание, мг/100 г**
Цинк	20,20±2,02
Медь	0,72±0,07
Железо	18,3±2,0
Нитраты	768±80, мг/кг

Выявлено, что остаточное содержание примесей металлов (Zn, Cu и Fe) в биомассе, установленное методом инверсионной вольтамперометрии, не превышает допустимой нормы их суточного потребления с пищей, а содержание токсичных элементов (свинец, кадмий, мышьяк, ртуть) и нитратов в полученных образцах биомассы соответствует регламенту.

Выявлено, что санитарно-показательная микрофлора в образцах воздушно-сухой биомассы соответствует требованиям нормативов.

Результаты исследований химического и биохимического состава полученной воздушно-сухой биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* показали, что ее белки содержат все необходимые для развития живых организмов аминокислоты. Липиды — полиненасыщенные жирные кислоты семейства ω_3 (26,6±1,16), в числе которых эйкозапентаеновая, докозагексаеновая, α-линоленовая кислоты, и семейства ω_6 (25,7±1,00) мг/г, в том числе, октадекатриеновая, цис- и транс-линолевая кислоты.

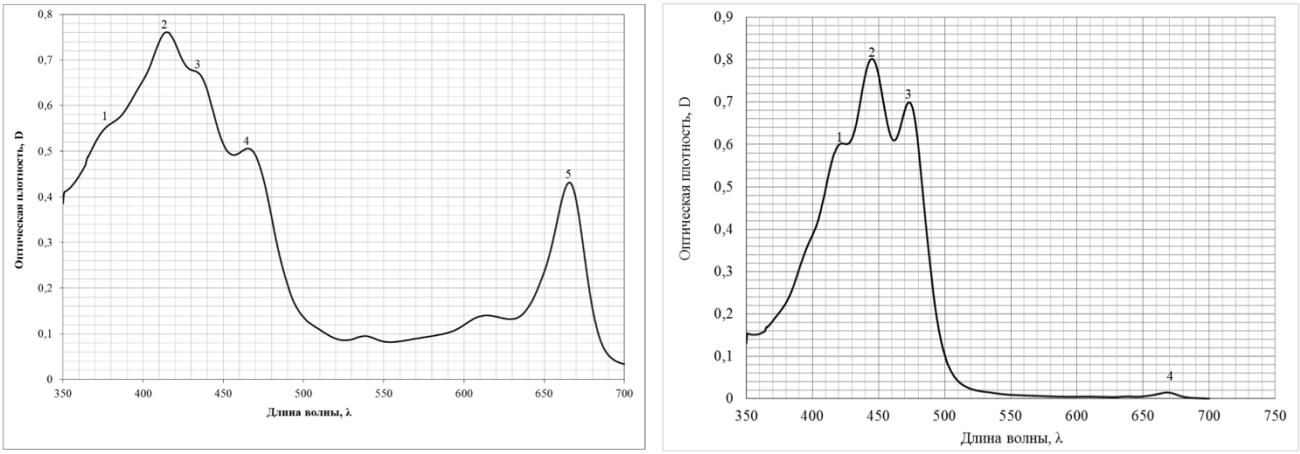
Сахара биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* представлены сахарозой (204,00±2,00), глюкозой (133,00±1,20), ксилозой (58,00±0,50) и фруктозой (20,00±0,30) мг/г.

В составе пигментного комплекса биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* преобладают хлорофиллы и каротиноиды (22,1 и 6,0 мг/г сухой биомассы, соответственно). Содержание фенольных веществ составляет 0,05 мг/г, а органических кислот — 2,7 мг/г сухой биомассы.

Таким образом, полученная биомасса микроводорослей *C. sorokiniana* может использоваться в качестве биологически активной добавки к пище.

Глава 5. Анализ состава фотосинтетических пигментов биомассы микроводорослей *C. sorokiniana*. Для получения спектральных характеристик фотосинтетических пигментов, их извлекали из биомассы экстракцией (96%-ный этиловый спирт) в соотношении 1:9. Известно, что пластидные пигменты поглощают свет в видимой части спектра (380-720 нм) избирательно, т.е. каждый пигмент имеет свой характерный спектр поглощения.

Спектр поглощения хлорофиллов *a* и *b* характеризуется наличием ярко выраженных максимумов: в красной области – соответственно 660 и 640 нм и сине-фиолетовой – 430 и 450 нм (рисунок 5, а). Полоса поглощения в сине-фиолетовой области (380-470) имеет максимумы поглощения (пики 1 − 380 нм, 2 – 420 нм и 4 − 470 нм, плечо 3 − 440 нм), характерные для каротиноидов, хлорофиллов *a* и *b*. Полоса поглощения в красной области спектра (635-680 нм) включает пики поглощения, характерные для форм хлорофилла *a* и *b*.



а) б)

Рисунок 5 — Спектральный профиль экстрактов пигментного комплекса (а) и каротиноидов (б) *C. sorokiniana*

Спектр поглощения каротиноидов (рисунок 5, б) характеризуется наличием трех характерных пиков: 1 – 420 нм, 2 – 440 нм и 3 – 470 нм. Форма спектра определяется числом двойных связей, заместителями, цис-, трансизомеризацией и типом растворителя.

Методом ТСХ на пластинах Sorbfil и Silufol идентифицированы хлорофилл, феофитин и *β*-каротин. В видимом свете зона хлорофилла *a* имеет темно-зеленый оттенок, зона хлорофилла *b* – светло-зеленый, а зона феофитина – серый. Величины R_f хлорофиллов и феофитина несколько отличаются от литературных данных в сторону увеличения (таблица 6).

Детекция в УФ позволила подтвердить наличие хлорофиллов в описанных областях, отмечены также зоны фракции ксантофиллов, Rf которых составил 0,04; 0,09; 0,20; 0,71, что соответствует неоксантину, виолоксантину и лютеину (Sorbfil). В области, характерной для β-каротина в УФ (365 нм), отмечена белая флюоресценция.

Хроматографическое разделение фракции каротиноидов, полученной омылением суммарного экстракта, на пластине Sorbfil позволило выявить зоны, для которых коэффициент R_f составил 0,040, 0,71 и 0,72. В области, характерной для каротиноидов (Rf 0,90) и лютеина (Rf 0,20) в УФ отмечена флюоресценция белого

цвета. В зонах с Rf 0,71 и 0,72 в УФ фракция каротиноидов имеет темно-коричневый цвет.

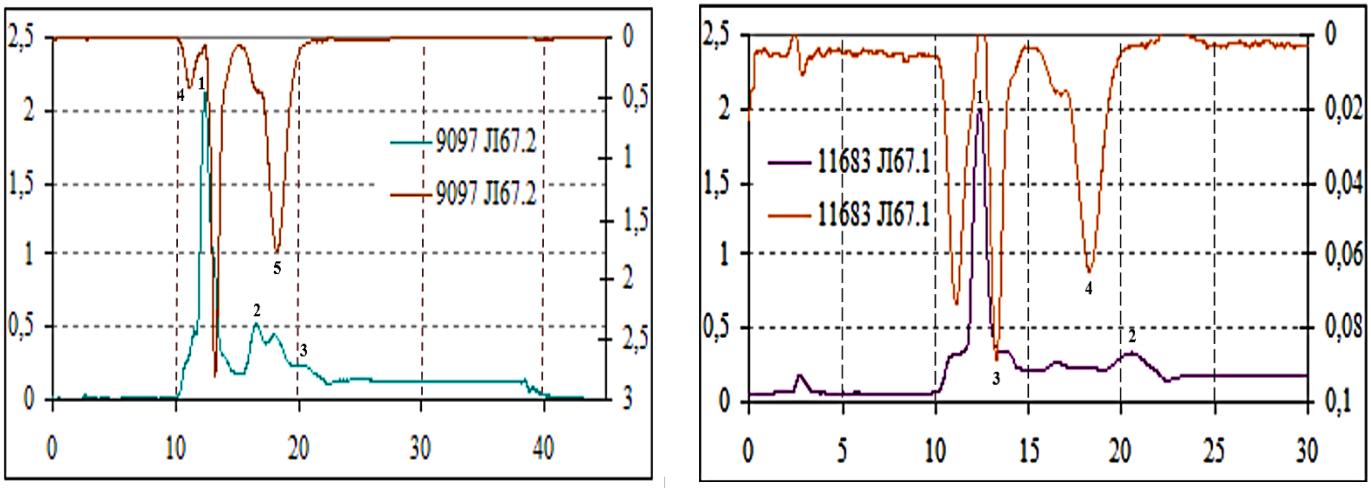
Таблица 6 – Показатели R_f пигментов микроводоросли *C. sorokiniana,* полученные с использованием различных хроматографических пластин

Идентифицированные пигменты	R_f (Sorbfil)	R_f (Silufol)
β-каротин	0,90	0,90
Феофитин	0,83	-
Хлорофилл a	0,80	0,64
Хлорофилл b	0,76	0,60
Ксантофиллы	0,70	-
Лютеин	0,25	-
Виолоксантин	0,09	-
Неоксантин	0,04	-

На рисунке 6а представлены хроматографические профили идентифицированных пигментов *C. sorokiniana*, полученные методом ОФ ВЭЖХ.

Максимумы каротиноидов детектировали при 440 нм, хлорофиллы — при 650 нм. Идентифицированы лютеин, фукоксантин, хлорофиллы *a* и *b*.

На рисунке 6б представлена хроматограмма выделенной омылением фракции каротиноидов, которые представлены лютеином и β-каротином, детектированные при 440 нм.



а)

нижняя кривая, левая ось, 440 нм; верхняя кривая, правая ось, 650 нм.

1 – лютеин, 2 – фукоксантин; 3 – β-каротин; 4 – хлорофилл *b*; 5 – хлорофилл *a*

б)

нижняя кривая, левая ось, 440 нм; верхняя кривая, правая ось, 650 нм.

1 – лютеин; 2 – β-каротин; 3 – хлорофилл *b*; 4 – хлорофилл *a*

Рисунок 6 – Хроматографические профили основных пигментов (а) и каротиноидов (б) *C. sorokiniana*

Результаты спектрального и хроматографического анализа фотосинтетических пигментов биомассы *C. sorokiniana* представлены в таблице 7.

Установлено, что каротиноиды полученных образцов биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* представлены лютеином (18,6%) и фукоксантином (4,7%) и *β*-каротином (1,8%) от общего количества пигментов биомассы.

Таблица 7 – Состав пигментов в биомассе *C. sorokiniana*, мг/г

Идентифицированные пигменты	**ОФ ВЭЖХ**	**Спектрофотометрия**
Сцмма пигментов	29,2 ± 2,9	32,49±3,5
Cha	9,1±1,0	13,3±1,3
Chb	8,0 ±0,8	12,64±1,3
Сумма каротиноидов	12,1±1,2	6,55±0,67
Лютеин	5,4 ± 0,5	–
Фукоксантин	1,4 ± 0,1	–
β-каротин	0,52 ± 0,05	–

Глава 6. Макаронные изделия с добавками биомассы микроводорослей

***C. sorokiniana*.** Макаронные изделия отличаются несбалансированностью макронутриентного состава, поэтому их дополнительное обогащение биологически активными макро- и микронутриентами позволит восполнить этот баланс. Использование биомассы микроводорослей в рецептурах мучных изделий в виде сухого порошка является более удобным, поскольку именно в этом виде она наиболее биодоступна для пищеварительных ферментов человека и позволяет вносить добавку в рецептурные композиции в составе мучных смесей в любом соотношении.

При разработке рецептурного состава макаронных изделий использовали замену муки на сухую биомассу микроводорослей в количестве от 2,5 до 7,5 % от массы мучной смеси. Приготовление контрольных образцов макарон осуществлялось без использования добавок биомассы микроводорослей.

Технология приготовления макаронного теста включала процессы смешивания сухих компонентов с водой, экструзии (выдавливание в требуемую форму) и дегидратации (сушка в контролируемых условиях). Тестовые заготовки формовали в виде Тальятелле шириной 7 и длиной 500 мм, затем сушили в конвектомате Electrolux при 60 °C в течении 5 мин до достижения содержания влаги 30-32 %.

Кулинарную обработку опытных и контрольных образцов макаронных изделий осуществляли путем отваривания в воде в соотношении 1:10 (по массе) при температуре ~90 °C в течении 5-7 мин до кулинарной готовности.

На рисунке 7 приведены результаты сенсорной оценки готовых макаронных изделий с заменой части муки в рецептурах на сухую биомассу микроводорослей *C. sorokiniana*.

Макаронные изделия с добавками биомассы микроводорослей имели оттенок от светло-зеленого до интенсивно-зеленого цвета в зависимости от количества вносимой добавки. Отмечено, что образцы макаронных изделий с добавкой более 5% биомассы имели выраженный рыбный привкус.

Потери белка при варке опытных образцов макаронных изделий увеличиваются пропорционально количеству вносимой добавки микроводорослей и варьируются от 2,6 до 3,4 г на 100 г готовых изделий.

Показано, что внесение в макаронные изделия добавок биомассы *C. sorokiniana* позволяет обогатить их хлорофиллом, содержание которого увеличивается пропорционально количеству добавки и достигает от 25 до 77 %

хлорофилла от РНП хлорофилла в сутки (100 мг/сут). При этом суммарные потери хлорофилла при варке макаронных изделий составляют около 10%.

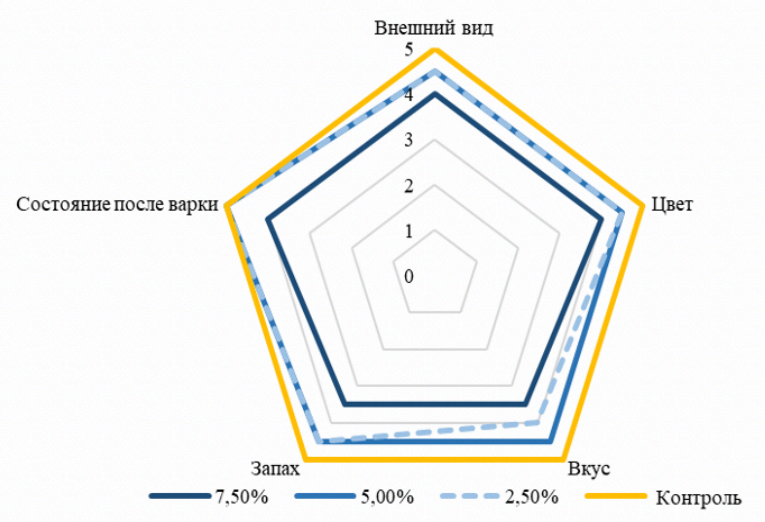


Рисунок 7 — Результаты сенсорной оценки готовых макаронных изделий с заменой муки на сухую биомассу микроводорослей *C. sorokiniana*

В результате исследований сохраняемости формы макарон при варке оказалось, что внесение добавки биомассы микроводорослей более 5% приводят к повышению развариваемости изделий выше уровня, установленного ГОСТ 31743, что связано со снижением содержания клейковины, формирующей структуру изделий из теста. Таким образом можно сделать вывод, что замена более 5 % муки на сухую биомассу микроводорослей *C. sorokiniana* не целесообразна.

Пищевая ценность макаронных изделий представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Пищевая ценность макаронных изделий с добавкой сухой биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* (5% от массы мучной смеси)

Белки, г/100г	Липиды, г/100г	Углеводы, г/100г	Калорийность, ккал
15,7	4,1	57,6	332,8
Эссенциальные жирные кислоты		Содержание, мг/100 г	от РНП в сут,%
ω_3		40,2	16,1
ω_6		17,8	6,0
Фитохимические вещества		Содержание, мг/100 г	от РНП в сут,%
Хлорофилл		52,1	34,3
Каротиноиды		3,5	23,6
Органические кислоты		7,1	14,2

Выявлено, что внесение добавок сухой биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* оказывает существенное влияние на общее содержание белка в макаронных изделиях. Так, содержание белка и липидов в макаронных изделиях при замене 5 % муки на биомассу микроводорослей увеличилось на 18 % (белки) и 10 % (липиды), относительно контрольного образца. Калорийность макарон составила 332,8 ккал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1.На основании обзора отечественной и зарубежной научной и технической литературы обоснована целесообразность направленного культивирования микроводорослей *Chlorella* для получения биомассы с высоким содержанием фотосинтетических пигментов для применения в пищевых технологиях;

2. Исследовано влияние азотсодержащих добавок в питательные среды и режимов освещенности на биосинтез микроводорослей *C. sorokiniana* в процессе культивирования для получения биомассы с высоким содержанием пигментов. Показано, что достижения максимальной концентрации клеточной суспензии необходимо использовать добавки мочевины в количестве 0,015 г на 1 л культуральной среды;

3.Анализ кривых культивирования показал, что наиболее благоприятное влияние на интенсивность роста биомассы оказывает режим освещенности ЛДС (люминесцентные лампы дневного света, световой поток 2200-2800 Лк, Т(К) 400 в режиме освещенности – «день-ночь» с фотопериодом — 12 ч.), при котором максимальная концентрация клеток в биомассе (38–41) $\times 10^6$ клеток/мл достигается на 9 сут культивирования при продолжительности цикла роста популяции 10 сут.;

4. В результате расчета удельной скорости роста μ популяции микроводорослей *C. sorokiniana* ее значения составили от 0,15 до 0,26 $сут^{-1}$ в исследуемых условиях культивирования. Максимальная емкость популяции (41×10^6 клеток/мл) в условиях и освещенности ЛДС оказывается в 1,7 раза больше, чем в условиях освещенности ИК;

5. В результате исследований процесса концентрирования клеточной суспензии *C. sorokiniana* путем автофлокуляции в щелочных средах выявлено, что наибольшая эффективность процесса флокуляции достигается при pH 11 (95,8 %), максимальное время седиментации флоков составило 2 ч. Выявлено, что наиболее эффективным способом обезвоживания биомассы, при котором достигается максимальной сохранение пигментов, является воздушная сушка при температуре (23±2) °С, что способствует сохранению пигментного комплекса и позволяет получить сухую биомассу с содержанием остаточной влаги до 6%;

6. Разработана технология получения биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* с высоким содержанием фотосинтетических пигментов, определен химический состава, физико-химические и микробиологические показатели безопасности, пищевая ценность полученной воздушно-сухой биомассы. Технико-технологические решения способа направленного культивирования микроводорослей *C. sorokiniana* защищены патентом на изобретение RU 2668162C1 «Способ культивирования микроводоросли *Chlorella*» (2018) ;

7. Модифицированы методы хроматографического разделения, идентификации и количественного анализа пигментов биомассы *C. sorokiniana* с использованием препаративной ТСХ и ОФ ВЭЖХ. Установлено, что содержание хлорофилла *a* в биомассе составляет (9,1±1,0), хлорофилла *b* — (8,0±0,8), каротиноидов — (12,1±1,2) мг/г;

8. Разработаны рецептуры на макаронные изделия с добавками сухой биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* от 2,5 до 7 % от массы муки, определены их показатели качества и пищевая ценность. Установлено, что замена до 5 % муки на

сухую биомассу микроводорослей не оказывает заметного влияния на физико-химические показатели качества готовых изделий, потери влаги при сушке и потери сухих веществ при варке макаронных изделий.

Показано, что замена муки на добавку сухой биомассы микроводорослей *C. sorokiniana* в количестве 5 % позволяет обогатить изделия хлорофиллом (на 34,3 %) и каротиноидами (на 23,6%) от рекомендуемой нормы потребления в сутки.

Внесение добавки микроводорослей позволяет создавать натуральные оттенки макаронных изделий, что расширяет ассортимент продукции без использования синтетических красителей.

Разработан комплект технической документации (ТУ и ТИ 10.73.11-022-38524349-2019 «Макаронные изделия, обогащенные хлореллой, с морепродуктами в сливочном соусе»). Проведено внедрение разработанных рецептур на ООО «Аппетипром» (Санкт-Петербург).

Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК:

1. Базарнова Ю.Г., Аронова Е.Б., Трухина Е.В. Применение биомассы микроводорослей Chlorella в технологии макаронных изделий // XXI Век: Итоги прошлого и проблемы настоящего плюс-2019. - Том 8 №4 (48) - С. 153–160.

Публикации в других изданиях:

1. Politaeva Natalia, Kuznetsova Tatyana, Smyatskaya Yulia, Ovchinnikov Filipp, Trukhina Elena. Impact of various physical exposures on Chlorella Sorokiniana microalgae cultivation // International Journal of Applied Engineering Research, Vol. 12, No.21 — 2017.— P. 11488-11492.
2. Смятская Ю.А., Политаева Н.А., Овчинников Ф.В., Трухина Е.В. Влияние ультрафиолетового излучения на скорость культивирования микроводоросли Chlorella // Материалы научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ». Высшая школа биотехнологии и пищевых технологий. – СПб: Изд-во Политехн. Ун-та — 2017. — С.142-145.
3. Politaeva N., Kuznetsova T., Smyatskaya Y., Atamaniuk I., Trukhina E.V. Chlorella Microalga Biomass Cultivation for Obtaining Energy in Climatic Conditions of St. Petersburg // International Scientific Conference Energy Management of Municipal Transportation Facilities and Transport EMMFT 2017. EMMFT 2017. Advances in Intelligent Systems and Computing, vol 692. — 2018.— P.555-562.
4. Политаева, Н.А., Кузнецова Т.А., Смятская Ю.А., Трухина Е.В. Получение энергии из биомассы микроводоросли chlorella в климатических условиях Санкт-Петербурга // Международный научно-технический и производственный журнал «Химическое и нефтегазовое машиностроение», №12 — 2017.— С.29-32.
5. Politaeva N. A., Kuznetsova T. A., Smyatskaya, Yu. A., Atamanyuk I., Trukhina E.V. Energy production from chlorella algae biomassUnder st. Petersburg climatic conditions // Chemical and Petroleum Engineering, Vol. 53, Nos. 11–12, March, 2018 (Russian Original Nos. 11–12, Nov.–Dec. Vol.53 —2018. — P.801-805
6. Кузнецова Т.А., Базарнова Ю.Г., Трухина Е.В. Дезинтеграция клеточной оболочки микроводорослей Chlorella при извлечении пигментного комплекса // Балтийский

Морской форум. VIII Международная научно-практическая конференция «Пищевая и морская биотехнология» – Калининград, 2019. – С. 86–93.
7. Bazarnova Y., Lyskova N., Kuznetsova T., Trukhina E.V. Illumination influence on chlorella sorokiniana biomass synthesis // Biotechnologia acta. T. 12. No 3. — 2019. — c. 50-56.
8. Bazarnova Y., Kuznetsova T., Trukhina E.V. Aquabiotechnology of directed cultivation of microalgae Chlorella Sorokiniana biomass // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 288,1 №12037 —2019. — Article Number 012037
9. Kuznetsova T., Ivanchenko O., Nikitina M., Kiseleva A. Trukhina E.V. Directed cultivation of Chlorella Sorokiniana for the increase in carotenoids' synthesis // International Conference on Efficient Production and Processing (ICEPP-2020). Volume 161. Issue E3S Web of Conferences —2020. — Article Number 01051

Аспирант_____Е.В. Трухина