

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ
им. А.О.КОВАЛЕВСКОГО

Отдел Биотехнологий и фиторесурсов

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДУНАЛИЕЛЛЫ

(*Dunaliella salina*)

Составители:

Зав. отделом Биотехнологий и
фиторесурсов ИнБЮМ НАНУ
к.б.н. с.н.с. Р. П. Тренкеншу

к.б.н. н.с. Р. Г. Геворгиз
аспирант А. Б. Боровков

Севастополь, 2005 г

Наш адрес

Тренкеншу Рудольф Павлович
Геворгиз Руслан Георгиевич
Боровков Андрей Борисович

Отдел Биотехнологий и фиторесурсов
Институт биологии южных морей НАНУ
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь
Крым, Украина

тел. +38(0692) 55-07-95
<http://biotex.ibss.org.ua>

Краткое описание объекта

Дуналиелла (*Dunaliella salina*) — зелёная одноклеточная микроскопическая водоросль, обитающая в гиперсолёных водоёмах. Гиперсолёные водоёмы, заселённые *D. salina*, находятся чаще всего на побережьях морей и океанов, а также во внутриконтинентальных засушливых районах. Водоросль вида *D. salina* — уникальный организм, который в условиях чрезвычайно высоких концентраций солей в водоёме способен синтезировать целый ряд полезных соединений таких как β -каротин (провитамина А), глицерол, ненасыщенные жирные кислоты, и пр. В течении многих лет особый интерес представляла биомасса *D. salina* как источник β -каротина, поскольку это соединение широко используется в пищевой промышленности как природный краситель, химико-фармацевтической промышленности, медицинской практике, а также лечебно-профилактическом питании при профилактике и лечении онкологических, инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний. Наиболее важным является тот факт, что *D. salina*, как пищевая добавка, является таким же организмом как и высшие растения (укроп и морковь), употребление которых в пищу, в отличие от искусственных препаратов, не влечет за собой ника-

ких побочных эффектов.

Известно, что *Dunaliella salina* в определенных условиях способна к гиперсинтезу β -каротина. Его содержание может достигать 10% от сухой массы водорослей, что является наиболее высоким показателем по сравнению с другими продуцентами β -каротина (морковь *Daucus sativus*, гриб *Blakeslea trispora*). Это позволяет считать микроводоросль *Dunaliella salina* наиболее перспективным источником β -каротина для биотехнологической промышленности. Важно (!), β -каротин, получаемый из растительных компонентов не токсичен.

На сегодняшний день на коммерческой основе биомассу дуналиеллы производят и потребляют в таких странах как: Австралии, Японии, Китай, США. Однако, потребности мирового рынка в β -каротине естественного происхождения не удовлетворены даже на четверть.

Описание (научное) объекта

Биология и систематика

Dunaliella salina Teod. — одноклеточная жгутиковая зеленая глобная микроводоросль. Согласно альгологической системе классификации, таксономическое положение *Dunaliella salina* отражает схема:

Царство (Kingdom)	Plantae
Класс (Class)	Chlorophyceae
Отдел (Division)	Chlorophycota
Порядок (Order)	Volvocales
Семейство (Family)	Dunaliellaceae
Род (Genus)	Dunaliella
Вид (Species)	Dunaliella salina

Род *Dunaliella* включает 29 солоноводных, морских, пресно-

водных и почвенных видов; 6 из них найдены на территории Украины исключительно в соленых водоемах. Хорошо известна *D. salina* — дуналиелла солоноводная, развивающаяся в гипергалинных водоемах юга Украины (степной Крым). В массовом количестве она вызывает красное «цветение», особенно яркое в период летнего испарения воды из мелководных лагун. На поверхности таких лагун образуется солевой концентрат в виде пластинок из кристаллов соли, а под ними теплая соленая вода (рапа). Установлено, что клетки водоросли разнообразной формы: овальные, эллипсоидные, яйцевидные, грушевидные, иногда шаровидные, цилиндрические или веретеновидные; радиально- или билатерально симметричные, редко дорсивентральные или слегка ассиметричные. Размеры клеток весьма разнообразны. Длина может колебаться от 5 мк до 29 мк, ширина от 4 мк до 20 мк; объём клеток от 70 мк³ до 4500 мк³. Хлоропласт по цвету чаще всего зелёный, иногда жёлтый, бурый или другой оттенок красного цвета. По форме хлоропласт обычно чашевидный с пиреноидом и глазком, реже без них. По обе стороны от папиллы, на выпуклом апикальном конце клетки прикреплены два жгутика. Обычно жгутики одинаковой длины, равной или превышающей длину клетки. У молодых, только что разделившихся клеток один из жгутиков может быть короче другого. Клетки дуналиеллы изоконтны и характеризуются веслоподобным движением жгутиков. Как и вся клетка, жгутики покрыты протоплазматической мембраной. Их тонкая структура характеризуется обычной конструкцией (9 + 2). Для *D. salina* характерны вегетативный, бесполой и половой типы размножения. Первый является преобладающим. Происходит путём продольного деления клеток. Последовательность деления органелл строго не детерминирована и легко нарушается, особенно в старых культурах. При этом образуются уродливые формы. В неблагоприятных условиях дуналиелла способна образовывать цисты бесполого происхождения. Цисты имеют шаровидную форму, толстую двойную оболочку и гранулированное содержимое, освобождение которого при прорастании происходит через щель в оболочке. Перед прорастанием

цисты, её содержимое красного цвета зеленеет и делится с образованием 2–4 клеток. Половой процесс у *D. salina* — гологамного типа. Копуляция может происходить как на свету, так и в темноте. В результате слияния двух клеток образуется неподвижная зигота, покрытая оболочкой (иногда слоистой). Перед прорастанием происходит редукционное деление с образованием 2–32 клеток. Количество последних обуславливается размерами зиготы и условиями, в которых она развивается.

Химический состав

Ниже приведен усредненный состав биомассы дуналиеллы по органическим и неорганическим показателям.

Состав	%	Состав	г/100 г
Белок	10–57	Углерод	45,4
Углеводы	10–32	Водород	6,3
Липиды	7–30	Азот	10,71
Зольность	5–7 (37–65)	Фосфор	3,3
Нуклеиновые кислоты	6		
Хлорофиллы	0,01–6		
Каротиноиды	0,03–10		

Применение

Биологически активная добавка (БАД) к пище «*Dunaliella salina*» предназначена для непосредственного употребления в пищу, а также для введения в качестве компонента в другие продукты. По функциональной активности БАД «*Dunaliella salina*» может быть отнесена как к группе нутрицевтиков, так и частично к группе парафармацевтиков, поскольку проявляет следующие свойства:

- Является источником витаминов, эссенциальных аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот, антиоксидантов,

макро- и микроэлементов;

- Содержит наиболее важные микроэлементы в органической форме, что существенно облегчает их всасывание в желудочно-кишечном тракте человека и позволяет рекомендовать продукт для профилактики микроэлементозов и прежде всего железодефицитных состояний;
- Увеличивает усвояемость витаминов и микроэлементов пищи;
- Активизирует и нормализует обмен веществ;
- При использовании в детском питании способствует более полному усвоению пищи, устраняет симптомы желудочно-кишечных заболеваний, улучшает показатели иммунной системы, существенно снижает заболеваемость острыми респираторными инфекциями, облегчает адаптацию детей к условиям дошкольных учреждений;
- Повышает неспецифическую резистентность организма к действию неблагоприятных факторов окружающей среды;
- Способствует связыванию и выведению из организма ксенобиотиков.

Зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* — уникальный организм, способный синтезировать β -каротин, который является мощным антиоксидантом. Он обладает антимуtagenными, радиопротекторными и противоопухолевыми свойствами, то есть замедляет старение организма. В качестве биологически активной добавки к пище рекомендуется как общеукрепляющее и профилактическое средство. Рекомендуется при следующих патологических состояниях: авитаминоз и гиповитаминоз; поражения кожи, слизистых оболочек; патология легких, бронхов; воспалительные, эрозивно-язвенные поражения желудочно-кишечного тракта, цирроз печени. В пищевой промышленности β -каротин используется как краситель.

Кроме того, морские галобные микроводоросли являются источником не только β -каротина, но и целого ряда биологически ценных веществ (например, жирных кислот высокой степени ненасыщенности, которые не синтезируются пресноводными видами). Для повышения эффективности фармакологической активности β -каротина желателен комплексное использование биомассы.

Технология производства.

Краткое описание

Для любых микробиологических объектов технологии получения биомассы схожи. Для сугубо специализированных целей микроводоросли выращивают в строго контролируемых условиях (управляемый биосинтез), в культиваторах закрытого типа. Организация такого производства требует больших капиталовложений. Предлагаемая технология выращивания дуналиеллы отличается простотой исполнения и дешевизной. Обладая высокой степенью приспособляемости, дуналиелла не требует дорогостоящего оборудования (специализированных культиваторов), обеспечивающих строго определенные условия для роста клеток. Там, где это возможно по экологическим и климатическим условиям, дуналиеллу выращивают в прудах или бассейнах под открытым небом или в сельскохозяйственных теплицах. Преимуществом такого производства является использование естественного освещения, что в значительной степени снижает себестоимость конечного продукта.

Краткое описание основных этапов производства биомассы дуналиеллы в сельскохозяйственной теплице.

1. **Подготовка.** Строительство и установка бассейнов в теплице, при необходимости подготовка емкостей для воды, подготовка необходимого оборудования для сбора и сепарирования урожая, подготовка блока сушки биомассы.

2. **Запуск производства.** На этом этапе небольшой объем биомассы дуналиеллы помещают в бассейн с питательной средой. По мере нарастания биомассы урожай не собирают, а проводят заполнение других бассейнов. Ежедневно такую процедуру повторяют до тех пор, пока не заполнятся все рабочие бассейны.
3. **Сбор урожая.** Поскольку скорость роста микроводоросли достаточно высока, сбор урожая проводят ежедневно. Данная процедура проводится с помощью насосов.
4. **Сепарирование биомассы.** Для отделения клеток микроводорослей от среды используют специализированный сепаратор.
5. **Подкормка.** По мере роста дуналиеллы и сбора урожая, среда в которой растут микроводоросли истощается. Чтобы восполнить недостаток элементов питания, в среду периодически добавляют питающий раствор, содержащий минеральные соли — источники азота, фосфора, железа и пр.
6. **Сушка биомассы.** Отсепарированную биомассу (пасту) дуналиеллы сушат теплым воздухом при температуре не выше 60°C. Для этого биомассу наносят тонким слоем на полиэтилен и высушивают в течении 3–4 ч, не допуская попадание прямых солнечных лучей, поскольку интенсивный солнечный свет приводит к разрушению пигментов, что заметно снижает качество биомассы.
7. **Хранение биомассы.** Уже высушенную биомассу дуналиеллы собирают в герметичную тару для хранения, например, полиэтиленовые мешки. Герметичность необходима в связи с высокой гигроскопичностью высушенной биомассы. Хранят дуналиеллу в темном месте при комнатной температуре. Крайне нежелательно попадании влаги на высушенную биомассу дуналиеллы. В таких ситуациях биомасса не подлежит повторной сушке, поскольку высокое содержание бел-

ка и влага — наиболее благоприятная среда для развития бактерий. Порой достаточно нескольких минут бурной деятельности бактерий, чтобы биомасса дуналиеллы приобрела характерный вид и запах испорченной продукции.

Преимущество нашей технологии над другими

В лаборатории Управления биосинтезом микроводорослей отдела Биотехнологий и фиторесурсов (ИнБЮМ) разработана технология выращивания дуналиеллы в обычных сельскохозяйственных теплицах, которая обладает рядом преимуществ в сравнении с традиционными способами. Уже само увеличение урожая в 5–10 раз в сравнении с технологиями по выращиванию дуналиеллы в озерах при неизменных материальных затратах, ставит наше предложение вне всякой конкуренции. Основные преимущества:

1. Технология основана на непрерывном способе выращивания. Другими словами, ежедневно некоторый объем суспензии сливают из бассейна, взамен в бассейн добавляют такой же объем свежей питательной среды. Сливаемый объем суспензии используется для сепарирования, т. е. сбора урожая.
2. Ежедневное добавление свежей питательной среды исключает нехватку каких-либо компонентов, необходимых для роста водоросли.
3. Состав питательной среды сбалансирован таким образом, чтобы изъятие всех компонентов из среды проходило равномерно по мере роста дуналиеллы. Это позволяет рационально расходовать дорогостоящие минеральные соли, которые необходимы для приготовления питательных сред.
4. Режим непрерывного выращивания микроводорослей позволяет легко создавать оптимальную температуру в бассейнах посредством изменения объема в бассейне.

5. Регулярное перемешивание суспензии в бассейнах значительно повышает скорость роста водоросли, поскольку перемешивание приводит к удалению из суспензии избыточной концентрации ингибирующего рост кислорода.

Готовность к внедрению

Разработан полный пакет документации, включающей технические и технологические инструкции культивирования дуналиеллы в теплице. Нарботан опыт подготовки технологов и будущих работников. Практика внедрения альготехнологий показала, что даже в тех случаях, когда будущие работники не имеют специального биологического образования, необходим достаточно непродолжительный срок (1–2 месяца), чтобы они уловили суть дела и могли самостоятельно вести весь технологический процесс.

Описание технологической схемы

Кратко приведем описание технологической схемы на примере обычного трудового дня, предполагая, что все подготовительные работы по устройству теплицы, бассейнов, блока сушки и пр. уже проведены, а также заселены дуналиеллой все бассейны.

8-00 Контроль уровня суспензии микроводорослей в бассейнах.

с 8-00 по 20-00 Перемешивание культуры в бассейнах минимум 1 раз в час.

13-00 Процедура обмена и мероприятия по сепарированию и сушке биомассы.

16-00 Подготовительные процедуры для работы следующего дня: приготовление питательных сред и пр.

18-00 Сбор и упаковка высушенной биомассы — урожай предыдущего дня.

18-00 Подготовительные процедуры для работы следующего дня: приготовление питательных сред, подготовка блока сушки и пр.

Замечание. Временные рамки могут уточняться или изменяться в связи со спецификой конкретного производства.

Фотогалерея



Рис. 1. Некоторые виды микроводорослей из коллекции культур ИнБЮМ НАНУ

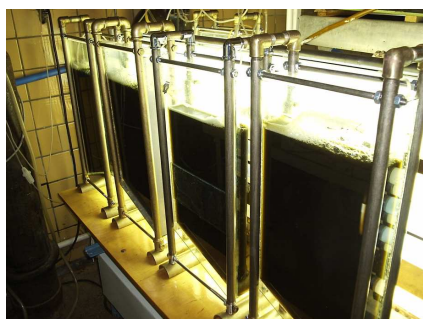


Рис. 2. Внешний вид экспериментальных установок, обеспечивающих заданные характеристики роста микроводорослей



Рис. 3. Культиваторы для экспериментальных работ



Рис. 4. Подготовительные работы в теплице

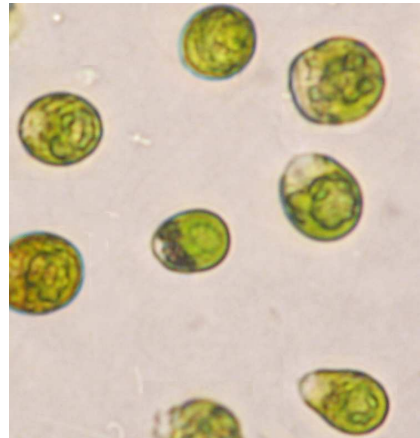


Рис. 5. Активный рост культуры и накопления хлорофилла

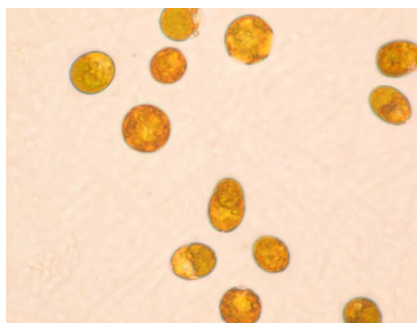


Рис. 6. Стадия накопления каротиноидов



Рис. 7. Институт биологии южных морей.

Технологические инструкции и технические условия

Ниже приведен пример технологической инструкции и технических условий, разработанных для производства ООО «Кайлас».

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ООО «Кайлас»

_____ Н.В. Панченко

" ____ " _____ 2005 г

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА К ПИЩЕ
“*Dunaliella salina*”
ТУ _____

ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ

Разработано:

Зав. отделом Биотехнологий и фиторесурсов ИнБИОМ НАНУ

_____ Р.П. Тренкеншу

аспирант ИнБИОМ НАНУ

_____ А.Б. Боровков

" ____ " _____ 2005 г

ООО «Кайлас»
Симферополь, 2005 г