

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тамбовский государственный технический университет»

На правах рукописи

Устинская Яна Витальевна

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ СИНТЕЗА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ФОТОТРОФНЫМИ
МИКРООРГАНИЗМАМИ

1.5.6. «Биотехнология»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:
д.т.н., профессор Д.С. Дворецкий

Тамбов – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ:

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Список используемых сокращений и условных обозначений	10
Глава 1. Литературный обзор	11
1.1 Особенности жизнедеятельности фототрофных микроорганизмов ...	11
1.1.1 Морфологические особенности микроводорослей и цианобактерий	11
1.1.2 Основные биохимические процессы в клетках микроводорослей и цианобактерий	17
1.2 Биологически активные метаболиты микроводорослей и цианобактерий	21
1.2.1 Антибактериальные пептиды микроводорослей и цианобактерий	21
1.2.2 Вещества липидной природы антибактериального действия ..	28
1.2.3 Биологически активные метаболиты микроводорослей стимулирующего действия	34
1.3 Влияние условий культивирования фототрофных микроорганизмов на синтез биологически активных соединений	36
1.4 Создание перспективных технологий переработки биомассы фототрофных микроорганизмов в ценные целевые продукты	41
1.4.1 Перспективные методы культивирования биомассы микроводорослей и цианобактерий	41
1.4.2 Перспективные методы дезинтеграции клеток микроводорослей и цианобактерий	52
1.4.3 Подбор экстрагента для экстракции целевых продуктов из клеток микроводорослей и цианобактерий	59
Глава 2. Объекты и методы исследования	65
Глава 3. Теоретические и экспериментальные исследования антибактериальных и стимулирующих свойств биологически активных	

метаболитов микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> и цианобактерий <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS B-404	74
3.1 Исследование влияния технологических параметров культивирования на количество водорастворимых белков и неполярных веществ липидной природы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> и цианобактерий <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS B-404	74
3.2 Определение возможности повышения интенсивности и степени извлечения водорастворимых внутриклеточных белков из биомассы клеток микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	76
3.2.1 Сравнительный анализ методов дезинтеграции клеток микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> на выход водорастворимых внутриклеточных белков	76
3.2.2 Оптимизация методов и условий дезинтеграции клеток микроводорослей с использованием полного факторного эксперимента ...	80
3.2.3 Исследование кинетики выхода внутриклеточных водорастворимых белков	84
3.2.4 Исследование влияния комплексного разрушения биомассы клеток микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> на выход внутриклеточных водорастворимых белков	86
3.3 Исследование антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> на грамположительные бактерии ..	87
3.4 Изучение антибактериального действия водорастворимых пептидных фракций и неполярных веществ липидной природы цианобактерий <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS B-404 на грамположительные бактерии	95
3.5 Исследование потенциала белкового экстракта микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104

Глава 4. Аппаратурно-технологическое оформление производства метаболитов из биомассы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	107
4.1 Расчет материального баланса производства антибактериальных пептидов из микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	107
4.2 Расчет и подбор технологического оборудования	115
ВЫВОДЫ	136
Список использованных источников	137
ПРИЛОЖЕНИЕ. Свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ	162

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы:

В соответствии с «Прогнозом научно-технологического развития России» до 2030 года одним из приоритетных направлений научных исследований промышленной биотехнологии является получение биологически активных клеточных метаболитов. Перспективными продуцентами для синтеза биологически активных соединений являются фототрофные микроорганизмы (микроводоросли и цианобактерии), имеющие высокую скорость роста, гибкий метаболизм и способные быстро адаптироваться к изменяющимся условиям культивирования.

За последние два десятилетия активно проводятся исследования, описывающие антибактериальный эффект биологически активных соединений микроводорослей и цианобактерий (антибактериальные пептиды и вещества липидной природы), которые могут применяться в качестве антибактериальных агентов в области охраны здоровья животных, аквакультур, защиты сельскохозяйственных культур и дезинфекции воды. Одним из наиболее интересных продуктов, получаемых из микроводорослей, является водный экстракт, содержащий белки, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, водорастворимые витамины, стероидные соединения, стимулирующие протекание различных метаболических процессов клеток.

Однако активное развитие производств антибактериальных и стимулирующих веществ тормозится недостаточной изученностью подходов к реализации процессов основных стадий получения данных продуктов, что подтверждает актуальность таких исследований.

Настоящие исследования проводились на кафедре «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО ТГТУ при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-4348.2022.4), гранта в области науки из федерального бюджета для

государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2235.2020.8).

Цель работы: Разработка технологических основ синтеза биологически активных метаболитов микроводорослями *Chlorella sorokiniana* и цианобактериями *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Исследование влияния технологических параметров культивирования на количество метаболитов (неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков) микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404.

2. Определение возможности повышения интенсивности и степени извлечения внутриклеточных водорастворимых белков из биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

3. Изучение антибактериального действия метаболитов микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 на грамположительные бактерии.

4. Исследование потенциала белкового экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, определение концентрации экстракта в составе питательной среды, стимулирующей рост клеток дрожжей.

5. Разработка принципиальной технологической схемы получения веществ антибактериального и стимулирующего действия на основе микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Научная новизна. Идентифицирован механизм комплексного действия различных методов дезинтеграции (ферментом лизоцимом, ультразвуком и сверхвысокочастотным излучением (СВЧ-излучением)) клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на выход внутриклеточных водорастворимых белков.

Установлена закономерность влияния белого света на антибактериальное действие неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций из штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404.

Получены экспериментальные данные о значениях минимальных ингибирующих концентраций (МИК) неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций на грамположительные бактерии.

Определено, что водорастворимая белковая фракция микроводорослей *Chlorella sorokiniana* может быть использована в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Теоретическая и практическая значимость.

Определены технологические режимы культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, позволяющие накопить биомассу клеток с повышенным содержанием неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков.

Установлено, что метод комплексного последовательного использования ультразвука и фермента для дезинтеграции биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* позволяет увеличить выход внутриклеточных водорастворимых белков в 14,7 раз по сравнению с контролем.

Разработанная принципиальная технологическая схема может быть использована для организации производства веществ антибактериального (в качестве антибактериальных агентов против грамположительных бактерий) и стимулирующего действия (в качестве фактора роста при культивировании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) на основе микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Научные положения, выносимые на защиту:

- подходы к культивированию микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, позволяющие накопить биомассу клеток с повышенным содержанием неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков;

- подходы к организации эффективных режимов дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, с точки зрения максимального выхода внутриклеточных водорастворимых белков;

- результаты теоретических и экспериментальных исследований антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, а также стимулирующих свойств водорастворимой белковой фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на рост эукариотических клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Методология и методы исследования. Культивирование микроорганизмов осуществляли с применением стандартных методов, применяемых в биотехнологии и микробиологии. Результаты эксперимента получены в трех повторностях. В работе использованы современные методы физико-химического анализа: спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, газовая хроматография. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Matlab и Microsoft Excel. Статистический анализ проводился с использованием SPSS (статистический пакет для социальных наук) версии 20.0.

Степень достоверности. Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертации подтверждаются: 1) корректным использованием методологии научного исследования; 2) согласованностью теоретических результатов и экспериментальных данных, полученных с использованием современных методов измерения и сертифицированных приборов, с известными литературными данными.

Апробация результатов. Основные результаты работы представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе на 14-th International Conference on Chemical and Process Engineering (Болонья, 2019), 15-th International Conference on Chemical and Process Engineering. (Милан, 2021), Проблемы и инновационные решения в химической технологии ПИРХТ (Воронеж, 2019, 2022), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Москва, 2023), XVIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием (Казань, 2023).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 - Биотехнология по п. 2 (в части: технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов...), п. 3, 5.

Публикации результатов работы. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 1 работа в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ, 7 печатных работ, входящих в международную реферативную базу данных Scopus и международную реферативную базу WoS, 2 свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Личный вклад автора состоял в сборе и анализе литературных данных, планировании работ и получении экспериментальных результатов, участии в обработке и анализе полученных данных, написании и оформлении публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы, включающего 219 источников. Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста, иллюстрирована 35 рисунками, 52 таблицами.

Список условных обозначений и используемых сокращений

ЖК – жирные кислоты

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

ДГК – докозагексаеновая кислота

ЭПК – эйкозапентаеновая кислота

G3P – глицеральдегид-3-фосфат

НАД(Ф)Н – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ЛФХ – лизофосфатидилхолин

ДИЗ – диаметр зоны ингибирования, мм

ИК₅₀ – половинная ингибирующая концентрация, % ингибирования

CGF – фактор роста хлореллы

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СВЧ – сверхвысокочастотное излучение

УЗ – ультразвук

ПЭ – петролейный эфир

КЖ – культуральная жидкость

\bar{S} – средняя площадь клеточной поверхности, мкм²

ФАР – фотосинтетически активная радиация

МХА – агар Мюллера-Хинтона

ПФЭ – полный факторный эксперимент

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Особенности жизнедеятельности фототрофных микроорганизмов

1.1.1 Морфологические особенности микроводорослей и цианобактерий

На сегодняшний день фототрофные агенты являются важнейшими объектами биотехнологических исследований, так как клетки данных микроорганизмов синтезируют различные ценные для человека метаболиты и все чаще становятся объектами прикладных исследований [1 – 2].

Микроводоросли – эукариотические микроорганизмы, трансформирующие световую энергию, воду и диоксид углерода в биохимическую энергию, необходимую для их роста через фотосинтез и хемосинтез. Клетки микроводорослей способны накапливать значительное количество белка, углеводы, полярные и нейтральные липиды с богатым набором жирных кислот (ЖК), включая незаменимые ω -3 полиненасыщенные ЖК. Эти организмы также способны синтезировать пигменты разных классов (каротиноиды, хлорофилл), витамины, стерины, антибиотики и токсины [3 – 4].

Учитывая спрос на продукты натурального происхождения на потребительском рынке, вещества, полученные из микроводорослей, обладают хорошим рыночным потенциалом. Многообразие различных ценных компонентов позволяет использовать данные микроорганизмы как перспективные источники сырья для применения в фармацевтике, производствах пищевых добавок, кормовых добавок для животных и рыб, полимерных материалов, биоудобрений и биотоплива. Единственное в России предприятие полного цикла, занимающееся переработкой водорослей – Архангельский водорослевый комбинат, который выпускает фармацевтические субстанции, а также биологически активные добавки, функциональное питание и косметические продукты под брендом АВ1918.

Существуют различные исследования характеристик видов микроводорослей, представляющих коммерческий интерес. К ним относятся, например, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* [5], *Nannochloropsis*,

Phaeodactylum tricornutum [6]; и другие виды – *Dunaliella salina* [7], *Haematococcus pluvialis* [8, 9] и *Scenedesmus almeriensis* [10] (табл. 1).

Таблица 1 – Сравнение состава различных видов микроводорослей [5, 6]

Виды микроводорослей	Белки, %	Липиды, %	Углеводы, %	Максимальная производительность (г/л·сут)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	56	22	17	1,16
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 – 58	14 – 22	12 – 17	1,87
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32	0,224
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	15	27	0,157
<i>Scenedesmus sp.</i>	50 – 56	10 – 52	12 – 14	0,110
<i>Chlamidomonas reinhardtii</i>	48	21	17	0,100
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	26	0,115

Одним из наиболее перспективных биологических агентов такого типа является род микроводорослей *Chlorella*, который имеет высокую скорость роста, способен быстро адаптироваться к изменяющимся условиям культивирования, а так же использовать для питания как неорганические, так и органические источники углерода [5]. Микроводоросль *Chlorella* – микроскопический одноклеточный эукариотический микроорганизм (рис. 1), имеющий сферическую форму около 2,2 – 6,7 мкм в диаметре (рис. 1), при образовании автоспор клетки имеют диаметр 7,8 – 10 мкм [11]. Этот род микроорганизмов входит в десятку наиболее питательных продуктов на земном шаре, ценен из-за своей способности адсорбировать и выводить из организма тяжелые металлы (свинец, кадмий, ртуть и уран) и некоторые другие токсические соединения. Так же для этой водоросли при ее выращивании в определенных условиях культивирования характерно высокое содержание липидов (в 100 г порошка биомассы 25 – 35 г липидов), белков, аминокислот, витаминов (А, В₁, В₂, В₃, В₆), минералов (железо, магний, цинк), каротиноидов [12 – 14]. Данные микроорганизмы рассматриваются как перспективные микробные фабрики для производства веществ с высокой добавленной стоимостью из различных источников энергии (световая энергия, вода, диоксид углерода, органические вещества).

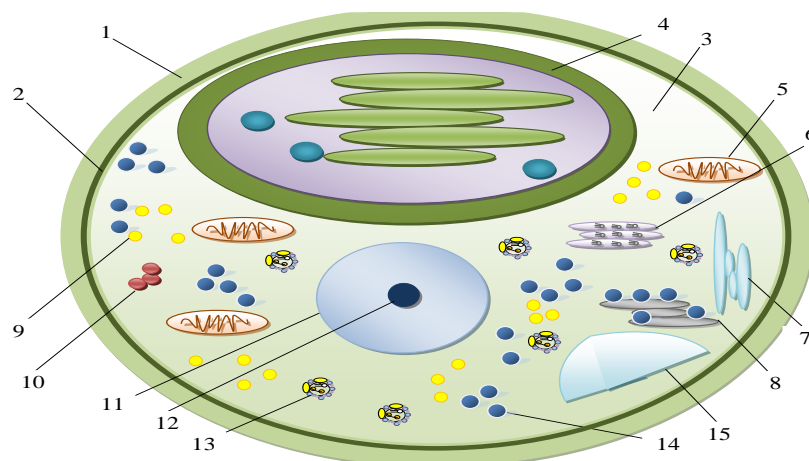


Рисунок 1 – Клетка микроводоросли *Chlorella*:

1 – клеточная стенка; 2 – цитоплазматическая мембрана; 3 – цитоплазма; 4 – хлоропласт; 5 – митохондрии; 6 – лизосомы; 7 – гладкий эндоплазматический ретикулум; 8 – гранулярный эндоплазматический ретикулум; 9 – липидная капля; 10 – пероксисомы; 11 – ядро; 12 – ядрышко; 13 – белково-липидные комплексы; 14 – рибосомы; 15 – вакуоль

Сложность извлечения целевых продуктов из клеток микроводорослей заключается в том, что большинство видов обладают жесткими клеточными стенками, которые препятствуют экстракции целевых веществ (рис. 2). Клеточные стенки микроводорослей могут сильно различаться по строению, но чаще всего содержат следующие полимеры: целлюлоза, гемицеллюлоза (ксилоглюкан, маннан, глюкуроан, $(1 \rightarrow 3)$ - β -глюкан), хитиноподобный пептидогликан и ульван [15 – 19].

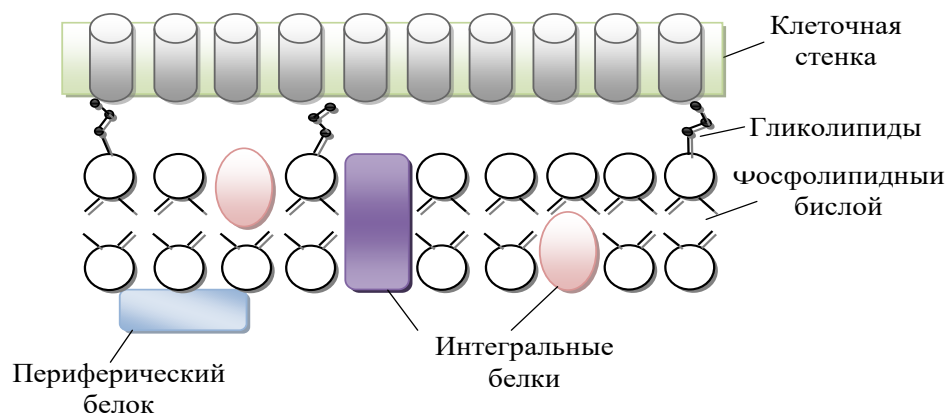


Рисунок 2 – Строение цитоплазматической мембраны микроводоросли *Chlorella*

Прокариотические микроводоросли – цианобактерии имеют сходные метаболические особенности с эукариотическими водорослями [20]. В настоящее время описано около пяти тысяч видов цианобактерий, разнообразных по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам [21]. Большинство видов цианобактерий содержат массив внутренних тилакоидных мембран, содержащих взаимосвязанные дыхательную и фотосинтетическую цепи переноса электронов. Цианобактерии обладают полноценным фотосинтетическим аппаратом и осуществляют как процесс фотосинтеза в тилакоидных мембранах, так и процесс аэробного дыхания в цитоплазме и в тилакоидных мембранах, за исключением представителей рода *Gloeobacter*, у которых есть только цитоплазматическая мембрана [20].

Цианобактерии представляют собой грамтрицательные кислородные фотосинтезирующие бактерии, которые обитают на Земле 2,8 млрд. лет, способствуют изменениям в геохимии и биологии нашей планеты. Эти микроорганизмы встречаются в различных экологических нишах: водные экосистемы, пустыни, полярные регионы, пещеры и даже в симбиозе с другими организмами, такими как грибы, с образованием, например, лишайников. Цианобактерии сформировали современную атмосферу Земли, обогатив ее кислородом, но при этом, они также могут наносить значительный вред экосистемам из-за токсического цветения, в процессе которого они выделяют токсины различной природы, вызывающие гибель многих организмов [22].

Биологически активные соединения цианобактерий ингибирующие рост, развитие и жизнеспособность различных организмов могут найти применение в фармацевтике, например, в качестве противовирусных и антибактериальных соединений. В настоящее время ученые активно интересуются этими микроорганизмами – потенциальными продуцентами новых антибиотиков.

Подобно грамтрицательным бактериям клеточная стенка цианобактерий состоит из плазматической мембраны, слоя пептидогликанов и внешней мембраны, однако строение клетки цианобактерий сложнее, чем у других прокариот. Внешняя мембрана образована белками, фосфолипидами и

липополисахаридами. Она служит барьером, защищающим клетку от проникновения многих соединений. Гребни внешней мембраны касаются наружного чехла клетки, а впадины через поры оболочки соединяются с внутренней клеточной мембраной. Слой гетерополимера – пептидогликана, расположенный между внутренней и внешней мембраной, определяет механическую прочность и упругость клеточной стенки. Структура пептидогликана, детально изученная у многих бактерий, у цианобактерий исследована в значительно меньшей степени. Известно, что слой пептидогликана в клетках цианобактерий может составлять от 22 до 52 % от веса клеточной стенки и он значительно толще (10 – 700 нм), чем у грамотрицательных бактерий (2 – 6 нм) [23].

Уникальные свойства цианобактерий – способность к синтезу множества биологически активных соединений наряду с высокой скоростью роста и адаптационными свойствами – делают их перспективными объектами для биотехнологии. Метаболиты цианобактерий с полезными свойствами, которые могут быть использованы в разных сферах человеческой деятельности и различных областях биотехнологии, в последние годы вызывают особенный интерес. Поиск новых биологически активных соединений для применения в фармацевтике, косметологии, пищевой, топливной и других отраслях промышленности в значительной степени связан с поиском микроорганизмов, которые не опасны для окружающей среды. Нетоксичные для человека антимикробные вещества особенно необходимы в фармакологии и в пищевой промышленности, в которой их применяют для защиты продуктов от порчи [24].

Планктонные виды нитчатых цианобактерий образуют дифференцированные спорообразные клетки – акинеты. Они покрыты плотной утолщенной оболочкой, содержат большой запас питательных веществ и превышают по размеру вегетативные клетки. Акинеты образуются из вегетативных клеток цианобактерий в ответ на неблагоприятные условия среды (недостаток света, питательных веществ и т.д.) [25].

Одним из наиболее перспективных продуцентов антибиотических веществ считается род цианобактерий *Anabaena* [26]. *Anabaena sphaerica* – представитель отдела *Cyanoprokaryota* (рис. 3). Встречается в виде одиночных нитей или пленчатых дерновинок. Клетки удлиненнобочковидные, от 3 до 6 мкм шириной и 3 – 7 мкм длиной [27]. Цианобактерии рода *Anabaena* способны фиксировать атмосферный азот. Является одним из родов цианобактерий, образующих токсины, которые представляют опасность для диких, сельскохозяйственных и домашних животных, а так же для человека. Некоторые виды *Anabaena* используют на рисовых полях как эффективное натуральное удобрение [25].

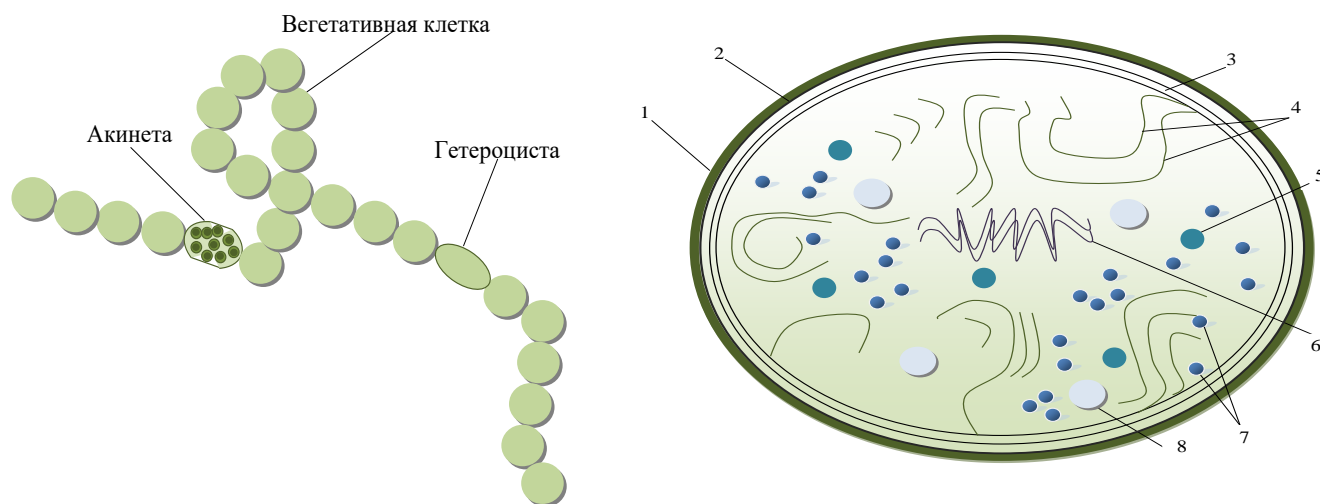


Рисунок 3 – Клетка цианобактерии *Anabaena*: 1 – студенистый слой; 2 – клеточная стенка; 3 – плазматическая мембрана; 4 – фотосинтетические мембраны; 5 – фикобилисомы; 6 – ДНК; 7 – рибосомы; 8 – газовые вакуоли

Так же важными цианобактериями, используемыми в биотехнологии, являются *Spirulina (Arthrospira) platensis*, *Anabaena*, *Nostoc commune* и *Aphanizomenon flosaquae* [26]. *Arthrospira platensis* и *Arthrospira maxima* служат хорошо усваиваемым дополнительным источником высококачественных белков, витаминов, минералов и незаменимых жирных кислот. Например, *Arthrospira*, состоящая на 24 % из углеводов, 51 – 71 % белков, 8 % липидов, считается богатым источником рибофлавина, тиамина, бета-каротина и витамина В₁₂ и доступна на рынке в виде капсул, гранул, порошка и таблеток. Клеточная стенка

Arthrospira состоит из четырёх слоев, состоящих из белковых нитей. Ближе к клеточной мембране расположены пептидогликансодержащий слой и фибриллярный. Толщина всех слоев варьируется в диапазоне от 10 до 15 нм и, следовательно, толщина цельной клеточной стенки составляет 60 нм. Так как *Arthrospira* не обладают целлюлозной клеточной стенкой, следовательно, белки из клеток данных микроорганизмов обладают более высокой усвояемостью [26 – 28].

1.1.2 Основные биохимические процессы в клетках микроводорослей и цианобактерий

Выделяют три способа культивирования микроводорослей: автотрофный (в качестве источника энергии используется свет), гетеротрофный (с добавлением источников органического углерода) и миксотрофный (в дополнение к барботированию CO_2 в среду добавляют источник органического углерода) [29]. При автотрофном культивировании биосинтез углеводов инициируется фиксацией CO_2 через цикл Кальвина-Бенсона [30]. Эволюция хлоропластов позволила фотосинтетическим микроорганизмам развиваться в биофабрики, потребляющие CO_2 , которые производят широкий спектр органических соединений. Светозависимые и светонезависимые реакции работают синхронно для достижения фотосинтетической ассимиляции CO_2 в клетках [31]. Эти реакции протекают в хлоропластах микроводорослей – органеллах с двухслойной мембраной, содержащих тилакоиды и строму. Тилакоиды представляют собой дискообразные мешочки, которые окружены жидким матриксом стромы. Светозависимые реакции происходят в мембранах тилакоидов, чтобы обеспечить необходимую энергию для CO_2 биофиксации во время светонезависимых реакций [32].

Ассимиляция углекислого газа у фототрофных микроорганизмов протекает в три стадии.

Стадия 1. Фиксация CO_2 в форме 3-фосфоглицерата. Главный секрет механизма ассимиляции CO_2 фотосинтезирующими организмами был разгадан в конце 1940-х гг. Кальвином и его коллегами. Они инкубировали суспензию

зеленых водорослей в атмосфере радиоактивно меченного углекислого газа ($^{14}\text{CO}_2$) при кратковременном ее освещении в течение нескольких секунд. После быстрого разрушения этих клеток и разделения полученного клеточного гомогената хроматографическими методами были обнаружены метаболиты, содержащие метку ^{14}C . Первым соединением, в котором обнаруживалась радиоактивная метка, был 3-фосфоглицерат, главным образом ^{14}C -карбоксил. Включение CO_2 в органические соединения катализирует фермент рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа, сокращенно рубиско. Как карбоксилаза, рубиско катализирует ковалентное присоединение CO_2 к пятиуглеродному сахару рибулозо-1,5-бисфосфату и расщепляет нестабильный шестиуглеродный интермедиат на две молекулы 3-фосфоглицерата, одна из которых несет углерод, введенный как CO_2 в карбоксигруппу. У микроводорослей рубиско представлен формой I – восемь идентичных больших субъединиц ($M_r = 53000$; кодированы в геноме хлоропластов или пластоме; каждая субъединица содержит каталитический центр) и восемь одинаковых малых субъединиц ($M_r = 14000$; кодированы в ядерном геноме) с неопределенной функцией. Особенность этого фермента – низкое число оборотов: только три молекулы CO_2 в секунду фиксируются рубиско при $25\text{ }^\circ\text{C}$. Для достижения высокой скорости фиксации CO_2 фототрофные микроорганизмы нуждаются в большом количестве этого фермента [32].

Стадия 2. Превращение 3-фосфоглицерата в глицеральдегид-3-фосфат. 3-фосфоглицерат, образовавшийся на первой стадии, превращается в глицеральдегид-3-фосфат в две стадии. В первой реакции стромальный фермент 3-фосфоглицераткиназа катализирует перенос фосфорильной группы с АТФ на 3-фосфоглицерат, превращая его в 1,3-бисфосфоглицерат. Затем особый изозим в хлоропласте – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа – восстанавливает 1,3-бисфосфат, окисляя НАД(Ф)Н с образованием глицеральдегидтрифосфата и фосфата. Триозофосфатизомераза осуществляет взаимопревращение глицеральдегид-3-фосфата и дигидрооксиацетонфосфата. Большинство молекул

триозофосфата, которые получаются таким образом, затем используется для регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата [32].

Стадия 3. Регенерация рибулозо-1,5-бисфосфата из триозофосфатов. В первой реакции ассимиляции CO_2 в триозофосфаты расходуется рибулозо-1,5-бисфосфат, и для непрерывного превращения CO_2 в углеводы рибулозо-1,5-бисфосфат должен постоянно регенерироваться в серии реакций, которые составляют циклический путь цикла Кальвина-Бенсона (рис. 4). Продукт первой реакции ассимиляции (3-фосфоглицерат) подвергается различным превращениям, в результате которых образуется рибулозо-1,5-бисфосфат. Интермедиаты этого пути представляют собой трех-, четырех-, пяти-, шести- и семиуглеродные сахара. В результате трех оборотов цикла Кальвина из трех молекул CO_2 и одной молекулы фосфата образуется одна молекула триозофосфата. Три молекулы рибулозо-1,5-бисфосфата (всего 15 атомов углерода) конденсируются с тремя молекулами CO_2 (три атома углерода) с образованием шести молекул 3-фосфоглицерата (18 атомов углерода). Эти шесть молекул 3-фосфоглицерата восстанавливаются до шести молекул глицеральдегид-3-фосфата с расходом шести молекул АТФ и шести молекул НАД(Ф)Н. В итоге ассимиляции углерода образуется только одна молекула глицеральдегид-3-фосфата. Другие пять молекул триозофосфата (15 атомов углерода) перегруппировываются с образованием трех молекул рибулозо-1,5-бисфосфата (15 атомов углерода). Последняя стадия требует участия одной молекулы АТФ на одну молекулу рибулозо-1,5-бисфосфата, т.е. всего три молекулы АТФ. В итоге на каждую молекулу триозофосфата, полученную при фотосинтетической ассимиляции CO_2 приходится шесть молекул НАД(Ф)Н и девять молекул АТФ. НАД(Ф)Н и АТФ производятся в светозависимых реакциях фотосинтеза примерно в том же соотношении (2 : 3), в котором они потребляются в цикле Кальвина-Бенсона [32].

Девять молекул АТФ превращаются в АДФ и фосфат при синтезе молекулы триозофосфата; восемь фосфатов высвобождаются и конденсируются с восемью молекулами АДФ, регенерируя АТФ. Девятый фосфат включается в триозофосфат [32].

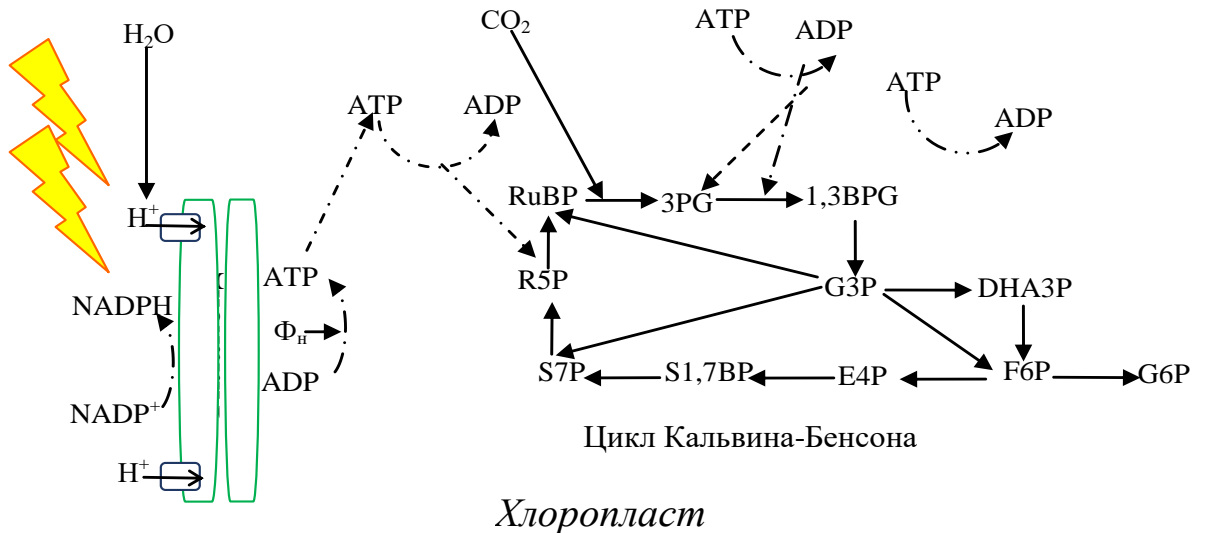


Рисунок 4 – Третья стадия ассимиляции CO_2 : RuBP – рибулозо-1,5-дифосфат; 3PG – 3-фосфоглицерат; 1,3BPG – 1,3-дифосфоглицерат; G3P – глицеральдегид-3-фосфат; DHA3P – дегидроксиацетон-3-фосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; G6P – глюкозо-6-фосфат; E4P – эритрозо-4-фосфат; S7P – седогептулозо-7-фосфат; S1,7BP – седогептулозо-1,7-дифосфат; R5P – рибозо-5-фосфат

В светонезависимой фазе фотосинтеза (Цикл Кальвина-Бенсона) энергия химических связей, образующихся во время световой фазы (АТФ и НАД(Ф)Н), используется для синтеза органических соединений в ходе фиксации неорганического углерода. Ключевой фермент рибулозобисфосфаткарбоксилаза / оксигеназа катализирует добавление одной молекулы CO_2 к одной молекуле рибулозо-1,5-бисфосфата – главного акцептора CO_2 при его фиксации для получения двух молекул глицеральдегид-3-фосфата – ключевого метаболита, участвующего в процессах аэробного дыхания и регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата [32].

При гетеротрофном и миксотрофном культивировании путь образования G3P зависит от источника органического углерода. При использовании в качестве сырья глюкозы, G3P образуется в процессе гликолиза [32].

Центральный метаболизм цианобактерий включает цикл Кальвина-Бенсона, различные варианты гликолитических путей и цикл трикарбоновых кислот. Цикл

трикарбоновых кислот у цианобактерий осуществляется с образованием сукцината – важного донора электронов для окислительного фосфорилирования.

Вклад углерода в центральный метаболизм может быть получен в результате фиксации углерода в виде CO_2 , путем импорта глюкозы или катаболизма гликогена (при избытке сахаров). Способность перерабатывать глюкозу позволяет некоторым цианобактериям, включая некоторые штаммы *Synechocystis*, расти гетеротрофно или миксотрофно.

Гликолитические пути метаболизма цианобактерий включают: гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса), пентозофосфатный путь окисления углеводов (через промежуточный продукт рибулозо-5-фосфат, который превращается в глицеральдегид-3-фосфат) и путь Энтнера-Дудорова (этот путь позволяет превращать глюкозу в промежуточный 6-фосфоглюконат, который затем превращается в глицеральдегид-3-фосфат). Все они предоставляют АТФ, НАД(Ф)Н для синтеза аминокислот, нуклеотидов и жирных кислот. Множественные гликолитические пути цианобактерий различаются по количеству молекул АТФ и НАД(Ф)Н, которые они производят на молекулу катаболизированной глюкозы, в диапазоне от 1 до 2,33 АТФ и от 0 до 5,33 НАД(Ф)Н. Эти пути позволяют цианобактериям быстро реагировать на изменения энергии, поступающей от солнечного света и/или органических соединений [32 – 35].

1.2 Биологически активные метаболиты микроводорослей и цианобактерий

1.2.1 Антибактериальные пептиды микроводорослей и цианобактерий

Биологически активные метаболиты цианобактерий относятся к различным классам органических соединений, включая липиды, аминокислоты, макролиды и др. По химическому строению и свойствам выделяют десять основных классов соединений: алкалоиды, терпены, пептиды, депсипептиды, липопептиды, макролиды, лактоны, полисахариды, липиды и поликетиды. Клетки микроводорослей способны накапливать значительное количество белка, углеводы, липиды с богатым набором жирных кислот, пигменты разных классов

(каротиноиды, хлорофилл), витамины, стерины, антибиотики и токсины. В частности, вещества, обладающие антибактериальным действием, принадлежат к разным химическим группам: пептиды, алкалоиды, терпены, липиды, полифенолы и др. [36].

Биологически активные антибактериальные пептиды представляют собой катионные молекулы длиной 8 – 45 аминокислотных остатков, молекулярной массой ниже 10 кДа, их усредненный заряд равен $+3,2$. Антибактериальные пептиды можно разделить на три группы в зависимости от структурных особенностей: 1) α -спиральные линейные пептиды; 2) циклические пептиды с дисульфидным мостиком и циклические пептиды с открытым концом; 3) пептиды, первичные структуры которых имеют высокое содержание некоторых аминокислотных остатков (например, высокое содержание пролина, глицина или гистидина). Эффективность биологически активных пептидов как противомикробных агентов зависит от структурных свойств (например, размера пептида, аминокислотного состава или заряда). Большинство пептидов имеют амфипатическую структуру, обладающую как гидрофильными, так и гидрофобными свойствами, которые облегчают их взаимодействие с анионными клеточными стенками и мембранами микроорганизмов [45]. Среднее количество аминокислотных остатков в таких пептидах равно 32 [42]. Для большинства пептидов характерно высокое содержание основных (лизин, аргинин, гистидин) и неполярных гидрофобных аминокислотных остатков (аланин, изолейцин, лейцин, валин). Доля последних в молекуле пептида может составлять до 30 – 50 % [42 – 44].

Аминокислотные последовательности и аминокислотные составы пептидов также определяют пространственные структуры и разнообразие механизмов, лежащих в основе их антимикробных эффектов. Важнейшее преимущество пептидов перед традиционными антибиотиками состоит в меньшей способности стимулировать развитие резистентности, что говорит о том, что микроводоросли и цианобактерии могут быть перспективными продуцентами антибиотических

веществ, и необходимо расширение знаний в области изучения метаболитов этих микроорганизмов, а также механизма их антибиотического действия.

Гидролиз внутриклеточных и внеклеточных белков до пептидов может осуществляться действием высокой температуры, физическими методами (ультразвуковая обработка), методом ферментативного гидролиза. Наиболее распространенным и простым методом получения биоактивных пептидов является ферментативный гидролиз [37], который является наиболее предпочтительным методом, обеспечивая направленное действие, более высокий выход и отсутствие токсичных побочных продуктов.

Тип фермента является одним из основных параметров, определяющих процесс гидролиза. Предпочтительно используются растительные ферменты (папаин) и животные ферменты (пепсин, химотрипсин и трипсин). Наиболее значимым фактором является состав белка, связанный с определенными аминокислотами последовательностями, по отношению к которым ферменты обладают различной специфичностью. На активность фермента будут влиять условия реакции: pH и температура, особенно при гидролизе белков более чем одним ферментом (одновременно или последовательно).

Beaulieu и др. экстрагировали антибактериальные пептиды (массой >10 кДа) из бурых водорослей *Saccharina longicruris* путем ферментативного гидролиза трипсином [38]. Максимальная удельная скорость роста бактерии порчи пищевых продуктов *Staphylococcus aureus* была значительно снижена при использовании гидролизата при концентрациях от 31 мг / мл до 2,5 мг / мл. В исследовании [39] белковый гидролизат микроводорослей, полученный с применением фермента пепсина, ингибировал рост грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ($1,0 \cdot 10^6$ КОЕ/мл), при концентрации 5000 мкг зона ингибирования составляла $15,7 \pm 1,0$ мм.

Ультразвуковая обработка так же является перспективным методом для гидролиза белков до биоактивных пептидов. Влияя на водородные связи и гидрофобные взаимодействия, ультразвук разрушает третичные и четвертичные структуры белка из-за кавитационных эффектов [39, 40].

Антибактериальные цианопептиды имеют различную структуру (табл. 2), но в основном представляют собой циклические пептиды из цианобактерий *Anabaena*, *Oscillatoriales* и *Nostocales*.

Циклический пептид анабенопептин (ABPN) впервые был обнаружен у пресноводной цианобактерии *Dolichospermum flos-aquae* (*Anabaena flos-aquae*) [46]. В настоящее время выделено более 100 анабенопептинов цианобактерий, включая продукты метаболизма *Aphanizomenon flos-aquae*, *Planktothrix agardhii* (*Oscillatoria agardhii*) и др., не только пресноводных, но и морских видов цианобактерий.

Антибактериальная активность, описанная для пептидов микроводорослей, значительно ниже и ограничивается гидролизатами белков микроводорослей *Chlorella* и несколькими пептидами *Tetraselmis suecica*. Со времени первого описания цианобактериального пептида с антибактериальной активностью был описан циклический пептид шизотрим А, выделенный из культуры *Schizothrix* sp [43], а также многие другие пептиды, противомикробное действие которых доказано различными исследованиями [44 – 61].

В исследовании [47] авторами установлена антибактериальная активность циклических пептидов, извлеченных из пресноводных цианобактерий *Lyngbya* sp. Пептиды были названы *lyngbyazothrins A, B, C* и *D* и их различные комбинации проявляли антибактериальную активность как в отношении грамположительных (*Bacillus subtilis*), так и в отношении грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens*).

Понятие «пептидные» достаточно широкое и включает в себя биологически активные продукты разной структуры. Известны, в частности, антибиотики, нашедшие применение в клинической практике. К ним относятся полимиксины, циклические пептиды. Сегодня в медицине используют полимиксин Е (колистин) и полимиксин В. Оба препарата активны в отношении грамотрицательных бактерий (включая *Pseudomonas aeruginosa*).

А так же грамицидин – циклический пептид широкого спектра действия, активный, в том числе против палочки туберкулеза [56].

Таблица 2 – Цианобактериальные пептиды с антибактериальной активностью

Пептид	Продуцент	Бактерии-мишени	Активность	Ссылка
Циклический ундекапептид	<i>Tychonema</i> sp.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ИК ₅₀ = 7,3 – 8 мкМ	[43]
Циклический	<i>Microcystis</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>	МИК = 2,2 мкг/мл	[47]
Депсипептид	<i>Anabaena cylindrica</i>	<i>Moxarella catharralis</i>	МИК = 32 мкг/мл	[48]
Циклический	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ДИЗ = 7 мм при 25 мкг	[49]
Липопептид	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	МИК = 1 мкг/мл	[49]
Циклический ундекапептид	<i>Lyngbya</i> sp.	<i>Micrococcus flavus</i>	ДИЗ = 8 мм при 100 мкг	[47, 50 – 51]
Циклический липопептид Циклический ундекапептид	<i>Lyngbya</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>	ДИЗ = 18 мм при 125 мкг	[47, 50 – 51]
		<i>Escherichia coli</i>	ДИЗ = 18 мм при 100 мкг	
		<i>Escherichia coli</i>	ДИЗ = 15 мм при 100 мкг	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ДИЗ = 8 мм при 100 мкг	
		<i>Serratia marcescens</i>	ДИЗ = 8 мм при 200 мкг	
Циклический липопептид	<i>Oscillatoria</i> sp.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	МИК = 23,8 мкг/мл	[50]
Линейный	<i>Nostoc muscorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	ДИЗ = 3 – 6 мм	[52]
Циклический липопептид	<i>Lyngbya</i> sp.	<i>Bacillus megaterium</i>	МИК = 5,5 мкг/мл	[53]
		<i>Bacillus subtilis</i>	МИК = 10 мкг/мл	
Пептидная фракция (<3 кДа)	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Escherichia coli</i>	ИК ₅₀ = 15,2 % при 625 мкг/мл	[54]
		<i>Staphylococcus aureus</i>	ИК ₅₀ = 19,6% при 625 мкг/мл	
Циклический депсипептид	<i>Lyngbya majuscula</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ДИЗ = 40 мм при 100 мкг/диск	[55]
Липопептид	<i>Scytonema</i> sp.	<i>Mycobacterium</i> sp.	МИК = 1 мг/мл	[55]

МИК – минимальная ингибирующая концентрация, ДИЗ – диаметр зоны ингибирования (мм), ИК₅₀ – половинная ингибирующая концентрация, % ингибирования.

В исследовании [57] аминокислотная последовательность пептидных фракций, выделенных из белковых гидролизатов *Spirulina platensis*, определялась как *Lys-Leu-Val-Asp-Ala-Ser-His-Arg-Leu-Ala-Thr-Gly-Asp-Val-Ala-Val-Arg-Ala*. В таблице 2 приведены основные пептиды цианобактерий, виды-продуценты, их структура и их влияние на известные патогенные бактерии-мишени.

Sun Y. и др. [59] получили антибактериальный пептид из *Spirulina platensis* путем ферментативного гидролиза с использованием ферментов щелочной протеазы и папаина. Они показали, что минимальная ингибирующая концентрация антибактериального пептида *Spirulina platensis* составляла 8 мг/мл для *Escherichia coli* и 16 мг/мл для *Staphylococcus aureus*. Что доказывает, что пептиды *Spirulina platensis* можно рассматривать как потенциальные перспективные антимикробные агенты.

В исследовании [60] был выделен и идентифицирован циклический пептид из *Nostoc calcicola*, названный ностофицином. Он содержит глицин, глютамин, фенилаланин, изолейцин, пролин и новую аминокислоту Ahoa ((2S,3R,5R)-3-амино-2,5-дигидрокси-8-фенилоктановая кислота). Подобные β -аминокислоты также обнаружены в нескольких пептидах, выделенных из цианобактерий. Ностофицин проявляет хорошую антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) и грибов (*Aspergillus niger* и *Candida albicans*).

В работах [61, 62] авторами установлена антибактериальная активность пептидных фракций, извлеченных из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*, против *Escherichia coli*. Эффект гидролизата был в несколько раз больше, чем эффект белков микроводорослей, что свидетельствует о том, что пептиды провоцировали разрыв клеточной стенки бактерий и ингибирование роста клеток. Гидролизаты пепсина и пептидные фракции из *Chlorella sorokiniana* проявляли антибактериальную активность в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [63].

В исследовании [64] оценивалась антибактериальная активность микроводоросли *Nannochloropsis sp.*, которая является важным источником белка.

За счет ферментативного гидролиза комплексом папаин-панкреатиновых протеаз белкового экстракта, полученного из микроводоросли, была достигнута степень гидролиза более 80 %. Низкомолекулярные пептиды (<3 кДа) продемонстрировали значительный процент ингибирования *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Лектины представляют собой разнообразную группу белков, которые встречаются в животных, растениях, водорослях, бактериях и вирусах [65]. Holanda и др. [66] оценили ингибирующее действие лектиновых экстрактов из красной водоросли *Solieria filiformis* против грамотрицательных и грамположительных бактерий. При концентрации 1000 мкг/мл экстракт подавлял рост грамотрицательных видов *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus*. Считается, что связывание лектина с маннаном ингибирует рост бактерий. Маннан представляет собой линейный полимер сахаридного мономера маннозы и встречается на поверхности клеток грамотрицательных бактерий. Однако, в исследовании [67] не наблюдалось ингибирования роста грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, возможно, из-за отсутствия на поверхности клеток этих бактерий маннана.

В работе [68] изучалась антибактериальная активность пептидных фракций цианобактерий *Spirulina platensis* в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных бактерий *Escherichia Coli*. Было установлено, что максимальный антибактериальный эффект в отношении бактерий наблюдался при применении пептидной фракции <10 кДа, полученной путем гидролиза белков пепсином.

Механизм действия пептидов цианобактерий и микроводорослей на бактериальные клетки полностью не изучен, необходимы дальнейшие исследования. Для катионных пептидов, из микроводорослей, как предполагается, механизм действия основан на разрушении фосфолипидного бислоя после специфического внедрения в бактериальную клеточную мембрану. Специфичность в основном достигается разным электрическим зарядом внешнего

полуслоя клеточной мембраны у прокариот и высших эукариот. Для других пептидов механизм действия отличается, предполагается, что они воздействуют на внутриклеточные мишени.

1.2.2 Вещества липидной природы антибактериального действия

Антимикробные липиды определяются как одноцепочечные амфифильные липиды, которые взаимодействуют с мембранами бактериальных клеток и проявляют антибактериальную активность. Жирные кислоты являются широко изученным типом противомикробных липидов и представляют собой амфипатические молекулы, в которых углеводородная цепь составляет гидрофобную часть, а группа карбоновой кислоты является гидрофильной (либо полярной, либо анионной в водных растворах, в зависимости от значений pH). Жирные кислоты длиной менее 8 атомов углерода определяются как короткоцепочечные, в то время как жирные кислоты с более чем 12 атомами углерода являются жирными кислотами с длинной цепью, а жирные кислоты со средней длиной цепи имеют в своем составе от 8 до 12 атомов углерода [69 – 73].

Антибактериальное действие жирных кислот было описано в 1880-х годах впервые Робертом Кохом и его коллегами. Они обнаружили, что данные соединения ингибируют рост бактерий *Bacillus anthracis* [69]. Позже исследователи обратили внимание на такие омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, как докозагексаеновая кислота (ДГК) и эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) (рис. 5).

Установлено, что данные жирные кислоты могут потенциально использоваться в качестве антибактериальных и антибиопленочных средств против перипротезных инфекций суставов, вызванных штаммами с множественной лекарственной устойчивостью (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*). Многочисленные механизмы, придающие жирным кислотам их антибактериальную активность, еще полностью не изучены [69].

Обширный скрининг антибактериальной активности жирных кислот был проведен Кабара и его коллегами в 1970-х годах. Были оценены жирные кислоты с

углеводородными цепями длиной от 6 до 18 атомов углерода, что привело к идентификации лауриновой кислоты (C12:0) как наиболее мощного противомикробного липида для ингибирования роста грамположительных бактерий.



Рисунок 5 – Формулы жирных кислот (ЭПК и ДГК)

Как правило, этерификация жирной кислоты в соответствующее производное моноглицерида увеличивает его антибактериальную активность [74].



Рисунок 6 – Формулы жирных кислот (олеиновая, линолевая и линоленовая)

Другое исследование, подтверждающее высокую антибактериальную активность линолевой кислоты, было проведено с различными типами грамположительных бактерий и продемонстрировало, что ненасыщенные жирные кислоты с длинными цепями из 18 атомов углерода – олеиновая кислота (C18:1), линолевая (C18:2) и линоленовая кислота (C18:3) (рис. 6) также обладают мощной антибактериальной активностью [69].

В дополнение к жирным кислотам другие липидные соединения, такие как моноглицериды, которые состоят из жирной кислоты, связанной с молекулой глицерина посредством сложноэфирной связи, обладают антибактериальной активностью. По сравнению с жирными кислотами моноглицериды отличаются отсутствием ионизируемых функциональных групп при соответствующих условиях pH и, следовательно, представляют собой неионогенные молекулы с нейтральным электрическим зарядом и некоторой степенью полярности [76 – 82].

Wang и др. исследовали эффективность жирных кислот и моноглицеридов против *Listeria monocytogenes*, грамположительной бактерии, вызывающей ряд пищевых инфекций. Из протестированных жирных кислот и моноглицеридов лауриновая кислота, линоленовая кислота и монолаурин (моноглицерид лауриновой кислоты) проявляли самую сильную бактерицидную активность при концентрациях 10 – 20 мкг/мл при pH 5. Бактерицидная активность жирных кислот зависела от pH раствора, т.е. наблюдалась повышенная активность при pH 5 по сравнению с pH 6, в то время как на антимикробную активность моноглицерида не влиял pH раствора [75].

Важным параметром антимикробной активности липидов является количество степеней ненасыщенности. В некоторых работах активность насыщенных жирных кислот также изучалась в зависимости от длины углеводородной цепи [69 – 85]. При исследовании насыщенных жирных кислот с углеводородными цепями длиной от 6 до 18 атомов углерода было установлено, что лауриновая кислота, имеющая в своем составе 12 атомов углерода, проявляет наиболее сильную активность в отношении грамположительных бактерий, включая *Staphylococcus aureus*, основного возбудителя бактериальных инфекций кожи. Моноглицерид лауриновой кислоты показал еще большую эффективность против *Staphylococcus aureus*, о чем свидетельствует более низкое значение минимальной ингибирующей концентрации по сравнению с лауриновой кислотой [69].

Антибактериальные соединения липидной природы, присутствующие в экстрактах микроводорослей и цианобактерий, в основном представлены

триацилглицеридами, среднецепочечными свободными жирными кислотами, длинноцепочечными ненасыщенными жирными кислотами и их моноглицеридами. В исследовании, проводимом Робертом Прэттом, было установлено, что микроводоросль *Chlorella vulgaris* проявляет антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacterium coli* и *Pseudomonas pyocyanea*. Вещества, выделенные из экстрактов, были названы «хлореллин» [84].

В ходе проведенных дальнейших исследований по влиянию возраста культуры микроводорослей на антибактериальную активность, обнаружено, что концентрация хлореллина первоначально накапливалась в культуральной среде в течение 48 ч после инокуляции. Затем уменьшалась с 3 по 6 день и непрерывно увеличивалась до 14 дня, после чего концентрация не изменялась в течение 6 недель [84]. Данные других исследований, изучающих антимикробную активность у *Cyanophyta* с использованием метода дисковой диффузии, так же показывают, что возраст культуры микроводорослей влияет на антимикробную активность [85 – 88].

Хотя накопление липидов в клетках фототрофных микроорганизмов в значительной степени зависит от условий культивирования, содержание липидов в микроводорослях *Nannochloropsis oceanica*, *Chlorella vulgaris* или *Scenedesmus obliquus*, может составлять более 20 % их сухой массы [89]. В исследованиях [90 – 96] установлен антибактериальный эффект жирных кислот выделенных из различных видов микроводорослей (*Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorococcum HS-101*, *Dunaliella primolecta*, *Phaeodactylum tricornutum* и т. д.) по отношению, как к грамположительным, так и к грамотрицательным бактериям. Например, пальмитолеиновая кислота и гексадекатриеновая кислота из диатомовых водорослей *Phaeodactylum tricornutum* обладают антибактериальной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* [96].

Антагонистические взаимодействия водорослей и бактерий описаны в работах отечественных ученых. В исследовании [86] установлено, что культуры зеленых одноклеточных водорослей *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus magnus*,

Pediastrum duplex, *Chlorella vulgaris*, *Monoraphidium arcuatum* и *Dictyosphaerium* sp. обладали наиболее выраженной антагонистической активностью по отношению к условно патогенным бактериям *Escherichia coli*, *Klebsiella ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Установлено, что клеточные экстракты всех исследуемых штаммов водорослей оказывали высокое ингибирующее воздействие на *Escherichia coli*, подавляя рост культуры на 60 – 95 %. В исследовании [87] представлены результаты по изучению влияния антибактериальных свойств альгологического комплекса микроводорослей на патогенную микрофлору сточных вод. Установлено, что экстракт фитопланктона обладал антибиотической активностью: вокруг дисков в опытных чашках были обнаружены 2-миллиметровые зоны задержки роста *Escherichia coli* и *Salmonella dublin*. В исследовании [102] было доказано, что наиболее мощной антимикробной активностью обладают О-диалкилмоноглицериды, а так же триацилглицериды и жирные кислоты, выделенные из микроводорослей *Chlorella*.

Davoodbasha [97] дополнительно исследовал высокое содержание метиловых эфиров пальмитиновой кислоты (C16:0) из *Scenedesmus* sp. и установил его антимикробное действие против различных бактерий и грибов. Метиловые эфиры жирных кислот показали более высокую ингибирующую активность в отношении грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) по сравнению с грамположительными бактериями, при этом минимальная ингибирующая концентрация составляла около 12 мкг/мл.

В исследовании [98] авторы установили антимикробную активность липидно-пигментного комплекса, выделенного из микроводорослей *Chlorella vulgaris* и цианобактерий *Arthrospira platensis*. Анализ результатов показал наличие антимикробной активности липидно-пигментного комплекса в отношении *Escherichia coli* (диаметры зон ингибирования составили $17,0 \pm 0,47$ мм у микроводорослей и $17,0 \pm 0,21$ мм у цианобактерий) и *Bacillus pumilus* (максимальные диаметры зон ингибирования составили $16,0 \pm 0,27$ мм у *Chlorella vulgaris* и $16,0 \pm 0,22$ мм у *Arthrospira platensis*). Минимальная ингибирующая концентрация против грамположительных бактерий составляла 3 мкг/диск,

против грамотрицательных бактерий – 2 мкг/диск.

В исследованиях [99, 100] было установлено, что липидные экстракты цианобактерий *Anabaena* проявляют антибактериальные свойства в отношении *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*.

В работе [88] экстракт морских водорослей *Fucus evanescens*, содержащий в своем составе гликолипиды, проявил антибактериальную активность против широкого спектра как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. В исследовании [89] в состав липидной фракции, выделенной из красной водоросли *Chondria armata*, входили гликолипиды, в том числе идентифицированный биоактивный липид, названный MGDG (20:5/16:0). Данная фракция проявила антибиотическую активность в отношении культур: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* и *Klebsiella* sp.

Еще одним важным классом липидов являются фосфолипиды, которые входят в состав клеточных мембран фототрофных микроорганизмов. Микроводоросли содержат три основных фосфолипида: фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин, которые проявляют разнообразную биологическую противоопухолевую, противовирусную и антибактериальную активности. Недавние исследования показывают, что фосфолипиды проявляют антибиопленочную активность.

Лизофосфатидилхолин (ЛФХ) проявлял антибиопленочную активность в отношении *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* и *Candida parapsilosis*. ЛФХ также был выделен из метанольного экстракта цианобактерий *Oscillatoria subuliformis* [101].

По результатам литературного обзора установлено, что на сегодняшний день не найдены исследования, оценивающие антибиотический потенциал пептидных и липидных экстрактов микроводорослей и цианобактерий при световом излучении, для проверки гипотезы о том, что в процессе эволюции фототрофные микроорганизмы получили способность синтезировать метаболиты, которые проявляют антибиотические свойства при воздействии светового излучения.

1.2.3 Биологически активные метаболиты микроводорослей стимулирующего действия

Одним из наиболее интересных продуктов, получаемых из биомассы *Chlorella*, является водный экстракт, который содержит комбинацию веществ, названных «фактором роста» хлореллы (*Chlorella growth factor*) – он включает в себя аминокислоты, пептиды, белки, витамины, минералы, сахара и нуклеиновые кислоты, которые могут положительно влиять на процесс культивирования различных микроорганизмов.

В ходе исследования [103] было установлено, что водный экстракт *Chlorella* способен оказывать защитное действие на дрожжевые клетки, выращенные на среде Saburo, в этаноловой среде: внесение в состав суспензии водного экстракта *Chlorella* в количестве 0,1 % (об.) значительно увеличивало жизнеспособность дрожжевых клеток – ≈ 95 % живых клеток на 17 дней, в то время как в контроле (суспензия дрожжей без добавления экстракта) ≈ 29 %. Водный экстракт *Chlorella* был получен при дезинтеграции клеток микроводорослей ферментативным препаратом Cellulox-A, в качестве экстрагента использовалась горячая вода (95 °C), взятая в соотношении 1 г биомассы: 10 мл воды. Экстракция осуществлялась в ультразвуковом экстракторе (Elma Schmidbauer GmbH, Германия) при частоте ультразвука 80 кГц в течение 20 минут.

В исследовании [104] изучались эффективные способы получения водных экстрактов *Chlorella pyrenoidosa* с использованием для дезинтеграции клеток микроводорослей высокого давления, обработку ультразвуком и с применением ферментов целлюлазы и пектиназы. Полученные экстракты сравнивались между собой по количественному и качественному составу, а также величине биологической активности этих продуктов. Выход продукта при дезинтеграции клеток с помощью высокого давления и ферментов составил более 25 %. Экстракт, полученный с помощью метода дезинтеграции с применением высокого давления (температура 121 °C, время 40 мин) имел самую высокую концентрацию белка ($44,97 \pm 1,42$ мг/г экстракта) и проявлял наибольшую биологическую активность: культивируемый макрофаг Ana-1 пролиферировал до 162,98 % по

сравнению с контролем при введении данного экстракта в количестве 200 мкг/мл, также у данного макрофага значительно возростала фагоцитарная активность и внутриклеточный уровень оксида азота Ana-1. Таким образом, водный экстракт из *Chlorella pyrenoidosa* имеет большой потенциал для активации макрофагов.

В исследовании [105] из клеток микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa* и дрожжей *Candida utilis* было выделено вещество, стимулирующее клеточное деление этих микроорганизмов. Синтез этого фактора роста, индуцирующего деление (DIF), происходит у *Chlorella pyrenoidosa* в течение первой половины цикла развития. Этот фактор роста стимулирует процессы гликолиза и аэробного окисления. В аэробных условиях, при наличии источника энергии и выделенного фактора роста, деление клеток происходит без одновременного укрупнения клеток. Следовательно, по мнению авторов статьи, наличие в составе данной системы фактора роста позволяет разделить процессы роста и деления, при этом деление может осуществляться без процесса роста клеток.

В работе [106] исследовали влияние экстрактов горячей воды *Chlorella vulgaris* (CVE) на пролиферацию клеток и связанные с ними сигнальные пути в эпителиальных клетках кишечника крыс (IEC-6). Экстракт стимулировал пролиферацию этих клеток через 24 часа инкубации в бессывороточных условиях. CVE увеличивал экспрессию рецептора инсулиноподобного фактора роста-I (IGF-IR) и фосфорилирование киназы фокальной адгезии (ФАК) и Src-киназы, индуцировал активацию митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/Akt. Также было подтверждено повышенное фосфорилирование киназы, связанной с внеклеточным сигналом (ERK - extracellular signal-regulated kinase) и Akt (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha), а также повышенную экспрессию регуляторной субъединицы PI3K p85. CVE также влиял на сигнальный путь Wnt через повышенную экспрессию ядерного β -катенина, циклина D1. Таким образом, CVE стимулировал пролиферацию и рост клеток IEC-6 через МАРК, PI3K/Akt и путь Wnt. Эти сигнальные пути являются межвидовыми и консервативными и регулируют экспрессию белка [107], и воздействие на них потенциально может

улучшить продукцию белка [108]. Исследование подтвердило, что водные экстракты *C. vulgaris* содержат биоактивные полисахариды, которые оказывают важное клеточное пролиферативное действие посредством путей индукции генов. Эти полисахариды были идентифицированы как фенольные соединения, связанные с углеводами в виде гликозидов [109], обладают мощными антиоксидантными свойствами [110] и могут защитить клетки от повреждения, вызванного удалением сыворотки [111].

В исследовании [112] изучили использование экстрагированных биоактивных компонентов микроводорослей *Chlorella vulgaris*, называемых фактором роста хлореллы (CGF), в качестве добавки к питательной среде при культивировании клеток для замены фетальной бычьей сыворотки (FBS) и индукции экспрессии белка. CGF успешно стимулировал рост яичников китайского хомяка (СНО) и мезенхимальных стволовых клеток (MSC) как в 2D, так и в 3D клеточных культурах в условиях пониженного содержания сыворотки в течение 21 дня. Кроме того, CGF сохранял функции клеток, о чем свидетельствует увеличение экспрессии белка в клетках СНО и поддерживал фенотип стволовых клеток (MSC). CGF является жизнеспособной добавкой к культуральной среде с широким спектром применений в биотехнологии и тканевой инженерии.

По результатам обзора предложены потенциальные механизмы стимулирующего действия водорастворимых экстрактов. Однако, на сегодняшний день не найдены исследования, оценивающие потенциал белковых экстрактов микроводорослей *Chlorella* в качестве компонента питательной среды для культивирования основных классических биологических агентов, применяемых в промышленной биотехнологии – эукариотических организмов (дрожжей).

1.3 Влияние условий культивирования фототрофных микроорганизмов на синтез биологически активных соединений

Интенсивность протекания процессов жизнедеятельности микроводорослей зависит от комбинации различных условий роста клеток: температуры, pH,

длительности фотопериода и интенсивности освещения, состава и количества питательных веществ.

Температура рассматривается как один из критических факторов для роста микроорганизмов и биохимического состава клеток. При повышенной и пониженной относительно оптимальной температуре, наблюдается снижение физиологической активности за счет изменения вязкости цитоплазмы, текучести и проницаемости мембран. А так же снижение ферментативной активности, эффективности поглощения и использования питательных веществ, скорости фиксации CO_2 . ингибирование процессов репликации, транскрипции и трансляции. Большинство видов микроводорослей лучше всего растут при температуре от 15 до 30 °C [113].

Кислотность (рН) культур определяет доступность CO_2 и питательных веществ для клеток микроводорослей, что влияет на их метаболизм. При низких значениях рН (<5) в среде содержится высокая концентрация катионов H^+ , растворенных в воде, что приводит к образованию угольной кислоты. При высоких значениях рН (>11) концентрация катиона в культуральной среде низкая, что ограничивает доступность CO_2 , замедляется рост клеток и накопление биомассы. Оптимальное значение рН для производства биомассы варьируется для каждого вида в узком диапазоне [114].

Свет является решающим фактором для роста клеток и накопления метаболитов [115 – 118]. В условиях высокой освещенности основную массу клеток составляют липиды и углеводы. Содержание каротиноидов, таких как β -каротин и зеаксантин, так же значительно повышается. Кроме того, интенсивность света влияет на состав жирных кислот липидов [115], при этом жирные кислоты от С:16 до С:18 увеличиваются с 76,97 % до 90,24 % (масс.) от общего количества при низкоинтенсивном свете, а содержание линоленовой кислоты снижается при более высокой интенсивности освещения культуры. Таким образом, система выращивания и среда могут оказывать значительное влияние на соотношение липидного состава.

При автотрофном культивировании источником углерода является либо CO_2 , либо углерод в форме бикарбонатных (HCO_3^-) солей. [119]. Растворенный неорганический углерод лучше усваивается по сравнению с CO_2 благодаря своей высокой растворимости в воде (растворимость $\text{NaHCO}_3 = 100,3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ при $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Высокие концентрации бикарбоната натрия оказывают бактерицидное и бактериостатическое действие, что может минимизировать микробное загрязнение в культуре микроводорослей.

Высокая концентрация бикарбоната натрия или добавка бикарбоната в культуральную среду облегчает кислородный стресс, повышая соотношение $d\text{CO}_2$ и $d\text{O}_2$ (для баланса фотосинтеза и фотодыхания) [119]. Кроме того, избыток растворенного неорганического углерода приводит к уменьшению производства реактивных форм кислорода за счет повышения активности антиоксидантных ферментов, способствуя увеличению плотности клеток и накоплению метаболитов [120].

Азот в основном потребляется микроорганизмами в виде катионов аммония или нитрат-анионов. В некоторых исследованиях изучалось влияние комбинации питательных веществ на биомассу микроводорослей с целью увеличения накопления липидов. Shen и др. [121] обнаружили, что условия азотного голодания значительно увеличивают липидный состав биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Аналогичный эффект был обнаружен при гетеротрофном культивировании *Scenedesmus obliquus* NIES-2280, в котором накопление липидов было выше при фосфорном и азотном голодании [122]. Кроме того, источник углерода и соотношение углерода к азоту также оказали значительное влияние на состав питательных веществ биомассы микроводорослей, культивируемых гетеротрофным способом. Высокие соотношения C / N обычно приводят к более интенсивному накоплению углеводов, липидов и каротиноидов и более низкому накоплению белка [123, 124].

В некоторых исследованиях [123, 125] сообщается об изменении липидного состава клеток микроводорослей в зависимости от состава питательной среды. Singhasuwan и др. [123] обнаружили более высокую долю пальмитиновой

кислоты C16:0 (от 20 до 24 % (масс.)) и линолевой кислоты C18:2 (от 45 до 51 % (масс.)) и более низкую долю олеиновой кислоты C18:1 (от 22 до 24 % (масс.)) у *Chlorella protothecoides*. Таким образом, установив, что более длительный период в условиях азотного голодания увеличил долю полиненасыщенных жирных кислот и уменьшил долю мононенасыщенных жирных кислот.

В качестве источника фосфора клетки способны потреблять ионы ортофосфатов. При его недостатке наблюдаются замедление ассимиляции и прекращение накопления запасных питательных веществ (липиды и углеводы). Сера потребляется микроводорослями в виде сульфатов. При недостаточном количестве данного элемента уменьшается количество аминокислот, жирных кислот, витаминов (тиамин и биотин) [126].

Широкое видовое разнообразие микроводорослей и ареалов их обитания делает невозможным применение какой-либо одной стандартной среды культивирования. Разработано множество разнообразных сред, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки. Подробные прописи десятков сред и растворов микроэлементов, применяемых в разнообразных лабораториях, можно найти в «Каталоге культур микроводорослей» (под ред. Семененко, 1991), но на практике промышленного культивирования в разных регионах используются среды, создаваемые на основе местной воды и местных ресурсов, которые представляют собой модификации сред, наиболее часто применяемых в лабораторных условиях. Питательные растворы, созданные на основе среды Тамия с нитратным или аммиачным азотом, применимы для выращивания зеленых одноклеточных водорослей – широкого круга штаммов *Chlorella* и *Scenedesmus* [127].

Универсальным фактором регуляции процессов жизнедеятельности цианобактерий является свет. Свет регулирует процессы жизнедеятельности цианобактерий, необходим для их роста и фотосинтеза, а так же для синтеза токсинов. Являясь фототрофными организмами, цианобактерии обладают способностью использовать органические формы углерода в качестве источника энергии. При низком уровне освещенности, недостаточном для фотосинтеза,

гетеротрофное потребление органических субстратов становится важной составляющей стратегии выживания цианобактерий [128]. Другим важным фактором, от которого зависит рост и токсинообразование цианобактерий, является температура. Однако, характер влияния температуры неоднозначен. Для роста *Anabaena* и других цианобактерий оптимальная температура составляет 25 °С, а наиболее интенсивное образование цианотоксинов происходит при 18 – 20 °С. При более высокой температуре (25 – 30 °С) процесс токсинообразования замедляется в два-три раза [129]. Эти данные указывают на то, что оптимум для роста цианобактерий не совпадает с оптимумом токсинообразования. Кроме того, при интенсивном освещении высокая температура способствует лизису и выходу токсинов из клетки.

Важными элементами для метаболизма цианобактерий и синтеза цианотоксинов являются азот и фосфор. Азот необходим не только для роста цианобактерий, но и для токсинообразования, так как он является неотъемлемой составной частью многих цианотоксинов. Азот участвует в синтезе ДНК, белков. На рост и образование токсинов значительное влияние оказывает форма азота. Наиболее благоприятной формой для токсинообразования являются свободные растворимые аминокислоты – аланин, аргинин, лейцин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

Стимулирующее влияние на рост и образование токсинов цианобактериями оказывает мочевины, однако данный эффект наблюдается только при ее низких концентрациях. В повышенных концентрациях мочевины ингибируют эти процессы [130]. Цианобактерии могут использовать как неорганические, так и органические формы фосфора. У азотфиксирующих цианобактерий *Anabaena* с увеличением концентрации фосфора в среде возрастает прирост биомассы и содержание внутриклеточных токсинов.

Таким образом, для роста микроорганизмов необходимо обеспечить доступ к клетке всех элементов питательной среды, света и отвод продуктов метаболизма. При этом важно найти компромисс между возможностями клеток

синтезировать полезные для человека вещества и их потребностями при различных условиях.

1.4 Создание перспективных технологий переработки биомассы фототрофных микроорганизмов в ценные целевые продукты

1.4.1 Перспективные методы культивирования биомассы микроводорослей и цианобактерий

Фотобиореактор – оборудование, в котором используется источник света для культивирования фотоавтотрофных микроорганизмов. Системы культивирования микроводорослей обычно делятся на два типа: открытые и закрытые. Открытые фотобиореакторы – хорошо освещаемые неглубокие емкости [131]. Открытая система предполагает контакт культуральной жидкости с атмосферой, и обладает следующим ключевым преимуществом – естественное освещение солнечным светом, который является необходимым условием для роста фотоавтотрофных микроорганизмов.

Существует три типа открытых систем: открытая система без перемешивания, круглый фотобиореактор и биореактор с системой каналов.

Открытая система без перемешивания. Большинство естественных водных систем не имеют перемешивающего устройства, что не позволяет обеспечить хорошую гидродинамику в системе, но при этом, значительно снижается стоимость культивирования в коммерческих масштабах. Распространенными примерами открытых систем без перемешивания являются озера, лагуны и пруды. Использование данных систем обеспечивает экономичность, простоту, удобство эксплуатации и мониторинга процесса культивирования. Глубина естественного пруда обычно составляет менее полуметра, что позволяет свету проникать в воду и поглощаться клетками водорослей. В открытых системах в коммерческих целях можно культивировать некоторые виды водорослей, например, *Dunaliella salina* [131].

Круглый фотобиореактор с перемешивающим устройством. Круглые фотобиореакторы используются в основном для культивирования *Chlorella* sp. в

Азии [132]. Такая открытая система для культивирования фототрофов имеет глубину 20 – 30 см и диаметр 40 – 50 м. В центре фотобиореактора установлен вращающийся рычаг, который вращается как стрелка на циферблате часов, выполняя функцию лопастного колеса. Перемешивание культуральной среды и клеток микроводорослей позволяет обеспечить более эффективное снабжение клеток необходимыми для роста компонентами и обеспечить более высокие показатели роста клеток по сравнению с режимом без перемешивания, но поскольку фотоавтотрофы подвергаются воздействию окружающей среды, контаминации избежать невозможно. Согласно исследовательской литературе, производительность в круглом фотобиореакторе с перемешиванием колеблется от 8,5 до 21 г/(м²·сутки) [133].

Открытый фотобиореактор с системой каналов. В течение последних 40 лет открытый фотобиореактор с системой каналов является самым популярным и широко используемым типом открытой системы для крупномасштабного культивирования и коммерческого производства продуктов из микроводорослей. Такой фотобиореактор был впервые создан Освальдом в 1960-х годах, и его внешний вид и структура за 40 лет не претерпели больших изменений. Наиболее распространенными видами микроводорослей, которые можно выращивать с использованием данной системы культивирования являются *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* и *Hematococcus*, причем культивирование можно осуществлять как на чистых питательных средах, так и с использованием сточных вод, также в эту систему можно интегрировать технологию улавливания CO₂ с электростанций [133].

Материалами для строительства открытого фотобиореактора с системой каналов могут являться бетон или пластик. Такой фотобиореактор может быть расположен на земле, или углублен в землю и отделен от нее специальным материалом, чтобы предотвратить проникновение жидкости из системы культивирования в почву. Конфигурации фотобиореактора с каналами могут быть различными: один канал, или их группа. Глубина канала обычно варьируется от 15 до 50 см. Большинство фотобиореакторов такого типа состоит из лопастного

колеса, перегородок и каналов. Лопастное колесо обеспечивает перемешивание и движение потока жидкости, обеспечивая взвешенное состояние клеток микроводорослей в культуральной среде, и предотвращает их седиментацию. Перегородки регулируют направление потока и позволяют избежать возникновения застойных зон, в которых наблюдается оседание клеток. Таким образом, клетки микроводорослей достаточно хорошо перемешиваются и двигаются в непрерывном потоке, получая при этом солнечный свет и CO_2 из атмосферы. Важным параметром таких фотобиореакторов является соотношение длины и ширины, так как большая ширина может привести к ослаблению скорости течения, а большая длина – к использованию больших площадей земли. По сравнению с другими открытыми системами, культивирование в таком фотобиореакторе отличается высокой эффективностью и удобством, поэтому данный тип биореактора чаще всего выбирается для крупномасштабного культивирования микроводорослей на открытом воздухе. Производительность данной системы культивирования может достигать 60 – 100 мг/(л·сутки) [134].

Хотя открытые системы культивирования являются наиболее экономичными и устойчивыми при крупномасштабном коммерческом культивировании микроводорослей, существует множество проблем, делающих их непригодными для производства продуктов из микроводорослей с высокой добавочной стоимостью (продукты тонкого химического синтеза и натуральные пигменты и др.). К наиболее важным недостаткам таких систем можно отнести: 1) контаминацию другими микроорганизмами (нежелательными видами водорослей, бактериями, грибами или вирусами; 2) эффект затемнения клеток в толще суспензии 3) значительное испарение воды с поверхности суспензии микроводорослей; 4) неэффективное перемешивание [132].

Для решения проблем, возникающих при использовании открытых систем культивирования, и для увеличения производительности биомассы микроводорослей была разработана закрытая система культивирования, которая не допускает прямого массообмена между культуральной средой и атмосферой и способна обеспечить контролируемое культивирование (точная дозировка и

контроль необходимых компонентов, таких как свет, CO₂, температура, концентрация питательных веществ) [135, 136]. Закрытая система не взаимодействует с окружающей атмосферой, и может быть расположена как на открытом воздухе с целью использования естественного освещения, так и в помещении с искусственным освещением.

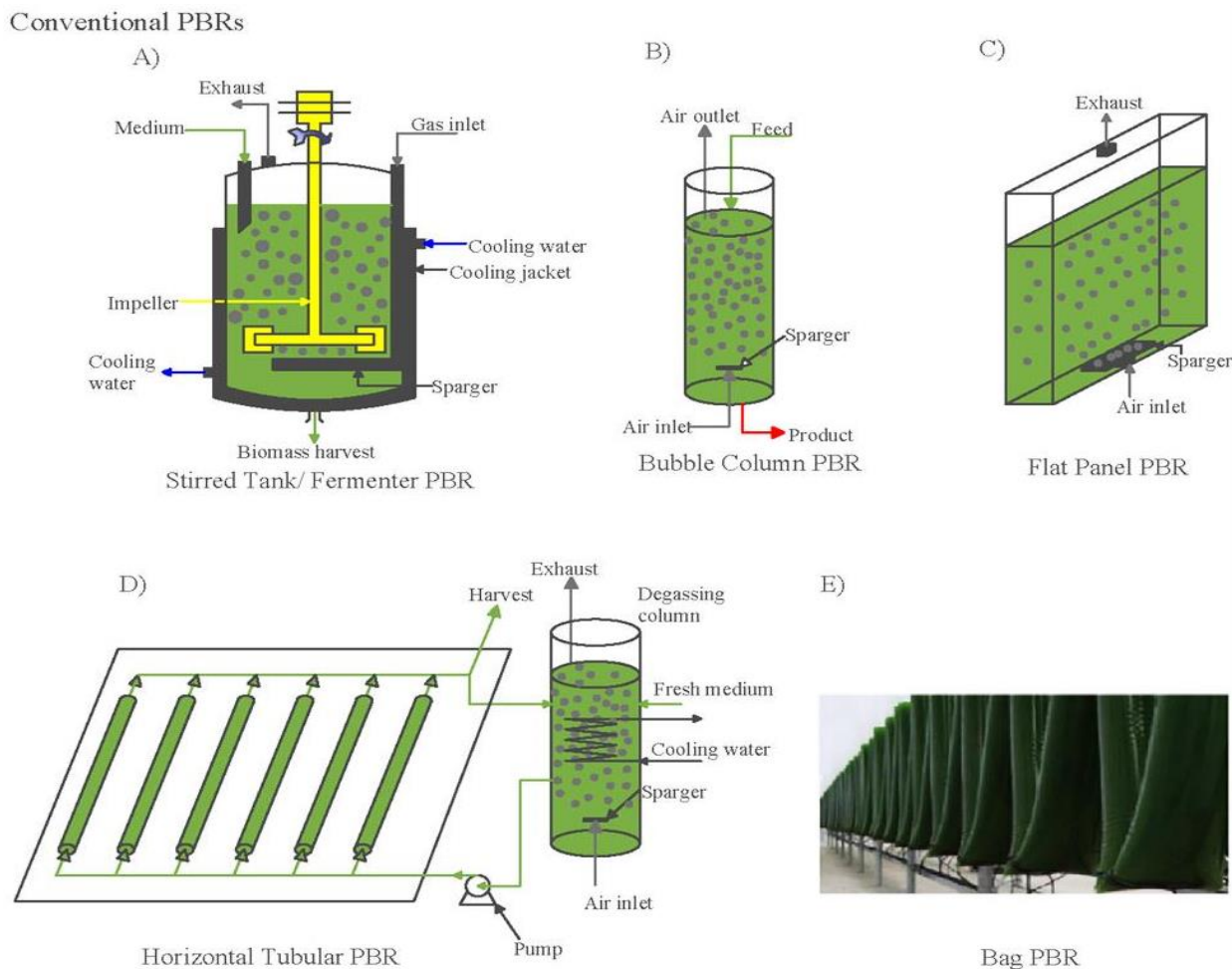


Рисунок 7 – Традиционные фотобиореакторы: (А) закрытый фотобиореактор с мешалкой, (В) цилиндрический фотобиореактор, (С) плоскопанельный фотобиореактор, (D) трубчатый фотобиореактор, (Е) bag фотобиореактор [137]

Закрытые фотобиореакторы представляют собой освещенные сосуды, в которых культура не находится в прямом контакте с окружающей средой, поскольку газообмен с атмосферой происходит через стерильные фильтры [137], и, следовательно, риск заражения значительно снижается. Существует несколько типов фотобиореакторов и различные способы их классификации. В работе [137]

они разделены на две группы: стандартные фотобиореакторы, которые являются наиболее традиционными и широко используемыми в промышленных производствах, и нестандартные фотобиореакторы, имеющие оригинальную конфигурацию и используемые только в лабораторных масштабах (рис. 7, 8). Традиционные фотобиореакторы включают в себя: плоскопанельный, цилиндрический (барботажный и эрлифтный), трубчатый, реактор с мешалкой и их модифицированные конфигурации.

Плоскопанельный фотобиореактор. Данный тип фотобиореактора представляет собой прямоугольный сосуд и используется для культивирования фотоавтотрофов как на чистых средах, так и на сточных водах. Он может быть расположен как в помещении с использованием в качестве источника света искусственного освещения, так и на открытом воздухе. Плоскопанельные фотобиореакторы изготавливаются из прозрачных или полупрозрачных материалов (стекло, оргстекло, поликарбонат, пластиковые пакеты и т.д.). Чаще всего источник света располагается близко к поверхности панели, поэтому фотоны света могут легко проникать в культуральную жидкость. Хороший массообмен и перемешивание клеток чаще всего обеспечивается за счет барботажа суспензии пузырьками газовой смеси. Для подачи пузырьков воздуха через воздухораспределитель обычно используется насос, обеспечивающий рециркуляцию газовой смеси. Удаление отработанного газа осуществляется на границе раздела газовой и жидкой фаз. В случае расположения реактора на открытом воздухе его располагают под определенным углом к горизонту с целью обеспечения необходимой для роста клеток интенсивности освещения. Что касается различных возможных режимов работы данного фотобиореактора, следует отметить, что периодический режим может ограничить рост микроорганизмов из-за истощения питательных веществ в культуральной среде, а так же из-за чрезмерного накопления побочных продуктов метаболизма. Следовательно, постоянное введение свежей среды, и отбор культуральной жидкости может решить данные проблемы. С точки зрения промышленных масштабов непрерывный режим производства позволяет достичь от 2,5 до 5 раз

большей эффективности по сравнению с системой, работающей в периодическом режиме [137].

В работе [138] были изучены такие параметры, как влияние различных времен пребывания и режимов освещения на производство белка из микроводорослей в фотобиореакторах с плоской панелью. Исследование показало, что время пребывания варьируется в зависимости от состава биомассы, оказывая большее влияние на штаммы цианобактерий, чем на микроводоросли. Основными преимуществами плоскопанельных фотобиореакторов являются: (а) высокое отношение площади поверхности к объему; (б) низкое накопление растворенного кислорода; (в) удобство очистки; (г) устройство является гибким и легко масштабируется. Основными недостатками: (а) сложность обеспечения контроля температуры в разных зонах фотобиореактора; (б) гидродинамическое давление, возникающее при аэрации; (с) биообрастание внутренней поверхности.

Цилиндрические фотобиореакторы. Существует два типа цилиндрических реакторов: барботажный и эрлифтный. И у барботажного, и у эрлифтного фотобиореакторов в нижней части расположен воздухораспределитель, преобразующий подаваемый газ в мелкие пузырьки с целью обеспечения суспензии клеток водорослей углекислым газом, улучшения массообмена. Барботажный фотобиореактор является полым внутри, поэтому движение потока жидкости осуществляется только за счет движения пузырьков, выпускаемых воздухораспределителем. Обычно фотобиореакторы данного типа имеют форму цилиндра, высота которого превышает диаметр более чем в два раза, и получают освещение от внешних источников. Вблизи осевой области фотобиореактора находится «темная зона», образуемая из-за ослабления освещения в толще суспензии из-за высокой концентрации клеток. В барботажном фотобиореакторе благодаря движению пузырьков, клетки водорослей перемещаются от внешней освещенной поверхности к осевой «темной зоне», при этом осуществляется так называемый «эффект световой вспышки», способствующий повышению эффективности фотосинтеза и перемешиванию микроводорослей. Единственным параметром, который необходимо учитывать во время работы барботажного

фотобиореактора является скорость потока газа, оказывающая влияние на световой и темновой цикл клеток. Преимуществами барботажного реактора являются: низкая себестоимость биомассы, большое отношение площади поверхности к объему, простая конфигурация и хороший массообмен, позволяющий всем клеткам в достаточном количестве получать фотоны света и питательные вещества.

Эрлифтный фотобиореактор можно рассматривать как усовершенствованную версию барботажного реактора: данный тип реактора имеет внутри две взаимосвязанные зоны. Одна из них представляет собой вертикальный канал, а другая – зону распада пузырьков. Вертикальный канал имеет форму концентрической трубы, внутрь которой подается газоздушная смесь, за счет которой суспензия поднимается вверх. Жидкость с клетками из вертикального канала попадает к внешней освещенной поверхности реактора, и затем вновь опускается вниз, и вновь попадает в зону вертикального канала. Данный процесс «воздушного подъема», являющийся «эффектом световой вспышки» способствует повышению эффективности фотосинтеза.

Для большинства эрлифтных реакторов большое значение имеет скорость подачи газа, оптимальная величина которой позволяет обеспечить и хороший массообмен, позволяющий всем клеткам в достаточном количестве получать фотоны света и питательные вещества. Такие конструкции фотобиореактора имеют следующие преимущества: (а) высокая эффективность массопереноса; (б) хорошее перемешивание; (в) низкое потребление энергии; (г) возможность иммобилизации микроводорослей на специальных движущихся частицах.

Трубчатые фотобиореакторы. Горизонтальные трубчатые фотобиореакторы также имеют наибольшее отношение поверхности к объему, что способствует максимальному освещению суспензии микроводорослей. Горизонтальные трубчатые реакторы состоят из трубок, которые могут быть расположены горизонтально, вертикально, под углом к горизонту, спиралевидно, и в других вариациях. Диаметр труб варьируется от 10 до 60 мм, а длина может достигать нескольких сотен метров. Во всех представленных типах реализуются похожие

условия. Важными параметрами большинства трубчатых реакторов являются скорость потока и эффективность перемешивания в радиальном направлении. За трубками расположена система газообмена, с помощью которой осуществляется подача газовой смеси, свежей питательной среды, а также охлаждение культуральной жидкости и удаление отработанного газа (насыщенного кислородом). Газ в трубки подается с помощью насоса. Благодаря этому культуральная жидкость циркулирует и перемещается между системой газообмена и трубками, а клетки микроводорослей не оседают. Процесс культивирования является непрерывным [131].

Несмотря на самое большое соотношение поверхности к объему и непрерывный процесс культивирования горизонтальные трубчатые фотобиореакторы не получили широкого распространения. Прежде всего, это связано с неравномерным массопереносом в радиальном направлении, что способствует неоднородному распределению температуры и молекул питательной среды и CO_2 в суспензии, а также приводит к накоплению растворенного кислорода. Кроме того, частое биообрастание внутренней поверхности трубок и сложность их очистки значительно затрудняет организацию процесса непрерывного культивирования. А так же требует больших затрат на техническое обслуживание. К преимуществу данных систем культивирования можно отнести высокую производительность биомассы микроводорослей.

Закрытый фотобиореактор с мешалкой. В области биологической инженерии активно используются ферментаторы с перемешивающим устройством для культивирования гетеротрофных микроорганизмов. На их основе создан фотобиореактор с перемешивающим устройством и внешним источником света (флуоресцентные лампы или оптическое волокно) для культивирования микроводорослей. Перемешивание суспензии в данной конструкции фотобиореактора осуществляется за счет механического движения мешалки, приводимой в движение электродвигателем, в связи с этим реактор отличается хорошими тепло- и массообменом. При вращении жидкости с высокой скоростью могут возникнуть вихревые потоки, для их уменьшения вокруг

внутренней стенки такой системы культивирования устанавливаются перегородки. Подача CO_2 осуществляется через воздухораспределитель, расположенный в нижней части фотобиореактора. Для разрушения пузырьков и повторного их ресуспендирования реактор снабжен пеноотделителем. Жидкостью заполняется только 70 – 80 % от объема реактора, поэтому оставшееся пространство удобно для газообмена. Данный тип фотобиореактора используется в полунепрерывном режиме для очистки промышленных стоков и для получения биомассы, богатой углеводами, что позволяет перерабатывать отходы и одновременно выращивать биомассу для получения ценных компонентов [137].

Фотобиореактор с перемешивающим устройством характеризуется хорошими гидродинамическими свойствами, позволяет получать высокую концентрацию клеток биомассы водорослей в культуральной жидкости, но при этом потребляет большое количество энергии. Кроме того, низкое отношение площади поверхности к объему не позволяет обеспечить хорошее обеспечение клеток световым излучением, что снижает эффективность фотосинтеза.

К нестандартным фотобиореакторам относятся гибридные системы, которые сочетают в себе как открытые, так и закрытые конфигурации и мембранные установки для обеспечения высокой производительности биомассы и меньшего потребления энергии [137]. В комбинированных системах на первом этапе культура выращивается в закрытом фотобиореакторе, после получения желаемой концентрации биомассы, среда перекачивается в открытую систему для накопления клетками различных метаболитов. В данной комбинированной системе обеспечена улучшенная освещенность культуры и подача углекислого газа. Однако, несмотря на теоретические преимущества, наличие открытой системы создает сложность масштабирования и высокий риск загрязнения.

Мембранные фотобиореакторы относятся к нетрадиционному типу фотобиореакторов. Мембранный модуль предназначен для разделения жидкости (сточные воды) и твердого вещества (биомасса). Таким образом, можно получить более высокую концентрацию биомассы без применения дорогостоящих методов концентрирования [139]. Несмотря на свои преимущества, мембранные

фотобиореакторы применяются для очистки сточных вод с низкой концентрацией загрязняющих веществ, в которых концентрация азота и фосфора ниже 60 мг/л и 7 мг/л соответственно.

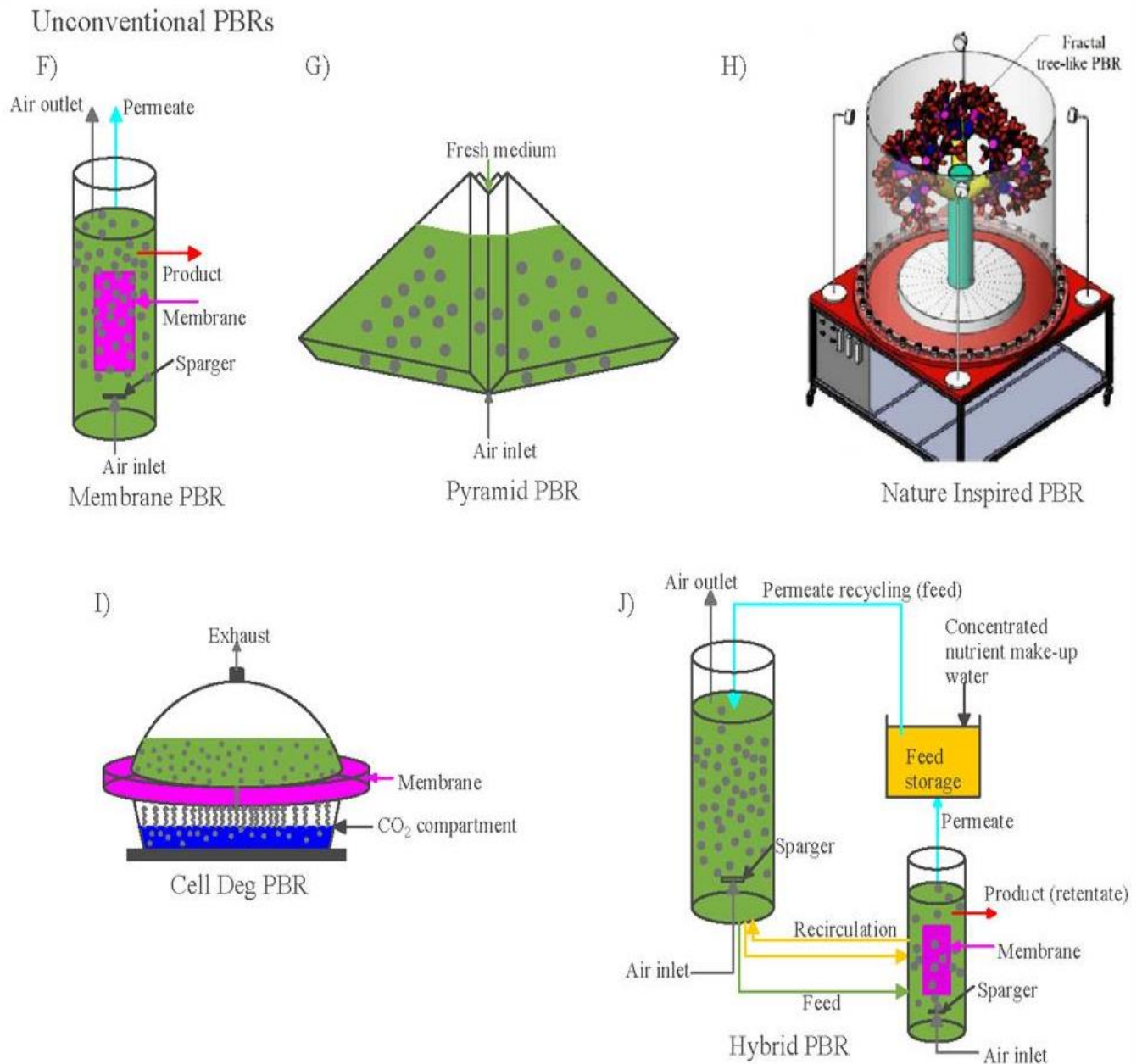


Рисунок 8 – Нетрадиционные фотобиореакторы: (F) мембранный фотобиореактор, (G) пирамида, (H) фрактальный древовидный фотобиореактор I) фотобиореактор с использованием технологии иммобилизации клеток, J) гибридная система [137]

Сведения по продуктивности различных систем культивирования на основе открытых источников информации представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сведения о продуктивности различных типов фотобиореакторов

Тип	Вид продуцента	Продуктивность, г/(л·сут)
Открытые системы культивирования		
Круглые открытые с перемешивающим устройством		0,0085 – 0,021 [133]
Открытые с системой каналов	<i>Chlorella sp</i>	0,024 ± 0,00013 [141]
	<i>Scenedesmus sp.</i>	0,004 – 0,017 [142]
Закрытые системы культивирования		
Плоскопанельные	<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,28 – 0,8 [143]
	<i>Chlorella Protothecoides</i>	0,4 – 0,6 [144]
Цилиндрические	<i>Chlorella zofingiensis</i>	0,067 [145]
	<i>Chlorococcales</i>	0,234 [146]
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0,11 – 0,63 [147]
Трубчатые	<i>Scenedesmus Obliquus</i>	0,022 [148]
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	0,6 [149]
Мембранные	<i>Chlorella sp.</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	0,055 [150]
Гибкие	<i>Chlamydomonas globosa</i> , <i>Chlorella minutissima</i>	0,021 [151]
С использованием технологии иммобилизации клеток	<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	0,110 – 0,401 [152]

Как показывает анализ источников, существует множество проблем, с которыми приходится сталкиваться при разработке фотобиореакторов, особенно при организации процесса культивирования в промышленных масштабах. Одним из главных недостатков, с которыми сталкиваются конструкторы, как при проектировании закрытых, так и открытых систем культивирования микроводорослей и цианобактерий – это выбор и расположение источников света. Организация освещения фотобиореактора – это критический фактор, влияющий на эффективность биoutilизации углекислого газа. Наиболее перспективными вариантами организации освещения являются варианты, сочетающие естественный источник – солнечный свет, а также инновационные искусственные источники света (например, светодиоды и оптическое волокно). Также проблемой промышленных фотобиореакторов можно назвать явление самозатемнения

клеток, которое характерно для большинства конструкций, и наблюдающееся при высоких концентрациях клеток в суспензии. Выбор способа ее решения будет зависеть от особенностей физиологии, морфологии и биохимии культивируемых видов микроводорослей и цианобактерий [140].

Таким образом, для организации эффективной стратегии крупномасштабного культивирования биомассы микроводорослей и цианобактерий, помимо технических и конструкционных особенностей разных видов фотобиореакторов необходимо учитывать такие факторы, как, морфологические, физиологические, биохимические особенности фотоавтотрофных агентов, условия их культивирования, особенности накопления внутриклеточных целевых продуктов, географическое местоположение центра, где планируется организовать производство, чистота подаваемого углекислого газа.

1.4.2 Перспективные методы дезинтеграции клеток микроводорослей и цианобактерий

Следующей за концентрированием биомассы энергозатратной стадией является экстракция/экстрагирование целевых компонентов из клеток. На её долю приходится до 40 – 60 % от общей себестоимости конечного продукта.

Микроводоросли и цианобактерии подразделяются на виды без клеточной стенки, виды с целлюлозосодержащими клеточными стенками и виды с многослойными клеточными стенками (табл. 4).

Для повышения эффективности экстракции/экстрагирования эндометаболитов из клеток микроводорослей и цианобактерий необходимо повысить степень гомогенности среды тем самым увеличив поверхность взаимодействия "растворитель – целевое вещество", что достигается путем разрушения оболочек клеток и органелл. Наиболее часто для этого используют физические, химические и биохимические методы [153 – 171].

Физические методы. Паста клеток, содержащая после концентрирования 15 – 35 % сухих веществ, может быть высушена до содержания сухих веществ 80 –

85 % в естественных условиях, либо с применением распылительной или лиофильной сушки [162]. Обезвоживание биомассы приводит к появлению трещин в клеточной стенке или полному ее разрыву, что облегчает дальнейшее извлечение целевых внутриклеточных продуктов, однако получение сухой биомассы требует значительных энергозатрат (до 85 % от общего потребления энергии) [163].

Таблица 4 – Особенности строения клеточных стенок

Микроводоросли	Размер, нм	Строение оболочек	Ссылка
<i>Dunaliella</i>	-	Отсутствует жесткая клеточная стенка, клетка окружена тонкой плазматической мембраной, состоящей из гликокаликсоподобного покрытия	[153]
<i>Haematococcus</i>	30 – 35	Алгаенан – фибриллярный слой (манноза и целлюлоза) – третичный слой (манноза-целлюлоза) – цитоплазматическая мембрана	[154]
<i>Chlorella</i>	20 – 40	Алгаенан – фибриллярный слой (манноза и хитиноподобный полисахарид) – цитоплазматическая мембрана	[155]
<i>Chlamydomonas</i>	80	Микрофибриллярный слой без целлюлозы полностью состоящий из гликопротеинов, которые связаны со смесью гетероолигосахаридов, состоящей из арабинозы и галактозы	[156]
<i>Scenedesmus</i>	40	Пектиновый слой – алгаенан – фибриллярный слой – цитоплазматическая мембрана	[155]
<i>Spirulina</i>	60	Внешняя мембрана – фибриллярный слой – пептидогликановый слой – фибриллярный слой – цитоплазматическая мембрана	[155]
<i>Nannochloropsis</i>	20 – 50	Аморфный слизистый слой – алгаенан – целлюлозный слой – спорополленин – цитоплазматическая мембрана	[155]

Аналогичный эффект может быть достигнут путем организации процедуры замораживания/оттаивания клеток биомассы, которая приводит к образованию

внутриклеточных кристалликов льда и разрыву клетки изнутри [164]. К преимуществам данного подхода можно отнести возможность извлечения термолабильных компонентов. Недостатком метода является высокое энергопотребление. Этот метод используется для разрушения клеток без клеточной стенки (*Dunaliella*) или при наличии фибриллярной (целлюлозной) клеточной стенки (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, и *Spirulina*) для избирательного извлечения целевых биомолекул.

Методы в основе которых лежит явление гидродинамической кавитации (высокоскоростная гомогенизация, гомогенизация под высоким давлением, ультразвуковая обработка, дезинтеграция импульсным электрическим полем) считаются высоко эффективными, легко масштабируемыми (кроме метода высокоскоростной гомогенизации). Эти методы применимы в технологиях производства биотоплива, удобрений, а также при целевом извлечении чистых веществ для получения косметических средств, пищевых добавок и фармацевтических препаратов.

В методе высокоскоростной гомогенизации (ВГС) дезинтеграция клеточных стенок основана на гидродинамической кавитации, вызванной перемешиванием на высокой скорости (10000 – 20000 об/мин) и сдвиговыми силами в межфазе твердое тело-жидкость. К недостаткам данного метода относится, главным образом, высокое удельное энергопотребление, что увеличивает стоимость процесса. [165, 166].

В работах [162, 163] исследовали дезинтеграцию клеток фототрофных агентов с помощью метода гомогенизации под (сверх)высоким давлением (ГВД). В исследовании [163] Elaine и др. изучали эффективность метода гомогенизации под (сверх)высоким давлением при дезинтеграции клеток *Arthrospira platensis* при экстракции полисахаридов. Данный метод сравнивали с термической обработкой. Было установлено, что метод гомогенизации продемонстрировал низкое удельное потребление энергии ($0,41 \text{ кВт} \cdot \text{ч} \cdot \text{кг}^{-1}$ сухого веса биомассы), а так же увеличение выхода целевого продукта в 2,5 раза. Таким образом, метод ГВД является

предпочтительным методам для дезинтеграции клеточных стенок для использования в промышленных масштабах.

Методы, в основе которых лежит процесс трения (СВЧ-обработка, гомогенизация с применением мелющих тел). При СВЧ-обработке происходит вращение полярных молекул под действием переменного электромагнитного поля. В результате взаимного трения полярных молекул возникают локальные перегревы, в клетках образуется водяной пар, приводящий к их разрыву. Преимуществами метода можно считать короткое время обработки суспензий, возможность масштабирования технологии, высокая эффективность дезинтеграции, невысокий уровень потребления энергии [167].

Viner и др. [160] сравнили СВЧ-обработку с несколькими методами разрушения клеток (сублимационная сушка, ультразвук, охлаждение, измельчение в жидком азоте, осмотический шок) для экстракции липидов у *Scenedesmus sp.* с использованием жидкого CO₂ и метанола. Самый высокий общий выход липидов (9,6 масс. %) был достигнут при использовании СВЧ-обработки. В исследовании [164] установлено, что сверхвысокочастотное излучение является наиболее эффективным методом дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus sp.* и *Scenedesmus sp.* для извлечения внутриклеточных липидов.

При гомогенизации с применением мелющих тел дезинтеграция клеточных стенок осуществляется шариками из стекла, керамики, циркония или стали при их перемешивании [168]. Такой способ дезинтеграции клеток считается высокоэффективным, но энергоемким и его трудно масштабировать [169]. Этот метод подходит для дезинтеграции высококонцентрированных суспензий, которые легко разделяются или фракционируются после разрушения [170] и наиболее часто используется для разрушения клеток с прочными клеточными стенками, например *Nannochloropsis u Chlorella*.

При дезинтеграции клеточных стенок бисерными шариками, происходит столкновение клеток микроводорослей с бисером, приводящее к их механическому повреждению. Важными характеристиками процесса являются

диаметр и материал бисерных шариков. Бисерные шарики высокой плотности, подходящие для сред высокой вязкости, изготавливаются из циркония. Шарики низкой плотности, которые подходят для сред с низкой вязкостью, изготавливаются из стекла [167].

В патенте [171] описан оптимизированный метод дезинтеграции микроводорослей *Chlorella* (объем размольной камеры ≥ 500 дм³, скорость потока > 1 м³·ч⁻¹) с применением бисерных шариков из различного материала. Авторы оценили влияние материала бисера, диаметра шариков, степени заполнения камеры на производительность. Установлено, что, использование гомогенизации с применением бисерных шариков из стекла и циркония для дезинтеграции клеток микроводорослей требует высоких затрат электроэнергии.

Дезинтеграция импульсным электрическим полем (ИЭП) подразумевает воздействие на суспензии клеток микроводорослей электрических импульсов высокого напряжения в течение коротких периодов (микросекунд), что вызывает электропорацию фосфолипидного бислоя. Этот метод характеризуется масштабируемостью, селективностью и быстрым временем обработки, а так же может быть использован в комбинации с другими методами. Недостатком считается необходимость деионизации растворов [167]. Импульсное электрическое поле может быть применимо в качестве метода дезинтеграции при производстве биотоплива, удобрений, косметических средств, пищевых добавок и фармацевтических препаратов.

Lam и др. [166] протестировали использование ИЭП для извлечения белка из микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Neochloris oleoabundans*. Выход белка составлял 13 % (масс.), что в 3,5 – 4 раза ниже, чем при разрушении клеток бисерными шариками. Эти результаты показывают, что, несмотря на перспективность данной технологии, недостатком является ее низкая эффективность.

Ультразвуковая обработка основана на излучении звуковых волн высокой частоты, которые создают в жидкости кавитационные газовые пузырьки или полости. Эти полости схлопываются, вызывая возникновение сильных

гидродинамических сил сдвига, разрушающих клеточные стенки. Вследствие низких эксплуатационных затрат и возможности масштабирования данный метод является перспективным для крупномасштабного производства [165].

Химические методы. Для дезинтеграции клеток микроводорослей и цианобактерий могут быть применимы следующие вещества: растворители, кислоты, щелочи, ацетон, метанол или диметилсульфоксид, смесь оксидов железа (II, III) и пероксида водорода, хлорид натрия [172]. Большинство из этих соединений разрушают связи между мономерами клеточных стенок, вызывают денатурацию белков фосфолипидных мембран. К преимуществам этого метода можно отнести низкие затраты энергии и масштабируемость процесса [173]. Недостатком является потенциальная угроза деградации целевых компонентов [173]. Химические методы дезинтеграции перспективны при промышленном получении биотоплива (биоэтанола, биобутанола, биодизельного топлива), основ питательных сред, удобрений.

Биохимические методы. При создании биотехнологических производств, предполагающих одновременное получение нескольких ценных продуктов необходимо целенаправленное разрушение клеточных стенок с минимальным воздействием на другие компоненты клеток. Данный подход может быть реализован с применением альгицидных микроорганизмов (цианобактерий, бактерий, вирусов и микроводорослей, которые разрушают клеточные стенки промышленных штаммов микроводорослей) или ферментативного гидролиза (протеазы, карбогидразы, липазы/фосфолипазы) [174]. Метод ферментативной обработки клеток не требует высоких затрат удельной энергии. Недостатком использования ферментов для дезинтеграции клеточных стенок по сравнению с механическими или химическими методами разрушения являются длительное время процесса и низкая производительность. В работе Zhang и др. [178] установили, что с применением смеси ферментов (целлюлазы, ксиланазы и пектиназы) для дезинтеграции микроводорослей *Scenedesmus sp.* выход липидов из биомассы составлял 86,4 %, а также увеличился выход метиловых эфиров жирных кислот по сравнению с необработанной биомассой микроводорослей.

Таблица 5 – Области применения методов дезинтеграции клеток микроводорослей и цианобактерий

Метод обработки	Биотопливо	Удобрения	Пищевые добавки	Корм	Фармацевтика	Косметика	Источники
Высокоскоростная гомогенизация, гомогенизация под высоким давлением, ультразвуковая обработка	+	+	+	+	+		[167, 168]
СВЧ-обработка, гомогенизация с применением мелющих тел			+		+	+	[167]
Дезинтеграция импульсным электрическим полем	+	+	+		+	+	[167]
Ферментные препараты (карбогидразы, протеазы, липазы/фосфолипазы)			+		+	+	[172, 173]
Химические вещества (растворители различного типа, кислоты, щелочи, ацетон, метанол или ДМСО (диметилсульфоксид), смесь оксидов железа (II, III) и пероксида водорода, хлорид натрия (осмотический шок)	+						[172, 173]

Преимуществами биохимических методов является высокая селективность процесса, мягкие условия проведения процесса (комнатная температура, нейтральный уровень pH) [175]. К недостаткам можно отнести необходимость тщательного отбора микроорганизмов (альгицидный лизис), высокая стоимость коммерческих ферментов, необходимость удаления или инактивации ферментов после дезинтеграции клеток микроводорослей [167]. Одним из главных подходов при поиске оптимальных способов подготовки биомассы для извлечения целевых компонентов заключается в выборе последовательности комбинаций известных методов (табл. 5), обеспечивающих минимальную деградацию целевых веществ при оптимальных затратах энергии и времени.

Термическая обработка включает термолиз, автоклавирование и обработку острым паром. Несмотря на то, что это простые технологии с низкой стоимостью

обслуживания, они характеризуются низкой эффективностью, высоким потреблением энергии, образованием большого количества нежелательного клеточного мусора, ограниченной термостойкостью целевого продукта, подлежащего извлечению [176].

Осмотический шок. Механизм действия осмотического шока на клетки заключается в снижении внутриклеточного осмотического давления, приводящего к повреждению клеточной стенки и увеличению ее проницаемости. В работе [177] установили эффективность экстракции липидов после обработки клеток осмотическим шоком у микроводорослей *Botryococcus sp. MCC32* и *S. sorokiniana MIC-G5* по сравнению с другими методами дезинтеграции клеток (автоклавирования, пастеризации и СВЧ-обработки). К достоинствам этого метода можно отнести простоту. К недостаткам длительность и трудность масштабирования.

Таким образом, механические методы дезинтеграции менее специфичны и дезинтегрируют клеточные стенки всех видов микроводорослей, но более энергоемкие, чем химические и биохимические методы. Химическая дезинтеграция клеточных стенок менее энергоемкая, но связана с веществами, которые могут повлиять на качество и чистоту целевого продукта. Биологический метод дезинтеграции считается безопасным, но в настоящее время мало изучен и обычно экономически не выгоден. Эффективность метода разрушения клеток может значительно меняться в зависимости от вида микроводорослей и свойств целевого продукта. В этом смысле использование нескольких методов разрушения клеток является способом повышения эффективности разрушения клеток и, следовательно, извлечения целевого биоконпонента.

1.4.3 Подбор экстрагента для экстракции целевых продуктов из клеток микроводорослей и цианобактерий

Экстрагенты должны обладать избирательностью, быть безопасными (не горючими, не взрывоопасными), экономичными, максимально извлекать целевые

компоненты из биомассы, не вступать в химическое взаимодействие с целевыми компонентами и не изменять их биологических свойств [179].

В работе [180] McConnell и др. исследовали метод экстракции внутриклеточных липидов из биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* с использованием гексана и гептана в качестве растворителей. Гептан извлекает липиды быстрее, чем гексан, так как гептан кипит при более высокой температуре, чем гексан. Более высокая температура увеличивает скорость массообмена. Экстракция гексановым растворителем приводит к более высокому максимальному выходу липидов, чем гептан. Чтобы получить аналогичные результаты, объем гептана должен быть в шесть раз больше, чем объем гексана.

Fajardo и соавт. [181] проанализировали кинетику экстракции внутриклеточных липидов из биомассы клеток микроводорослей с помощью этанола. Этанол обладает как полярными, так и неполярными свойствами, поэтому он выделяет полярные и неполярные липиды. Это значит, что использование этанола в качестве растворителя позволит выделить большее количество липидов, чем гексан или гептан.

Ruckebosch E. и др. [182] исследовали влияние различных систем растворителей на экстракцию липидов из микроводорослей, богатых омега-3 жирными кислотами: *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloropsis sp.* и *Phaeodactylum tricornutum*. Использовались следующие виды растворителей: хлороформ/метанол в соотношении 1:1, гексан/изопропанол в соотношении 3:2 и гексан. Экстракция с помощью системы растворителей хлороформ/метанол дала наибольшее количество липидов. Этот метод является эталонным методом для извлечения общих липидов из микроводорослей. Несмотря на то, что экстракция липидов с использованием хлороформа эффективна, крупномасштабная экстракция липидов с использованием данного растворителя будет затруднена из-за рисков для окружающей среды и здоровья. Для каждой микроводоросли содержание нейтральных липидов было самым высоким в экстракте с использованием в качестве растворителя гексана и более низким в экстрактах с использованием растворителей хлороформ/метанол и гексан/изопропанол.

Следовательно, количество полярных липидов (гликолипидов и фосфолипидов) было самым низким в экстракте с гексаном. Эти наблюдения могут быть объяснены сочетанием двух факторов: некоторое количество нейтральных липидов может храниться в клетке микроводорослей в виде небольших масляных капель, которые могут быть экстрагированы неполярным экстракционным растворителем, таким как гексан, или петролейный эфир. Петролейный эфир является эффективным неполярным растворителем для экстракции липидов. Он менее летучий, чем этиловый эфир.

Полярные липиды, а также некоторые нейтральные липиды образуют комплексы с белками в клеточной мембране. Белково-липидные ассоциации не могут быть разрушены неполярным экстракционным растворителем. Изопропанол имеет более полярную природу и способен извлекать из биомассы микроводорослей больше нелипидного, более полярного материала (например, белков, углеводов) [182].

Было отмечено, что общий выход веществ липидной природы с использованием одного и того же растворителя (смеси) разный для разных видов микроводорослей. Основным фактором, который определяет степень извлечения от различных видов микроводорослей, по-видимому, является проницаемость клеточной стенки. Извлечение различных компонентов было самым высоким у *Isochrysis*, наименьшим у обоих видов *Nannochloropsis* и промежуточным для *Phaeodactylum*. В частности, виды *Nannochloropsis* имеют толстую жесткую клеточную стенку, которая содержит алифатический, негидролизующий биополимер, называемый альгаенаном, что объясняет ее низкую проницаемость. Клеточная стенка *Phaeodactylum* состоит из высокой концентрации полисахаридов, связанных только с небольшим количеством слабо полимеризованного силиката, что объясняет ее высокую проницаемость. Также нельзя исключать, что различия в условиях роста и обработки между различными видами повлияли на результаты. Так же более высокую или более низкую экстрагируемость липидов у разных видов микроводорослей могут объяснять

наличие белково-липидных комплексов в клетках микроводорослей и сила связей этих комплексов.

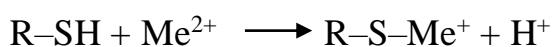
Буферы для экстракции белков имеют ионную силу 0,1 – 0,2 М и рН 7,0 – 8,0, что близко к условиям в клетке. Чаще всего применяют Tris или фосфатный буфер. В основном функция фосфатного буфера заключается в поддержании постоянного физиологического рН. В этой среде клетки могут оставаться стабильными, так как физиологические условия максимально имитируются. Кроме того, буфер может содержать множество различных добавок [183].

Антиоксиданты. Внутри клетки белки находятся в строго восстановительных условиях, а после разрушения клетки попадают в более окисленную среду. Большинство белков имеют несколько сульфгидрильных групп (из остатка цистеина), способных окисляться с образованием внутри- и межмолекулярных дисульфидных мостиков. Чтобы этого избежать, в буфер часто добавляют восстанавливающие агенты, такие как дитиотрейтол, β-меркаптоэтанол, цистеин или восстановленный глутатион [183].

Ингибиторы ферментов. Как только клетка разрушена, ее содержимое может подвергаться воздействию протеолитических ферментов (например, из лизосом), которые в интактной клетке были специальным образом упакованы и действие которых строго контролировалось. Эти ферменты способны разрушить белки, в том числе и целевой белок. Для ослабления нежелательного протеолиза экстракцию и все стадии очистки проводят при 4 °С в присутствии ингибиторов протеаз. Каждый ингибитор специфичен к определенному типу протеаз – сериновых, тиоловых, аспартат-протеаз и металлопротеаз. Среди часто применяемых ингибиторов можно назвать ингибиторы сериновых протеаз диизопропилфторфосфат (DFP), фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и тозилфенилаланилхлорметилкетон (TPCK), ингибиторы тиоловых протеаз иодоацетат и цистатин, ингибитор аспартат-протеазы пепстатин, ингибиторы металлопротеаз ЭДТА и 1,10-фенантролин, ингибиторы экзопептидаз амастатин и бестатин [183].

Субстраты и кофакторы ферментов. При выделении ферментов в стартовый буфер часто добавляют небольшое количество субстрата, поскольку связывание субстрата в активном центре фермента может стабилизировать фермент. Кроме того, добавляют и кофакторы ферментов, которые могут быть потеряны в процессе очистки. Все это позволяет измерять активность фермента на различных этапах выделения, например, в хроматографических фракциях.

ЭДТА. Этот реагент добавляют в буфер для связывания ионов двухвалентных металлов, которые могут реагировать с тиогруппами белков, образуя меркаптиды:



Поливинилпирролидон (ПВП) часто добавляют в буфер при экстракции белков из растительных тканей. Растения содержат довольно много фенольных производных (как мономерных – типа *p*-гидроксибензойной кислоты, так и полимерных – типа танинов), способных связываться с ферментами и другими белками путем гидрофобных и ионных взаимодействий, а также водородных связей, что может приводить к выпадению белка в осадок. Фенольные производные, кроме того, легко окисляются (главным образом под действием эндогенных фенол-оксидаз) с образованием хинонов, которые являются очень активными веществами и могут реагировать с реакционными группами белка, вызывая образование перекрестных сшивок, агрегатов и осадка. Нерастворимый ПВП (имитирующий полипептидную цепь) связывает фенольные соединения, которые затем легко удаляются при центрифугировании. Для снижения активности фенолоксидаз и предотвращения образования хинонов в буфер также добавляют тиосоединения (в качестве восстанавливающих агентов) [183].

Азид натрия. В буфер, который предполагается хранить продолжительное время, добавляют антибактериальные и противогрибковые агенты в низких концентрациях. Азид натрия часто используют в качестве бактериостатического средства.

Мембранные белки (обычно гликопротеины) требуют особых условий выделения, поскольку при обычной процедуре разрушения клеток они не

высвобождаются. Существуют два класса мембранных белков. Периферические мембранные белки связаны лишь с поверхностью клетки, обычно за счет электростатических взаимодействий и водородных связей. Обычно эти белки имеют гидрофильную природу и их относительно легко экстрагировать либо путем повышения концентрации соли в буфере (например, добавляя 1 М NaCl), либо путем изменения pH (до 3 – 5 или 9 – 12). После экстракции такие белки можно подвергать очистке [183].

Интегральные мембранные белки глубоко внедрены в мембрану. Они обязательно имеют протяженные гидрофобные участки (именно эти участки внедрены в мембрану и связаны с липидными слоями) и характеризуются слабой растворимостью в водных растворах. Следовательно, при экстракции в полярную водную среду необходимо создать условия для поддержания таких белков в растворенном состоянии. Для этого в экстрагирующий буфер обычно добавляют детергент. Выбор детергента часто осуществляется экспериментальным путем; среди ионных детергентов можно назвать додецилсульфат натрия (SDS), дезоксихолат натрия, бромид цетилтриметил-аммония (СТАВ) и CHAPS, а среди неионных детергентов – Trion X-10 и Nonidet P-40 [183]. После экстракции интегральные белки можно подвергать очистке с помощью обычных хроматографических методов, таких как гель-фильтрация, ионообменная или аффинная хроматография (с помощью лектинов). Однако в любом случае во все буферы необходимо добавлять детергент для поддержания белков в растворенном состоянии. Количество детергента в процессе очистки обычно в 10-100 раз ниже того, что использовалось при экстракции белка (чтобы минимизировать влияние детергента на ход хроматографического разделения) [183].

Глава 2. Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовались штаммы фототрофных микроорганизмов, полученные в Институте физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН: цианобактерии *Anabaena sphaerica* Born. et Flah. IPPAS В-40 (рис. 9).



Рисунок 9 – микрофотография цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 ($\times 1000$)

Микроводоросли *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss. IPPAS С-1 (рис. 10).

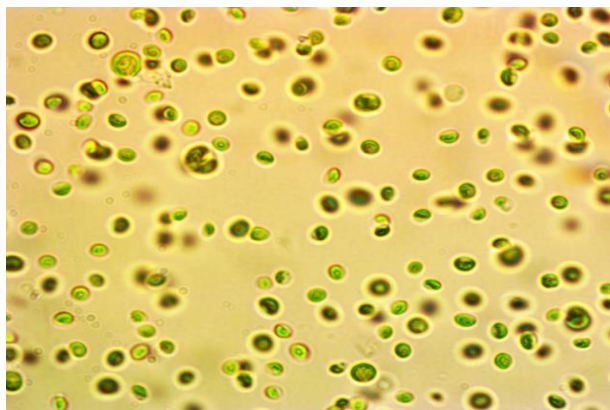


Рисунок 10 – микрофотография микроводорослей *Chlorella sorokiniana* ($\times 1000$)

В качестве тест-культуры (рис. 11) при исследовании антибактериальных свойств использовались бактерии, выделенные в лаборатории «Пищевые технологии и биотехнология» ФГБОУ ВО «ТГТУ» при помощи седиментационного метода (метода Коха) [184]: грамположительные, палочковидные размером $0,5 - 2,5 \times 1,2 - 10$ мкм, аэробы, на мясо-пептонном агаре

образующие гладкие колонии беловатого цвета. Полученная бактериальная культура была исследована на предмет определения таксономической принадлежности в Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» ЦКП «Биоинженерия». Установлено, что культура не является аксеничной культурой, доминирующий компонент образца, вероятнее всего, принадлежит к роду *Bacillus*. Определение таксономической принадлежности осуществлялось согласно методикам [185 – 187].



Рисунок 11 – Микрография грамположительной бактериальной культуры рода *Bacillus* ($\times 1200$)

Для хранения коллекции культуры микроводорослей *Chlorella sorokiniana* использовали питательную среду Прата следующего состава (г/л): KNO_3 – 0,1; KH_2PO_4 – 0,01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,001, агар – 1,2 % (об.) (ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия) [188].

Для культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana* использовали питательную среду Тамия [191 – 193] следующего состава (г/л): KNO_3 – 3,2; KH_2PO_4 – 0,2; MgSO_4 – 0,125; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,013 (ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия) с добавлением раствора микроэлементов (г/л): $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; CuSO_4 – 0,8; MoO_3 – 0,018; H_3BO_3 – 0,28; NH_4VO_3 – 0,023 (ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия).



Рисунок 12 – Чистая культура микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Пересев культур осуществлялся в пробирки с плотной питательной средой (рис. 12). Пробирки с пересеянной культурой помещали в температуру +10 – 12 °С. Засев культуры с твердой среды в жидкую производили пересевом отдельных колоний со скошенного агара в колбы с питательной средой. Культивирование проводили сначала в колбах на 250 мл, впоследствии в фотобиореакторе на 5 л (рис. 14).

Эксперименты были проведены с применением культур микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, предварительно обработанных смесью антибиотиков (оксолиновая кислота 10 мкг/мл, ампициллин 150 мкг/мл) для уничтожения бактерий, присутствующих в культурах. Смесью антибиотиков удаляли после последовательных разведений в течение 3 – 4 недель. Это было проверено путем посева на чашки Петри со средой Прата [195].

Для культивирования цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 (рис. 13) использовали питательную среду Зарукка следующего состава (г/л): NaHCO_3 – 16,8; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; NaNO_3 – 2,5; K_2SO_4 – 1,0; NaCl – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; $\text{Fe} + \text{ЭДТА}$ – 1 мл (ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия) с добавлением растворов микроэлементов 1 (г/л) (H_3BO_3 – 2,86; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81 г; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08; MoO_3 – 0,015) и 2 (г/л) (NH_4VO_3 – 0,023; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$ – 0,096; $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,048; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,018; $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ – 0,040; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,044) (ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия) [189 – 191].



Рисунок 13 – Чистая культура цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-

404

Засев в фотобиореактор производили на стационарной стадии роста внесением посевного материала в количестве 10 % (об.) от объема среды. Уровень рН изменялся в диапазоне 6,2 – 8,0; аэрация суспензии осуществлялась

газовоздушной смесью с концентрацией углекислого газа 0,03 % (расход (1,3 ± 0,2) л/мин) [194].

Схема экспериментальной установки

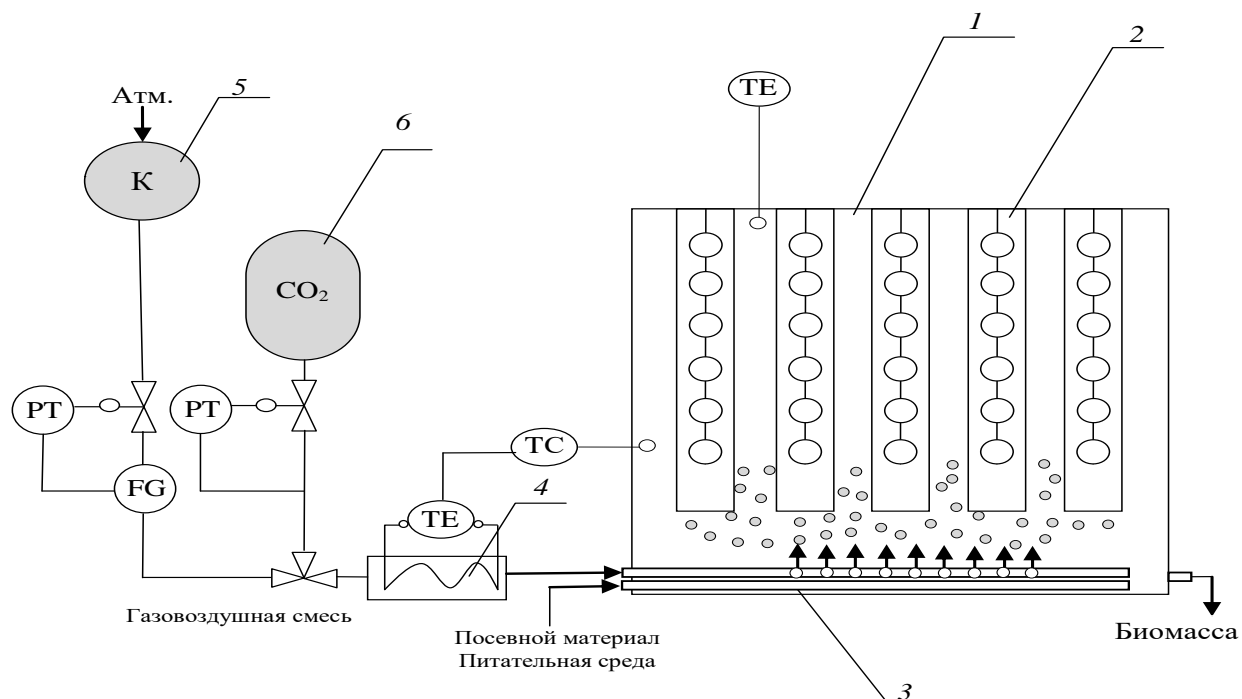


Рисунок 14 – Лабораторная установка для культивирования цианобактерий и микроводорослей: 1 – фотобиореактор, 2 – источник освещения (светодиодный кабель), 3 – устройство для подачи посевного материала, питательной среды и барботаж; 4 – нагреватель для поддержания температуры культивирования; 5 – компрессор для подачи воздуха; 6 – баллон с CO₂, РТ – прибор для измерения давления, FG – прибор для измерения расхода, ТС – прибор для регулирования температуры, ТЕ – датчик для измерения температуры

Определение общего количества микроводорослей (клеток/см³) производилось с использованием программы ЭВМ (приложение 1) с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева [197] по следующей формуле:

$$x = n \cdot 4 \cdot 10^6 = (4 \cdot m / 16 \cdot 25) \cdot 10^6 = (m / 100) \cdot 10^6 \quad (1)$$

Количество клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в полученной суспензии составляло 40 млн кл/мл.

Диаметр клеток определялся с помощью окуляр-микрометра [198]. Для расчета площади поверхности клеток S использовалась формула:

$$S = 4 \cdot \pi \cdot R^2, \quad (2)$$

где R – радиус клетки, мкм.

Микроскопические наблюдения проводили на микроскопе МИКРОМЕД 3 ЛЮМ. Анализ культуральной жидкости микроводорослей на наличие контаминантов проводился с использованием метода оптической микроскопии (препарат фиксированный мазок) [198].

Концентрирование клеток микроводорослей и цианобактерий осуществлялось с использованием центрифуги *Sigma 2-16 PK/2-16P* при скорости вращения 4000 об/мин в течение 10 минут [199].

Определение концентрации клеток микроводорослей и цианобактерий в суспензии осуществлялось гравиметрическим методом: предварительно взвешенную пробирку наполняли сконцентрированной биомассой, затем помещали в термостат при температуре 40 °С и сушили до постоянной массы ($\Delta = 0,01$ г), затем взвешивали. Сухую биомассу определяли по формуле:

$$M = (a-b)/V, \quad (3)$$

где M – концентрация сухой биомассы, г/мл; a – масса центрифужной пробирки со сконцентрированной биомассой клеток, г; b – масса центрифужной пробирки без биомассы, г; V – объем культуральной жидкости, мл.

Для извлечения белков из клеток микроводорослей осуществляли дезинтеграцию клеток в виде пасты влажностью 98 – 99 % с использованием ультразвука (мощность 150 Вт) в течение 5 минут и фермента лизоцима в концентрации 20 мг/г в течение 4 часов. Сушку клеток микроводорослей осуществляли в термостате при температуре 40 °С до постоянной массы ($\Delta = 0,01$ г) [200].

Для извлечения липидов сушку клеток микроводорослей осуществляли в суховоздушном шкафу «HS-121A» при температуре 80 °С до постоянной массы ($\Delta = 0,05$ г) [200].

Экстракцию белков из биомассы микроводорослей и цианобактерий проводили при температуре 4 °С в течение 20 ч с использованием в качестве растворителя 25 мл фосфатного буфера (рН 7,2 – 7,4) (Na₂HPO₄ (ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), KH₂PO₄ (ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия) [200].

Экстракцию липидов из обедненной белком биомассы микроводорослей и цианобактерий проводили в аппарате Сокслета в течение 8 ч с использованием в качестве растворителя петролейного эфира взятого в соотношении 1 г биомассы : 20 мл эфира [202].

Отделение экстракта от клеточной биомассы осуществляли с помощью центрифуги (IKA-Werke; центрифуга IKA mini G, Staufen im Breisgau, Германия) (в течение 10 минут при 6000 об/мин).

Содержание белка в экстракте определяли с использованием спектрофотометрического метода (спектрофотометр ПЭ-5400 УФ; ООО «ЭКРОСХЕМ», Санкт-Петербург, Россия) [204]. В спектрофотометрическом методе проводятся измерения при двух длинах волн – 260 и 280 нм и вводится поправка:

$$\text{Белок (мг/мл)} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}, \quad (4)$$

Массовую долю экстрагированных неполярных веществ липидной природы определяли по формуле:

$$M_{\text{л}} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \cdot 100\%, \quad (5)$$

где $M_{\text{л}}$ – массовая доля экстрагированных липидов, %; m_1 – масса высушенной биомассы клеток микроводорослей до экстракции, г; m_2 – масса высушенной биомассы клеток микроводорослей после экстракции, г.

Определение качественного и количественного состава неполярной фракции, выделенной из клеток и культуральной жидкости микроводорослей и цианобактерий, и разделение по фракциям осуществлялись с использованием метода тонкослойной хроматографии. Анализ проводился на пластинках Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ с использованием элюирующей системы смеси петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота (90(об.) : 10(об.) : 1 (об.)) [196].

Идентификацию проводили по положению зон адсорбции на хроматограмме при просмотре в ультрафиолетовом свете [206]. Расчет кинетики метаболических путей триацилглицеридов в клетках микроводорослей осуществлялся с использованием программы ЭВМ (приложение 1). Анализ жирных кислот, содержащихся в экстракте микроводорослей и цианобактерий, проводился с использованием газового хроматографа «Кристаллюкс-4000М».

Гидролиз белков до пептидов осуществлялся с помощью фермента пепсина (рН 2) при температуре 37 °С в течение 4 часов. Инактивирование фермента осуществлялось при температуре 85 °С в течение 15 мин [203, 205]. Выравнивание рН осуществлялось добавлением NaOH (ЧДА) до уровня 7.

Биомасса клеток цианобактерий влажностью 98 – 99 % делилась на образцы объемом по 25 мл и подвергалась дезинтеграции при воздействии ультразвука мощностью 150 Вт в течение 300 с. После чего дезинтегрированные клетки сушились до постоянной массы при температуре 40 °С ($\Delta = 0,01$ г).

Обедненную белком биомассу цианобактерий сушили в суховоздушном шкафу «HS-121A» при температуре 80 °С до постоянной массы ($\Delta = 0,05$ г) [200].

Экстракция неполярных соединений из культуральной жидкости (КЖ) микроводорослей и цианобактерий осуществлялась в аппарате с мешалкой (при скорости вращения мешалки 600 об/мин), температуре 40 °С в течение 3 часов с использованием в качестве экстрагента петролейного эфира при соотношении 1,14 мл (КЖ) : 1 мл (ПЭ).

Дистилляция полученных неполярных экстрактов осуществлялась с использованием роторного испарителя IR-1 M3 при температуре дистилляции 85 °С [207].

Для определения чувствительности грамположительных микроорганизмов к метаболитам микроводорослей и цианобактерий использовались диско-диффузионный метод и метод лунок [212, 214]. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) определялась согласно алгоритму, представленному в [214].

Значение рН определялось с помощью рН-метра рН-150МИ.

Концентрацию глюкозы определяли с помощью феррицианидного метода [201].

Подсчет удельной скорости роста клеток дрожжей осуществлялся по формуле:

$$\mu = \frac{\ln(x_n) - \ln(x_0)}{t_n - t_0} \quad (6)$$

где x_l – концентрация клеток дрожжей на 0 и n сутки, млн кл/мл; t – время культивирования, сутки.

Расчет удельной скорости роста и времени генерации

Время генерации вычислялось по формуле 7:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,963}{\mu}, \quad (7)$$

где μ – удельная скорость роста дрожжей.

Обработка данных осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Matlab и Microsoft Excel.

Статистическая обработка данных.

В экспериментах по исследованию методов дезинтеграции биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* для определения значимости коэффициентов уравнения регрессии проводились n параллельных измерений в центре плана, на основании которых определялось стандартное отклонение или дисперсия воспроизводимости S_y^2 :

$$S_y^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{m - 1} \quad (8)$$

Ошибка j -го коэффициента уравнения при количестве опытов N определялась в соответствии с уравнением:

$$S_{b_j} = \frac{S_{\text{воспр}}}{\sqrt{N}} \quad (9)$$

Значимость каждого коэффициента определялась с использованием соотношения:

$$t_j = \frac{|b_j|}{s_{b_j}} > t_{1-p}(f), \quad (10)$$

при этом учитывалось табличное значение коэффициента Стьюдента.

Для оценки адекватности математического описания процесса находилась дисперсия адекватности:

$$S_{\text{ад}} = \frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{N - m} \quad (11)$$

Степень адекватности математического описания оценивалась по критерию Фишера F : [208]

$$F = \frac{S_{\text{ост}}^2}{S_{\text{воспр}}^2} \leq F_{\text{таб}} \quad (12)$$

Статистический анализ в экспериментах по исследованию антибактериальной и стимулирующей активности проводился с использованием SPSS (статистический пакет для социальных наук) версии 20,0. Существенные различия между средними значениями зон ингибирования определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и Post-Hoc теста Тьюки при уровне значимости $p < 0,05$. Сравнение двух средних значений минимальных ингибирующих концентраций между собой осуществлялся с помощью t-критерия Стьюдента. Перед проведением t-критерия проверены предположения о нормальности и дисперсии однородности с помощью критерия Шапиро-Уилка и теста Левена соответственно. Статистическая значимость определялась на уровне $\geq 95\%$, при этом $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Был проведен корреляционный анализ для изучения взаимосвязи между концентрацией экстракта (независимая переменная) и диаметром зоны ингибирования (зависимая переменная). Коэффициент детерминации (R^2) применялся для измерения силы корреляции. В экспериментах по исследованию стимулирующих свойств при проведении t-теста сравнивались средние значения емкости популяции, величины экспоненциальной фазы, удельной скорости роста и времени генерации экспериментальных образцов и контроля.

Глава 3. Теоретические и экспериментальные исследования антибактериальных и стимулирующих свойств биологически активных метаболитов микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

3.1 Исследование влияния технологических параметров культивирования на количество водорастворимых белков и неполярных веществ липидной природы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

Целью исследования было изучение влияния технологических параметров культивирования (уровень ФАР, температура) на качественный и количественный состав метаболитов микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 (неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков).

Культивирование штаммов осуществлялось в течение 7 дней при температуре и уровне фотосинтетически активной радиации (ФАР) согласно таблице 6.

Таблица 6 – Условия культивирования штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

Режим культивирования	ФАР, мкмоль фотонов/(м ² ·с)	Температура, °С
1	33 ± 0,1	20 ± 0,1
2	100 ± 0,1	20 ± 0,1
3	33 ± 0,1	36 ± 0,1
4	100 ± 0,1	36 ± 0,1

Результаты эксперимента показали, что условия культивирования оказывают значительное влияние на содержание неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков в биомассе клеток *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404. Наибольшие концентрации биомассы клеток штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 на 7 сутки культивирования 0,36 г/л и 19,4 г/л соответственно наблюдались при культивировании в условиях режима 4 (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м²·с); температура = 36 ± 0,1 °С). Наиболее значительное накопление неполярных

соединений липидной природы в биомассе клеток *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 наблюдалось при культивировании штаммов в условиях режима 1 (ФАР = $33 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/(м²·с); температура $20 \pm 0,1$ °С), что связано, по-видимому, с тем, что данные условия культивирования являются стрессовыми для штаммов и вызывают значительную перестройку метаболизма (рис. 15, 16). На рисунке 15 представлены концентрации биомассы, неполярных соединений липидной природы и внутриклеточного белка цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

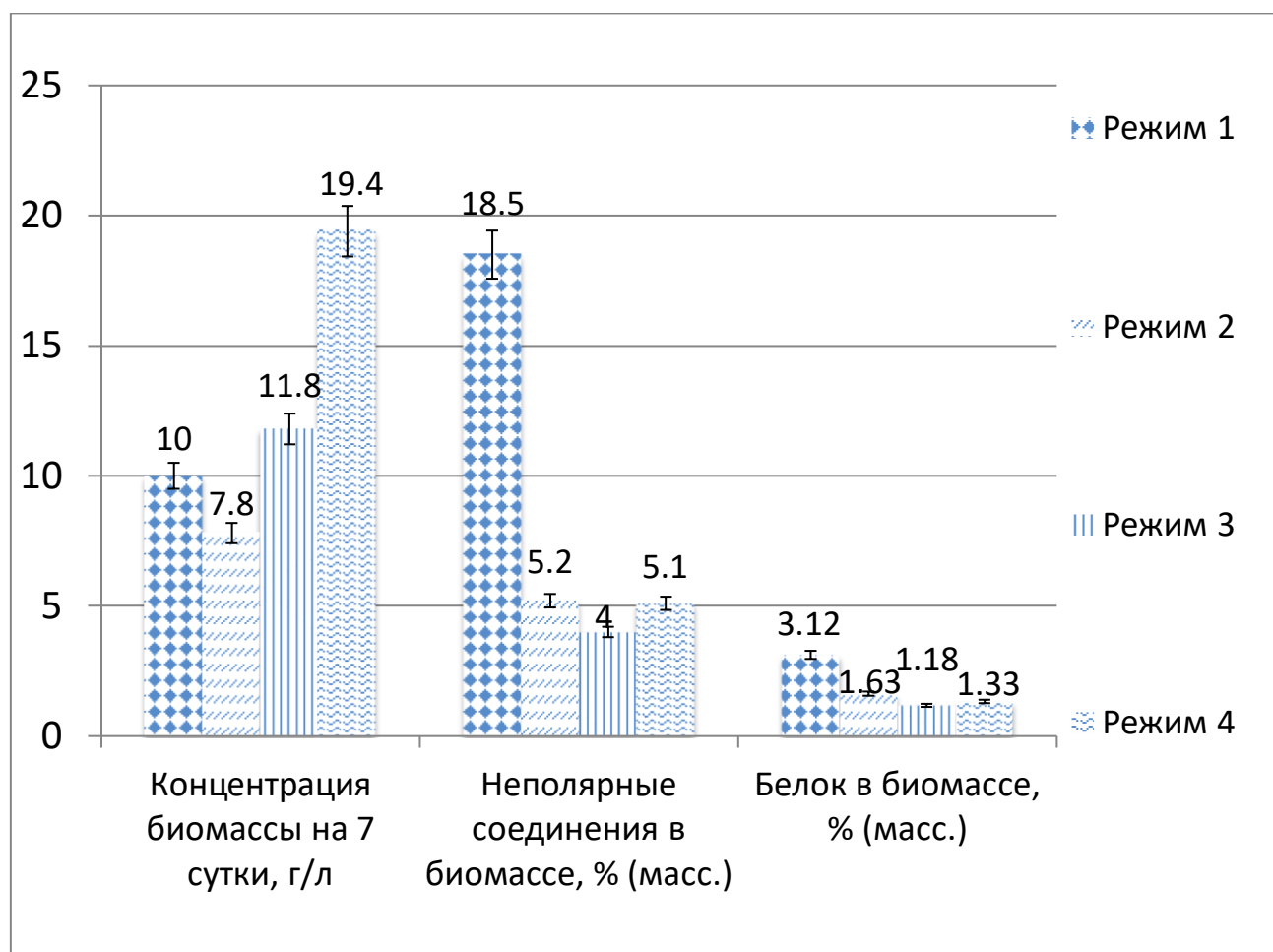


Рисунок 15 – Концентрации биомассы, неполярных соединений липидной природы и внутриклеточного белка цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-

404

На рисунке 16 представлены концентрации биомассы, неполярных соединений липидной природы и внутриклеточного белка микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

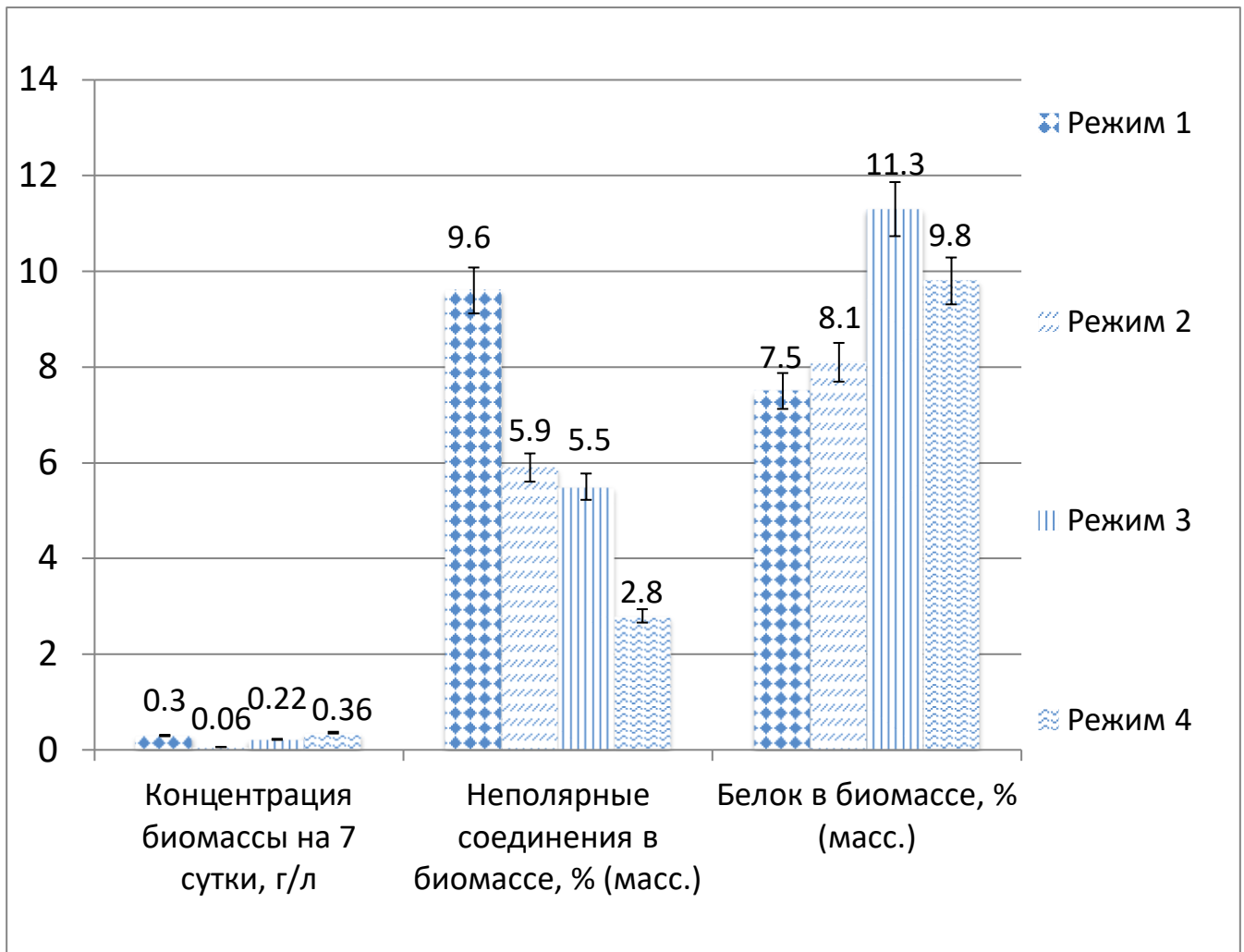


Рисунок 16 – Концентрации биомассы, неполярных соединений липидной природы и внутриклеточного белка цианобактерий *Chlorella sorokiniana*

3.2 Определение возможности повышения интенсивности и степени извлечения водорастворимых внутриклеточных белков из биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

3.2.1 Сравнительный анализ методов дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на выход водорастворимых внутриклеточных белков

Целью исследования был сравнительный анализ методов дезинтеграции (использование фермента лизоцима, сверхвысокочастотного излучения (СВЧ-излучения) и ультразвука) клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, позволяющих извлечь наибольшее количество внутриклеточных водорастворимых белков с минимальными затратами.

На первом этапе осуществлялось исследование различных способов дезинтеграции (использование фермента лизоцима, СВЧ-излучения и ультразвука) при различных режимах на выход внутриклеточных водорастворимых белков.

Отрицательным контролем была биомасса микроводорослей без предварительной дезинтеграции (табл. 7).

Таблица 7 – Параметры контрольного образца

t_s , °C	Z , кДж	$\bar{S} \pm 1,9$ мкм ²	Белки, % (масс.)
24 ± 1	-	38,5	1,4

\bar{S} – средняя площадь клеточной поверхности, t_s – температура, Z – энергетические затраты.

Биомасса микроводорослей, использованная в экспериментах, содержала клетки на разных стадиях развития, которые можно условно разделить на молодые клетки (диаметр клеток 1 – 2,5 мкм) и зрелые клетки (диаметр клеток более 2,5 мкм). Основное их отличие состоит в наличии сформированного слоя клеточной стенки из хитиноподобного гликана в зрелых клетках и различном внутриклеточном осмотическом давлении [209].

Дезинтеграцию клеток микроводорослей осуществляли с использованием следующих методов (табл. 8 – 10):

1. Разрушение клеток с применением фермента лизоцима, взятого в количестве 10, 30 мг/г биомассы при температуре 37 °C в течение 2, 6 часов [209] (табл. 8).

Таблица 8 – Параметры дезинтеграции клеток лизоцимом

Режим	Время воздействия, ч	Количество фермента, мг/г	t_s , °C	Z_f , кДж	$\bar{S} \pm 1,9$ мкм ²	Белок, % (масс.)
1	6	30	37 ± 1	3,4	21,2	3,5
2	6	10		3,4	18,1	3,2
3	2	30		2,0	47,8	3,0
4	2	10		2,0	10,1	3,1

\bar{S} – средняя площадь клеточной поверхности, t_s – температура, Z_f – энергетические затраты.

В результате действия фермента разрушается хитиноподобный гликановый слой клеточной стенки, что снижает ее прочность [209, 211]. При этом молекулы фермента будут встраиваться в фосфолипидную мембрану, в результате чего в мембране образуются поры, через которые в клетку будет поступать вода из внешней среды. Клетки будут увеличиваться в размерах, и часть из них будет распадаться, а у остальных увеличится интенсивность массообмена между внутренним объемом и внешней средой.

При малых дозах фермента наблюдается более интенсивное разрушение зрелых клеток, что приводит к уменьшению средней площади клеточной поверхности \bar{S} . При повышении исходной концентрации фермента ко второму часу обработки (режим 3) наблюдается прирост средней площади поверхности клеток в 1,2 раза (до 47,8 мкм²) по сравнению с контрольным образцом, по-видимому, за счет образования пор в фосфолипидной мембране молодых клеток, что приводит к изменению осмотического давления и поступлению воды в клетки. Затем эти клетки разрушаются к 6-му часу обработки (режим 1), о чем свидетельствует уменьшение средней площади поверхности клеток на 45 % по сравнению с контрольным образцом. Ферментативная обработка представляет собой процесс, ограниченный медленной диффузией, которую можно интенсифицировать, предварительно обработав клетки другим методом дезинтеграции [200].

2. Разрушение СВЧ-излучением мощностью 280, 420 или 560 Вт в течение 10, 20 или 30 с (1, 2 или 3 цикла обработки) [210] (табл. 9).

СВЧ-излучение вызывает разрушение клеток микроводорослей за счет возникновения «локального перегрева» во внутриклеточном пространстве, возникающего из-за быстрого вращения полярных молекул в генерируемом переменном электромагнитном поле: внутриклеточная вода вскипает, что приводит к избыточному внутриклеточному давлению и последующему распаду клеток. При этом большая часть клеток будет полностью разрушена, другая часть получит локальные повреждения клеточной стенки и фосфолипидной мембраны, через которые в клетку будет поступать вода [200].

Таблица 9 – Параметры дезинтеграции клеток СВЧ-излучением

Режим	Время, с	Мощность, Вт	Количество операций, шт.	t_s , °C	Z_{MW} , кДж	$\bar{S} \pm 1,9$ мкм ²	Белок, % (масс.)
1	30	560	3	70	50,4	30,2	5,3
2	30	280	3	53	25,2	22,9	4,7
3	10	560	3	50	16,8	32,2	4,5
4	10	280	3	45	8,4	28,3	4,3
5	30	560	1	70	16,8	24,6	4,2
6	30	280	1	52	8,4	28,3	3,4
7	10	560	1	38	5,6	24,6	3,5
8	10	280	1	38	2,8	42,5	3,3
9	20	420	2	61	16,8	21,2	4,5

\bar{S} – средняя площадь клеточной поверхности, t_s – температура, Z_{MW} – энергетические затраты.

3. Обработка клеток ультразвуком с частотой 25 кГц, мощностью 50, 100 или 150 Вт в течение 60, 180 или 300 секунд (1, 3 или 5 циклов обработки) (табл. 10).

Таблица 10 – Параметры дезинтеграции клеток ультразвуком

Режим	Время, с	Мощность, Вт	УЗ/тишина, с/с	t_s , °C	Z_{US} , кДж	$\bar{S} \pm 1,9$ мкм ²	Белок, % (масс.)
1	300	150	5/1	38	37,5	13,8	8,2
2	300	50	5/1	35	12,5	28,5	5,9
3	60	150	5/1	34	7,5	32,2	8,0
4	60	50	5/1	32	2,5	52,8	1,6
5	300	150	1/1	39	22,5	32,2	3,5
6	300	50	1/1	35	7,5	50,2	2,2
7	60	150	1/1	35	4,5	52,8	4,2
8	60	50	1/1	36	1,5	36,3	1,3
9	180	100	3/1	36	13,5	26,4	1,0

\bar{S} – средняя площадь клеточной поверхности, t_s – температура, Z_{US} – энергетические затраты.

Воздействие ультразвука на клетки приводит к отрыву макромолекул и молекулярных комплексов от внешней поверхности цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, что обусловлено кавитационными эффектами, возникающими на границе «клетка – внешняя среда». Это приводит к полному

разрыву клеток или к образованию пор в фосфолипидной мембране и поступлению воды во внутриклеточное пространство, что сопровождается увеличением площади клеточной поверхности [200].

3.2.2 Оптимизация методов и условий дезинтеграции клеток микроводорослей с использованием полного факторного эксперимента

Для каждого метода дезинтеграции клеток, исследованного экспериментально, была решена задача оптимизации по поиску минимума энергетических затрат (кДж). Проводили оптимизацию методов и условий дезинтеграции клеток микроводорослей по показателям уровня выхода внутриклеточного белка, спланированную по схеме полного факторного эксперимента (ПФЭ) [208]. Число проводимых опытов N составляет: $N = n^k$, где N – число опытов; n – количество уровней варьирования факторов; k – число варьируемых факторов. Для получения данных, используемых при определении эффективности метода разрушения с минимальными энергетическими затратами, проводили дезинтеграцию клеток микроводорослей для извлечения белковых соединений лизоцимом, СВЧ-излучением и ультразвуком (табл. 11 – 16).

Таблица 11 – Матрица ПФЭ дезинтеграции клеток микроводорослей ферментом лизоцимом

Режим	Время обработки ферментом (X_1), ч	Количество вносимого фермента (X_2), мг/г	Кодированное значение (X_1)	Кодированное значение (X_2)	$Y_{\text{расч}}$	Y
1	6	30	+1	+1	3,45	3,50
2	6	10	+1	-1	3,25	3,20
3	2	30	-1	+1	2,95	3,00
4	2	10	-1	-1	3,15	3,10

По результатам проведенного экспериментального исследования были получены уравнения регрессии, описывающие результаты экспериментального исследования процесса дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* (регрессионные уравнения были получены по алгоритму обработки экспериментальных данных, представленному в [208]):

1) дезинтеграция клеток ферментом лизоцимом описывается регрессионным уравнением вида: $Y = 3,2 + 0,15X_1 + 0,05X_2 + 0,1X_1X_2$, где Y – выход внутриклеточного водорастворимого белка (% масс), X_1 – время обработки ферментом (часы); X_2 – количество фермента лизоцима (мг/г биомассы микроводорослей).

На следующем этапе необходимо исключить незначимые коэффициенты: $Y = 3,2 + 0,15X_1 + 0,1X_1X_2$.

В таблице 12 представлены показатели адекватности регрессионного уравнения.

Таблица 12 – Показатели адекватности регрессионного уравнения

Параметр	S_y^2	S_{b_j}	$t_{0,95}$	$S_{ад}^2$	F	$F_{таб}$
Значение	0,0075	0,025	2,31	0,01	4	5,3

2) дезинтеграция клеток СВЧ-излучением описывается регрессионным уравнением вида: $Y = 4,15 + 0,25X_1 + 0,225X_2 + 0,55X_3 + 0,125X_1X_2 + 0,05X_1X_3 - 0,025X_2X_3 - 0,025X_1X_2X_3$, где Y – выход внутриклеточного водорастворимого белка (% масс.), X_1 – время обработки СВЧ-излучением (секунды); X_2 – мощность СВЧ-излучения (Вт), X_3 – количество циклов обработки (шт.).

Таблица 13 – Матрица ПФЭ дезинтеграции клеток СВЧ-излучением

Режим	Время обработки (X_1), с	Мощность (X_2), Вт	Количество операций обработки (X_3), шт	Кодированное значение			$Y_{расч}$	Y
				(X_1)	(X_2)	(X_3)		
1	30	560	3	+1	+1	+1	5,35	5,30
2	30	280	3	+1	-1	+1	4,65	4,70
3	10	560	3	-1	+1	+1	4,50	4,50
4	10	280	3	-1	-1	+1	4,30	4,30
5	30	560	1	+1	+1	-1	4,15	4,20
6	30	280	1	+1	-1	-1	3,45	3,40
7	10	560	1	-1	+1	-1	3,50	3,50
8	10	280	1	-1	-1	-1	3,30	3,30
9	20	420	2	0	0	0	4,15	4,50

На следующем этапе необходимо исключить незначимые коэффициенты: $4,15 + 0,25X_1 + 0,225X_2 + 0,55X_3 + 0,125X_1X_2 + 0,05X_1X_3$.

В таблице 14 представлены показатели адекватности регрессионного уравнения.

Таблица 14 – Показатели адекватности регрессионного уравнения

Параметр	S_y^2	S_{b_j}	$t_{0,95}$	$S_{ад}^2$	F	$F_{Таб}$
Значение	0,007	0,016	2,12	0,002	0,87	2,9

3) дезинтеграция клеток ультразвуком описывается регрессионным уравнением вида: $Y = 4,36 + 0,59X_1 + 1,61X_2 + 1,56X_3 - 0,71X_1X_2 + 0,54X_1X_3 + 0,56X_2X_3 - 0,31X_1X_2X_3$, где Y – выход внутриклеточного водорастворимого белка (% масс), X_1 – время обработки ультразвуком (минуты); X_2 – мощность ультразвука (Вт), X_3 – время воздействия ультразвуком в течение одной операции обработки (секунды).

На следующем этапе необходимо исключить незначимые коэффициенты: $Y = 4,36 + 0,59X_1 + 1,61X_2 + 1,56X_3 + 0,54X_1X_3 + 0,56X_2X_3$.

Таблица 15 – Матрица ПФЭ дезинтеграции клеток ультразвуком

Режим	Время обработки (X_1), с	Мощность (X_2), Вт	Режим ультразвук/тишина (X_3), с/с	Кодированное значение			$Y_{расч}$	Y
				(X_1)	(X_2)	(X_3)		
1	300	150	5/1	+1	+1	+1	9,20	8,20
2	300	50	5/1	+1	-1	+1	4,90	5,90
3	60	150	5/1	-1	+1	+1	6,97	8,00
4	60	50	5/1	-1	-1	+1	2,89	1,60
5	300	150	1/1	+1	+1	-1	3,90	3,50
6	300	50	1/1	+1	-1	-1	0,70	2,20
7	60	150	1/1	-1	+1	-1	3,80	4,20
8	60	50	1/1	-1	-1	-1	1,70	1,30
9	180	100	3/1	0	0	0	4,36	1,00

В таблице 16 представлены показатели адекватности регрессионного уравнения.

Таблица 16 – Показатели адекватности регрессионного уравнения

Параметр	S_y^2	S_{b_j}	$t_{0,95}$	$S_{ад}^2$	F	$F_{Таб}$
Значение	1,55	0,25	2,12	1,48	2,85	2,9

Подсчет энергетических затрат на дезинтеграцию клеток в 25 мл суспензии. Общие энергетические затраты на дезинтеграцию клеток в 25 мл суспензии при

обработке их ферментом лизоцимом Z_f (Дж) складывались из следующих составляющих:

$$Z_f = Z_1 + Z_2, \quad (13)$$

где Z_1 – энергетические затраты на нагрев суспензии микроводорослей с температуры 24 °С (температура в лаборатории) до 37 °С (оптимальная температура для действия лизоцима) определялись по формуле $Z_1 = c_s \cdot m \cdot (t_2 - t_1)$; c_s – теплоемкость суспензии микроводорослей, Дж/(г·К), m – масса суспензии микроводорослей, г, $t_2 = 37$ °С, $t_1 = 24$ °С; Z_2 – затраты на поддержание температуры 37 °С в течение всего времени обработки (принимались равными 40 Дж/ч), Дж.

Энергетические затраты Z_{MW} (Дж) при обработке биомассы микроводорослей (25 мл) СВЧ-излучением определялись по формуле:

$$Z_{MW} = P_{MW} \cdot \tau_{MW} \cdot n_{MW}, \quad (14)$$

где P_{MW} – мощность СВЧ-излучения, Вт; τ_{MW} – время воздействия СВЧ-излучения, с; n_{MW} – количество циклов обработки.

Энергетические затраты Z_{US} (Дж) при обработке биомассы микроводорослей (25 мл) ультразвуком определялись по формуле:

$$Z_{US} = P_{US} \cdot \tau_{US}, \quad (15)$$

где P_{US} – мощность воздействия ультразвуком, Вт; τ_{US} – время воздействия ультразвука, с.

Определено, что при дезинтеграции клеток микроводорослей с помощью фермента лизоцима, выход водорастворимого внутриклеточного белка не менее 3 % будет наблюдаться при времени обработки ферментом = 2 ч, количестве фермента = 30 мг/г, при этом затраты будут минимальны и составят 2 кДж; при дезинтеграции клеток микроводорослей с помощью СВЧ-излучения, выход водорастворимого внутриклеточного белка не менее 3,3 % будет наблюдаться при времени обработки СВЧ-излучением 10 с., мощности СВЧ-излучения 280 Вт, количестве циклов обработки 1 раз, при этом затраты будут минимальны и составят 2,8 кДж; установлено, что при дезинтеграции клеток микроводорослей с помощью ультразвука, выход водорастворимого внутриклеточного белка не

менее 1,3 % будет наблюдаться при времени обработки ультразвуком = 1 мин, мощности ультразвука 50 Вт, режиме 1 с (ультразвук) / 1 с (перерыв), при этом затраты будут минимальны и составят 1,5 кДж.

Результаты полного факторного эксперимента показали, что, как и ожидалось, на выход внутриклеточного водорастворимого белка (% масс.) помимо времени обработки оказывает существенное влияние количество фермента (при обработке ферментом лизоцимом), мощность СВЧ-излучения и количество операций обработки (при воздействии СВЧ-излучения), а так же мощность и режим обработки ультразвуком (при воздействии ультразвука). Выявлено, что время дезинтеграции прямо пропорционально влияет на затраты материальных и энергетических ресурсов. Наиболее перспективными методами дезинтеграции с точки зрения сокращения времени на обработку являются СВЧ-излучение и ультразвук. Перспективным подходом к дезинтеграции клеток может стать совместное влияние рассмотренных воздействий. Результаты анализа экспериментальных данных позволяют предположить, что изучение последовательного влияния рассмотренных способов разрушения на интенсивность и полноту экстракции метаболитов позволит найти подход, обеспечивающий повышение выхода целевых продуктов.

3.2.3 Исследование кинетики выхода внутриклеточных водорастворимых белков

На следующем этапе осуществлялось исследование кинетики выхода внутриклеточных водорастворимых белков при использовании различных методов дезинтеграции (ультразвук, СВЧ-излучение и ферментативная обработка лизоцимом) (табл. 17 – 19).

При воздействии ультразвуком наиболее высокий выход белка наблюдался при времени воздействия 40 мин. При использовании только одного метода разрушения клеток микроводорослей ультразвук оказался наиболее эффективным и повысил выход водорастворимых белков в 8,8 раза (до 12,3 %) по сравнению с контрольным образцом (1,4 %).

Таблица 17 – Кинетика выхода белков при дезинтеграции клеток ультразвуком

Режим	Время воздействия, мин	Мощность, Вт	Ультразвук/тишина, с/с	Белок, % (масс.)
1	1	150	5:1	2,5
2	5			4,4
3	10			3,9
4	15			3,5
5	20			4,4
6	30			7,4
7	40			12,3
8	50			11,6
9	60			12,1

При воздействии СВЧ-излучением наиболее высокий выход белка наблюдался при времени воздействия – 40 секунд. При дезинтеграции клеток СВЧ-излучением выход водорастворимых белков повысился в 3,1 раза (до 4,3 %) по сравнению с контрольным образцом (1,4 %).

Воздействие СВЧ-излучения 30 с, мощность излучения 560 Вт, количество циклов воздействия 1 (табл. 18).

Таблица 18 – Кинетика выхода белков при дезинтеграции клеток СВЧ-излучением

Режим	Время воздействия, с	Мощность, Вт	Количество операций, шт.	Белок, % (масс.)
1	10	560	1	3,0
2	20			3,2
3	30			4,2
4	40			4,3
5	50			4,0

Время обработки ферментом в концентрации 20 мг/г составило 1 – 8 ч при 37 °С (табл. 19).

При воздействии ферментом лизоцимом (рис. 18) наиболее высокий выход белка наблюдался при времени воздействия 4 часа. При дезинтеграции клеток ферментом выход водорастворимых белков повысился в 2,6 раза (3,7 %) по сравнению с контрольным образцом (1,4 %).

Таблица 19 – Кинетика выхода белков при дезинтеграции клеток ферментом ЛИЗОЦИМОМ

Режим	Время воздействия, ч	Концентрация фермента, мг/г	Белок, % (масс.)
1	1	20	3,0
2	2		3,2
3	4		3,7
4	6		3,0
5	8		2,0

3.2.4 Исследование влияния комплексного разрушения биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на выход внутриклеточных водорастворимых белков

На следующем этапе проводилось исследование влияния комплексного разрушения биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на выход внутриклеточных водорастворимых белков (табл. 20).

Таблица 20 – Условия проведения эксперимента по комплексной дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Режим	Стадия 1	τ_1 , мин	Стадия 2	τ_2 , мин	τ , мин	$\bar{S} \pm 1,9$ мкм ²	Мощность, кДж	Белки, % (масс.)	
1	Ультразвук	5,0	Фермент	240,0	245,0	42,5	40,9	20,6	
2	СВЧ	0,5	Фермент	240,0	240,5	33,8	53,7	11,3	
3	Фермент	0,0	Ультразвук	5,0	245,0	33,8	40,4	9,5	
4	Фермент	0,0	СВЧ	0,5	240,5	28,3	53,7	9,5	
5	Ультразвук	5,0	СВЧ	0,5	5,5	29,0	87,4	3,5	
6	СВЧ	0,5	Ультразвук	5,0	5,5	38,0	87,4	4,6	
7	Фермент	240	СВЧ	0,5	240,5	40,7	53,7	4,4	
8	Фермент	240	Ультразвук	5,0	245,0	50,2	40,4	5,6	
9	Отрицательный контроль						38,5	-	1,4

Предварительное воздействие методами физической дезинтеграции значительно повышает эффективность действия фермента (режимы 1 – 2). Введение фермента на первой стадии с последующей незамедлительной обработкой ультразвуком или СВЧ-излучением (режимы 3 и 4) приводит к снижению выхода водорастворимого белка. По-видимому, это связано с тем, что

ультразвуковое и СВЧ-излучение разрушают как клеточные стенки микроводорослей, так и нативную структуру некоторых молекул лизоцима, что снижает эффективность его воздействия на клетки.

Комбинация ультразвука и фермента более эффективна (режим 1), чем комбинация СВЧ-излучения и фермента (режим 2). Причиной, вероятно, является возникновение локального микроскопического перегрева при воздействии СВЧ-излучения, приводящее к субоптимальным условиям для фермента ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), и более высокая эффективность воздействия ультразвука на клетки микроводорослей по сравнению с СВЧ-излучением. Предварительная обработка клеток ультразвуком значительно повышала эффективность и, по-видимому, сокращала время ферментативной обработки, так как «новые мишени ферментов» (частично разрушенные микрофибриллы клеточной стенки, отверстия в клеточной стенке и фосфолипидная мембрана) появлялись после воздействия ультразвуком.

Установлен синергетический эффект нескольких методов разрушения клеток микроводорослей, применяемых последовательно с целью извлечения внутриклеточных водорастворимых белков. Предложен механизм комплексного действия сочетаний различных методов дезинтеграции на эффективность экстракции внутриклеточных белков из клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*. Установлено, что метод комплексного последовательного использования ультразвука и фермента для дезинтеграции биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* позволяет увеличить выход внутриклеточных водорастворимых белков в 14,7 раз по сравнению с контролем.

3.3 Исследование антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на грамположительные бактерии

На первом этапе проводилось изучение антибактериальных свойств неполярных соединений, извлеченных из культуральной жидкости и биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Для определения чувствительности грамположительных микроорганизмов к неполярным веществам липидной природы вещества наносились на диски размером 5 мм. В чашку Петри со средой Мюллера-Хинтона (МХА) (толщина слоя агара в чашке $4 \pm 0,5$ мм) на питательную среду вносилось 50 мкл грамположительных бактерий с концентрацией $99,9 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Далее чашки с дисками помещались в термостат на 20 ч с температурой 37°C в соответствии с условиями в таблице 21. В качестве положительного контроля использовался антибиотик азитромицин – 15 мкг – стандартный диск (Научно-исследовательский центр фармакотерапии (НИЦФ), Санкт-Петербург, Россия), в качестве отрицательного контроля – диск, пропитанный петролейным эфиром.

Таблица 21 – Зоны ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации неполярных веществ липидной природы из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Количество, мкг	Зоны ингибирования неполярных веществ липидной природы из биомассы <i>Chlorella sorokiniana</i> *, мм			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
Свет (ФАР= $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$))				
1000	$7,3 \pm 1,53$	$8,2 \pm 1,0^a$	-	$12,0 \pm 0,1^a$
500	-	$6,97 \pm 0,06^b$	-	$9,0 \pm 0,1^b$
МИК, мкг/мл	≈ 1000	$198 (R^2=1)$	-	$125 (R^2=1)$

* – значения представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов ($n = 3$); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Установлено, что ингибирующее действие на рост грамположительных бактерий при освещении белым светом (ФАР $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$)) оказывает неполярный экстракт из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, культивируемых в условиях режимов 1, 2 и 4. При этом, минимальная ингибирующая концентрация (МИК) неполярной липидной фракции в условиях режима 4 ≈ 125 мкг/мл ($R^2 = 1$), что делает данный режим наиболее перспективным для получения антибактериальных веществ липидной природы. В данном исследовании, в отсутствие освещения ингибирующий

эффект отсутствовал даже при внесении на диск максимального количества неполярных веществ 1000 мкг (табл. 21).

На рисунке 17 представлены результаты по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* при уровне ФАР $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$).

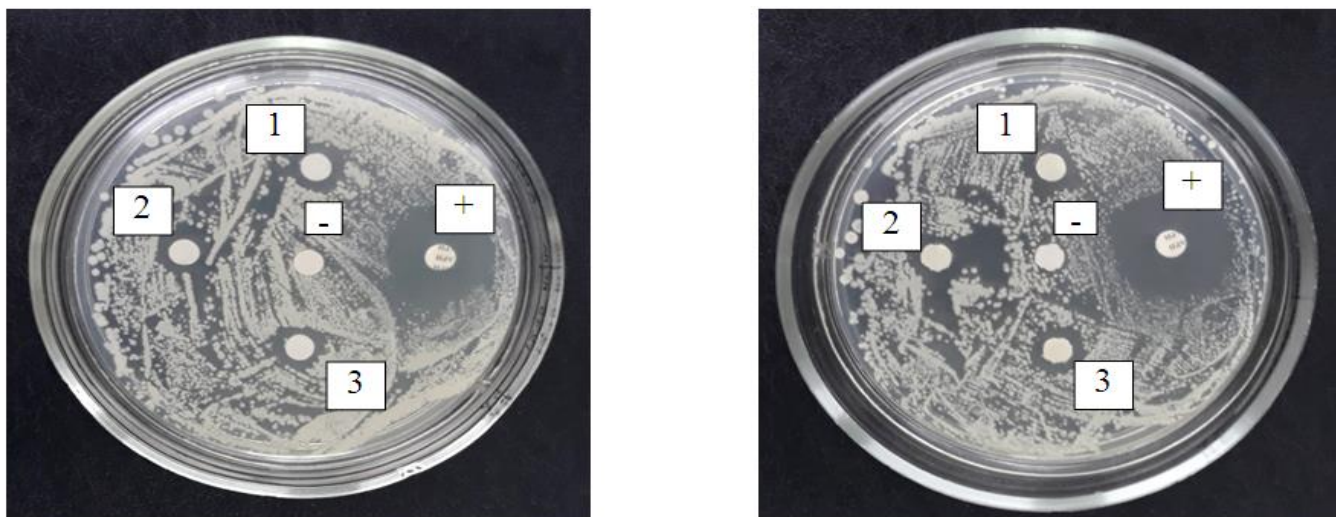


Рисунок 17 – Режим 4 (1000 мкг): 1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, - - отрицательный контроль

Анализ неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* (рис. 18), полученного из биомассы клеток, культивируемых в условиях режима 4 (температура культивирования $36 \pm 0,1$ °С; уровень ФАР $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$)), проводился с использованием метода тонкослойной хроматографии.



Рисунок 18 – Неполярный экстракт микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

По результатам обработки трека была получена хроматограмма, при анализе которой в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на пластинках можно выделить пики: при $R_f = 0,1...0,13$ – соответствует жирным кислотам, $R_f = 0,35...0,38$ – соответствует триацилглицеридам, $R_f = 0,74$ – соответствует О-диалкилмоноглицеридам и $R_f = 0,85...0,90$ – соответствует эфирам стерина или эфирам восков или триалкиловым эфирам глицерина (рис. 19) [196].

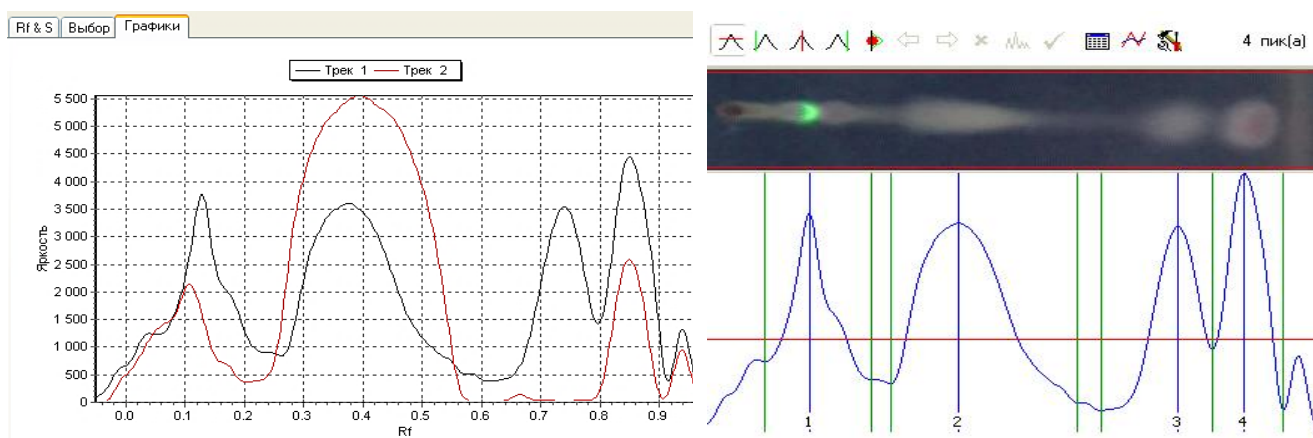


Рисунок 19 – Хроматограмма неполярного экстракта биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

При определении качественного и количественного состава неполярных веществ липидной природы, извлеченных из клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, культивируемых в условиях режима 4, было установлено, что общая концентрация веществ, идентифицированных методом тонкослойной хроматографии, в смеси составляла приблизительно 138 мг/мл (табл. 22).

Таблица 22 – Качественный и количественный состав неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Название	Концентрация, мг/мл
Триацилглицериды	47,5
Жирные кислоты:	35
О-диалкилмоноглицериды	25
Эфиры	30
Каротиноиды	0,005
Хлорофилл	0,001
Всего	138

Расчет концентрации веществ проводился с использованием одного стандарта (рис. 20).

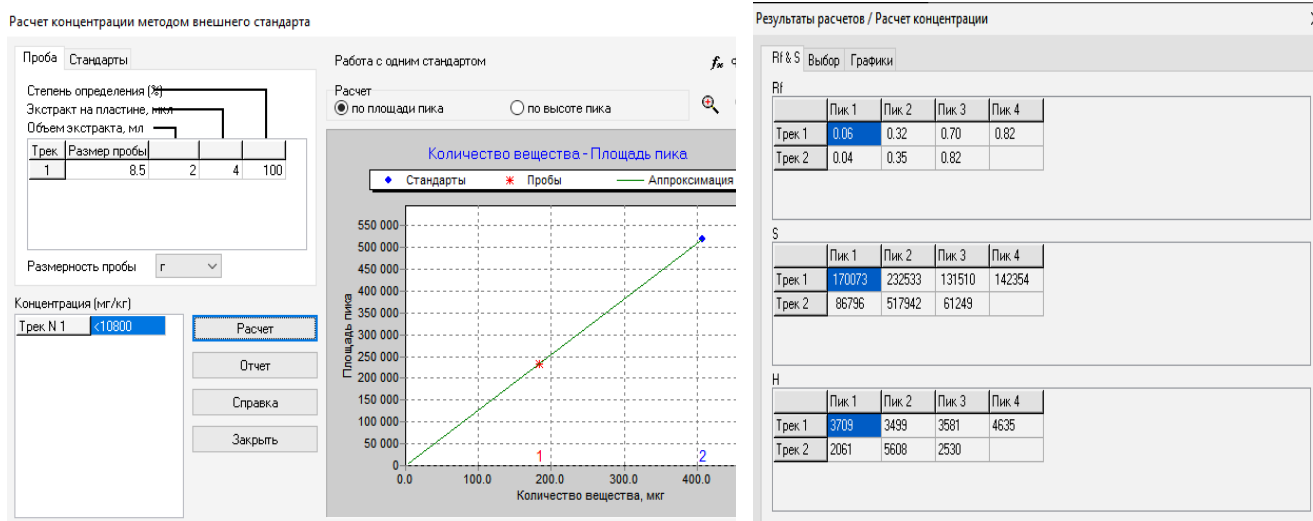


Рисунок 20 – Расчет концентрации методом внешнего стандарта

При анализе жирнокислотного состава неполярных веществ липидной природы, извлеченных из клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, культивируемых в условиях режима 4, установлено, что в состав входят как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты. Химическая структура компонентов неполярной фракции, извлеченной из клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, позволяет предположить наличие у этих соединений двойных связей (линолевая кислота) (рис. 21).

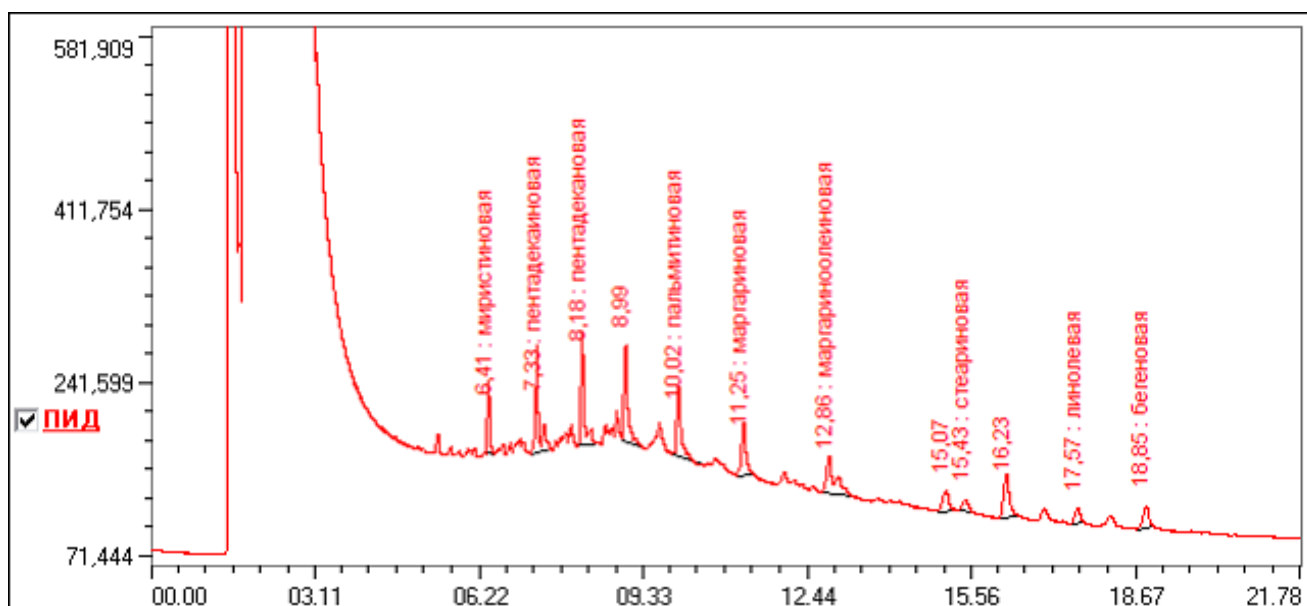


Рисунок 21 – Хроматограмма жирнокислотного состава экстракта

Далее проводилось исследование антибактериальных свойств отдельных фракций неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*. Для определения чувствительности грамположительных микроорганизмов использовался метод лунок, согласно методике, описанной в [212].

На первом этапе эксперимента стерильным инструментом в среде МХА (толщина слоя агара в чашке $4 \pm 0,5$ мм), залитой в чашки Петри, проделывались лунки размером 6 мм. Затем, в чашку Петри на питательную среду с проделанными лунками вносилось 50 мкл грамположительных бактерий с концентрацией $99,9 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Далее в лунки вносились фракции липидов. Затем чашки Петри инкубировали, как в предыдущем опыте. В качестве положительного контроля использовался антибиотик азитромицин – 15 мкг, в качестве отрицательного контроля – петролейный эфир.

Таблица 23 – Антибактериальная активность триацилглицеридов и жирных кислот микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Вещество	Кол-во вещ-ва в лунке, мкг	Диаметр зоны ингибирования, мм*
Триацилглицериды	1000 ± 33	$13,7 \pm 0,6^a$
	800 ± 27	$12,7 \pm 0,6^a$
	600 ± 20	12 ± 0^a
	400 ± 13	11 ± 1^b
	МИК, мкг/мл	176,2 ($R^2=0,96$)
Жирные кислоты	1000 ± 34	$11,7 \pm 0,6^a$
	800 ± 27	11 ± 1^a
	600 ± 20	9 ± 0^b
	МИК, мкг/мл	445 ($R^2=0,98$)

* – значения представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов ($n=3$); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Результаты эксперимента позволяют сделать вывод о том, что из всех веществ липидной природы, входящих в состав неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* антибактериальным действием обладают триацилглицериды и жирные кислоты (рис. 22, 23) при уровне ФАР $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$). МИК $\approx 176,2 - 445$ мкг/мл (табл. 23). На рисунках 22, 23

представлены результаты антибактериального действия триацилглицеридов и жирных кислот.

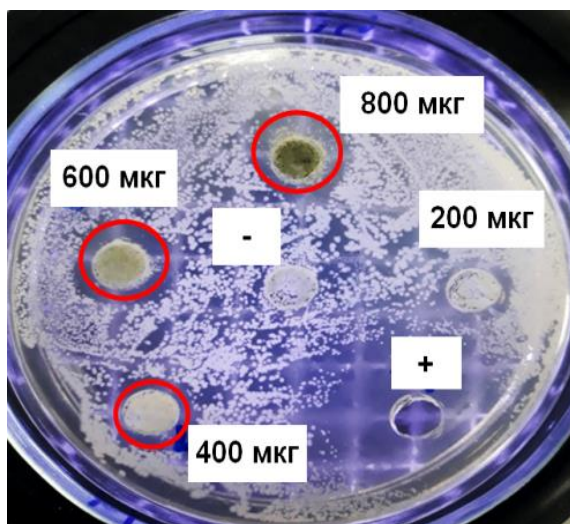


Рисунок 22 – Триацилглицериды:

1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, – - отрицательный контроль

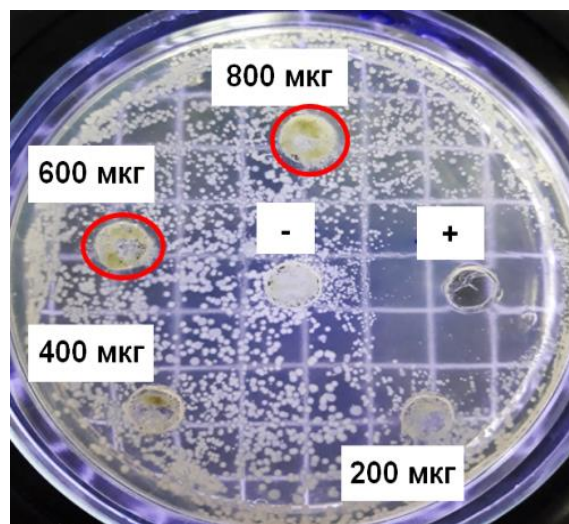


Рисунок 23 – Жирные кислоты:

1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, – - отрицательный контроль

На следующем этапе проводилось исследование антибактериальных свойств водорастворимой белковой фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, извлеченной из биомассы клеток микроводорослей, разрушенной ультразвуком (150 Вт) в течение 5 минут, в отношении грамположительной бактериальной культуры с помощью метода лунок, как в предыдущем опыте, согласно методике, описанной в [212].

Результаты эксперимента позволяют сделать вывод, что водорастворимая белковая фракция, извлеченная из биомассы микроводорослей, не обладает антибактериальными свойствами ни в темноте, ни на свету. Зоны ингибирования отсутствуют у всех образцов, но, по-видимому, соединения (или часть соединений), присутствующие в данной фракции наоборот стимулируют рост бактерий, так как визуально наблюдается их повышенный рост около лунок с внесенным белком (рис. 24, 25).

Полученные водорастворимые пептидные фракции из культуральной жидкости и из биомассы клеток *Chlorella sorokiniana* были протестированы на наличие антибактериальных свойств в отношении грамположительных бактерий.

Исследование антибактериальных свойств водорастворимых пептидных фракций осуществлялось с помощью метода лунок, как в предыдущих опытах.

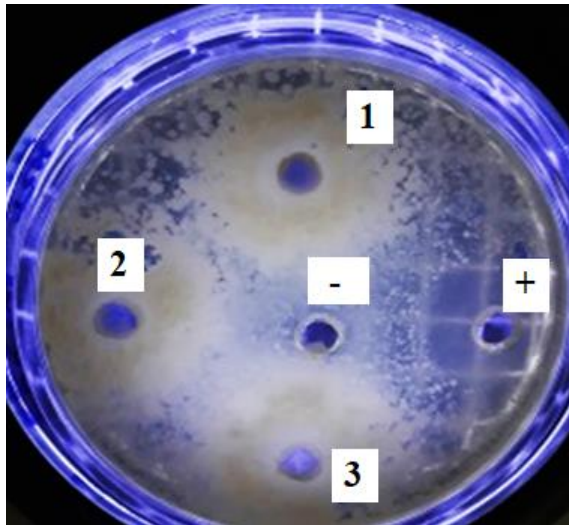


Рисунок 24 – 700 ± 70 мкг: 1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, - - отрицательный контроль

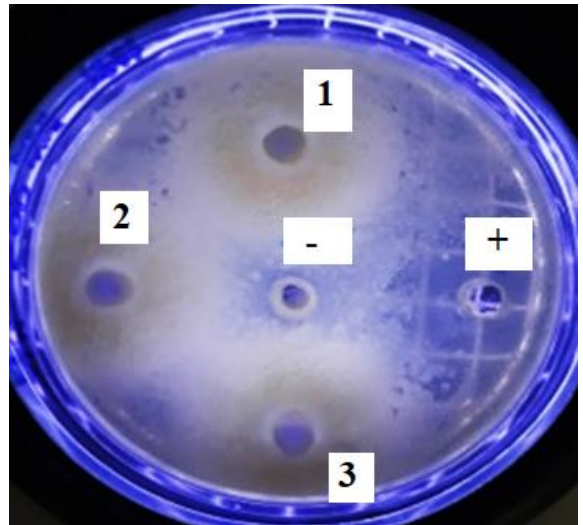


Рисунок 25 – 400 ± 40 мкг: 1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, - - отрицательный контроль

На рисунках 26, 27 представлены результаты антибактериальной активности водорастворимой пептидной фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

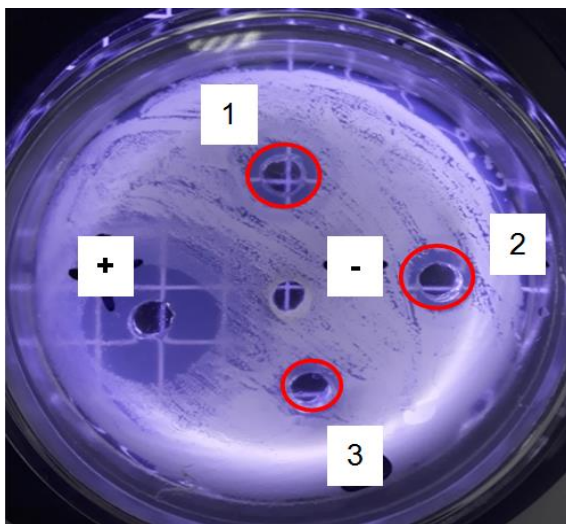


Рисунок 26 – 800 ± 80 мкг : 1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, - - отрицательный контроль

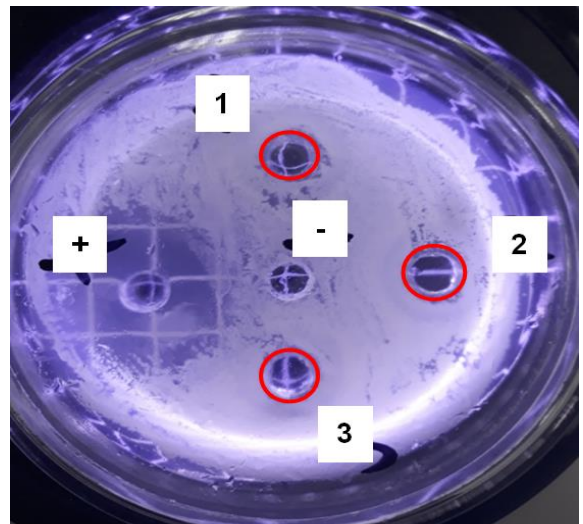


Рисунок 27 – 400 ± 40 мкг : 1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, - - отрицательный контроль

Таблица 24 – Результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств водорастворимых пептидных фракций, извлеченных из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Количество, мкг	Зоны ингибирования пептидных экстрактов из биомассы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> , мм*			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота			
800 ± 27	-	-	-	12,7 ± 0,5 ^a
700 ± 24	-	-	-	11,5 ± 0,5 ^{ab}
600 ± 20	-	-	-	11,2 ± 0,2 ^b
500 ± 17	-	-	-	11,0 ± 0,4 ^b
400 ± 13	-	-	-	9,0 ± 0,7 ^c
МИК, мкг/мл	-	-	-	170 ² (R ² =0,89)
	Свет (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))			
800 ± 27	-	-	-	12,7 ± 0,4 ^a
700 ± 24	-	-	-	11,4 ± 0,5 ^b
600 ± 20	-	-	-	11,1 ± 0,4 ^b
500 ± 17	-	-	-	10,8 ± 0,4 ^b
400 ± 13	-	-	-	8,2 ± 0,6 ^c
МИК, мкг/мл	-	-	-	125 ¹ (R ² =0,9)

* – значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n=3); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$; ^{1,2} – значения достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Установлено, что пептидные фракции из биомассы обладают антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий, как на свету, так и в темноте в условиях режима 4, что делает его наиболее перспективным для получения пептидных фракций, имеющих величины МИК 125 – 170 мкг/мл (табл. 24).

3.4 Изучение антибактериального действия водорастворимых пептидных фракций и неполярных веществ липидной природы цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 на грамположительные бактерии

Целью исследования являлось изучение антибактериального действия метаболитов цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 на грамположительные бактерии.

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что неполярные вещества липидной природы из культуральной жидкости *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 обладают значительными антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету ($\text{ФАР} = 100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/ $(\text{м}^2 \cdot \text{с})$), так и в темноте. Условия культивирования штамма значительно влияют на эффективность воздействия экстракта в отношении грамположительных бактерий, наиболее перспективны режимы культивирования 1 и 2, позволяющие получить неполярные вещества липидной природы, имеющие величины МИК $54 - 90$ мкг/мл и $27 - 41$ мкг/мл соответственно (табл. 25).

Таблица 25 – Зоны ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации неполярных веществ липидной природы из культуральной жидкости цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

Экстракт на диске, мкг	Зоны ингибирования неполярных веществ липидной природы из культуральной жидкости <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS B-404*, мм			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота			
1000 ± 33	12,67 ± 0,67 ^a	13,33 ± 0,67 ^a	19,53 ± 1,78 ^a	17,87 ± 1,45 ^a
500 ± 17	8,77 ± 0,01 ^b	11,03 ± 0,84 ^a	11,67 ± 0,67 ^b	7,17 ± 0,16 ^b
100 ± 3	6,63 ± 0,01 ^c	7,43 ± 0,10 ^b	-	-
50 ± 2	-	6,83 ± 0,45 ^c	-	-
МИК, мкг/мл	90 ¹ ($R^2=0,9$)	41 ¹ ($R^2=0,95$)	330 ¹ ($R^2=1$)	462 ¹ ($R^2=1$)
	Свет ($\text{ФАР} = 100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/ $(\text{м}^2 \cdot \text{с})$)			
1000 ± 33	28,67 ± 2,45 ^a	23,67 ± 0,67 ^a	21,37 ± 0,79 ^a	15,43 ± 0,05 ^a
800 ± 27	24,67 ± 2,45 ^{ab}	22,67 ± 0,67 ^a	19,90 ± 0,51 ^a	13,57 ± 0,89 ^{ab}
600 ± 20	22,67 ± 2,41 ^b	19,33 ± 2,67 ^{ab}	19,07 ± 0,98 ^a	11,60 ± 0,21 ^{ab}
400 ± 13	15,00 ± 0,46 ^c	17,33 ± 2,67 ^b	14,30 ± 0,91 ^b	11,33 ± 0,11 ^b
200 ± 7	14,67 ± 0,67 ^c	15,33 ± 2,45 ^b	8,33 ± 0,67 ^c	7,9 ± 0,51 ^b
100 ± 3	8,40 ± 0,13 ^d	14,33 ± 0,67 ^b	7,60 ± 0,96 ^c	-
50 ± 2	7,33 ± 0,67 ^e	6,67 ± 0,67 ^c	-	-
МИК, мкг/мл	54 ² ($R^2 = 0,9$)	27 ² ($R^2 = 0,95$)	101 ² ($R^2 = 0,95$)	131 ² ($R^2 = 0,95$)

* – значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов ($n=3$); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$; ^{1,2} – значения достоверно отличаются при $p < 0,05$.

На рисунках 28, 29 представлены результаты по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы из культуральной жидкости цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 при уровне ФАР $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$).

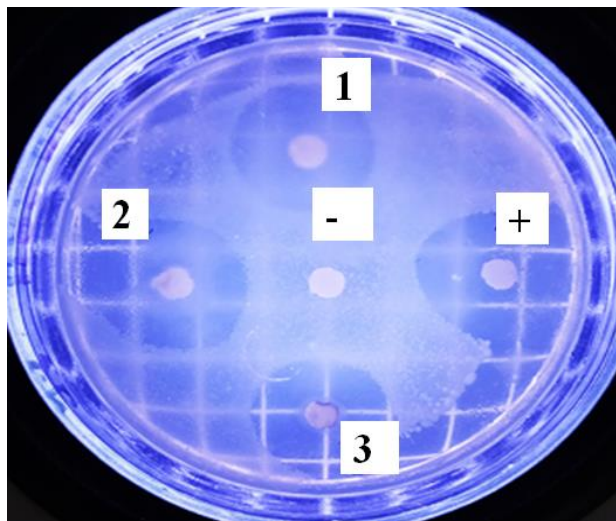


Рисунок 28 – Режим 1 (1000 мкг): 1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, – - отрицательный контроль

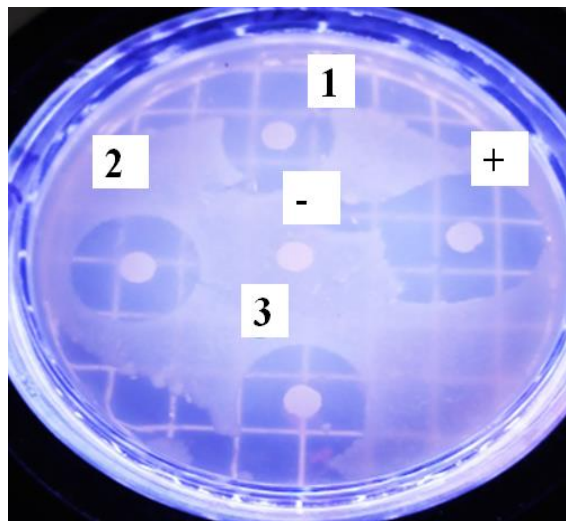


Рисунок 29 – Режим 1 (1000 мкг): 1 – первый диск, 2 – второй диск, 3 – третий диск, + - положительный контроль, – - отрицательный контроль

При этом определено, что освещение влияет на величину МИК. Было установлено, что при дополнительном воздействии светового излучения повышается эффективность воздействия экстракта на грамположительные бактерии, величина МИК уменьшается в 1,5 – 3,5 раза.

В связи с этим можно предположить, что экстракты, содержащие большее количество ненасыщенных жирных кислот, имеют меньшую минимальную ингибирующую концентрацию. Меньшую величину МИК имеют образцы 1 и 2, культивируемые при пониженной температуре $20 \pm 0,1$ °С. Для сохранения жизнеспособности клетки перестраивают метаболизм и синтезируют большее количество ненасыщенных жирных кислот. Жирные кислоты имеют более низкую температуру плавления, и позволяют сохранить жизнеспособность клеток (сохраняя жидким околоклеточное пространство и сохраняя жизнеспособность клеточной мембраны).

На рисунке 30 представлен анализ качественного и количественного состава неполярного экстракта из культуральной жидкости *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

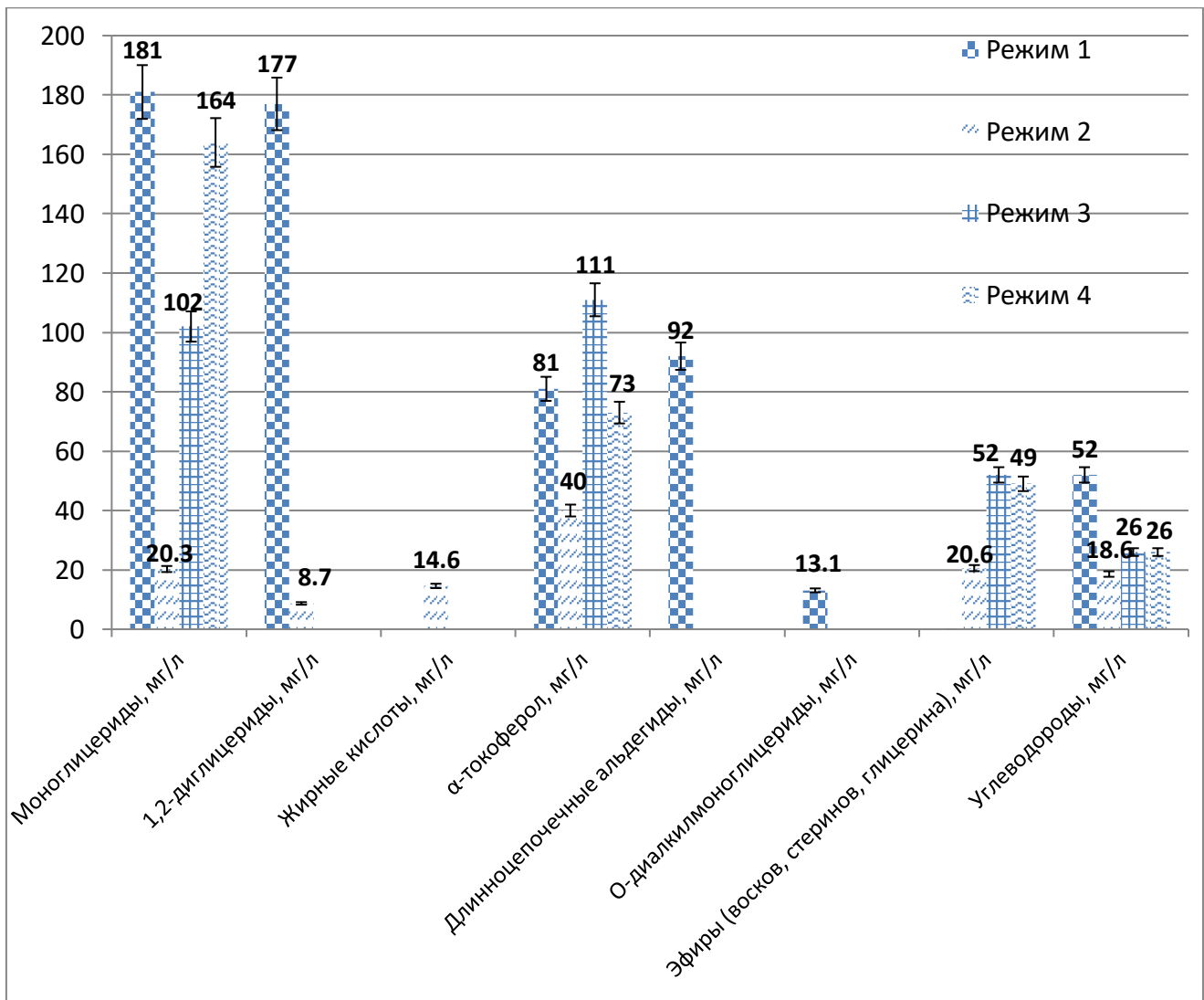


Рисунок 30 – Анализ качественного и количественного состава неполярного экстракта из культуральной жидкости *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

В таблице 26 представлены результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы из биомассы цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

Антибактериальные свойства проявляют неполярные экстракты из биомассы клеток, выращенной в условиях режимов культивирования 1 и 4. При этом, по-видимому, в клетках *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 содержатся липиды другого состава, из-за чего экстракты из биомассы обладают значительно

менее выраженными ингибирующими свойствами в отношении грамположительных бактерий (табл. 26).

Таблица 26 – Зоны ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации неполярных веществ липидной природы из биомассы цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

Количество, мкг	Зоны ингибирования неполярных веществ липидной природы из биомассы <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS B-404*, мм			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота			
1000 ± 33	7,67 ± 0,67 ¹	-	-	7,77 ± 0,03 ^a
900 ± 30	-	-	-	7,16 ± 0,15 ^b
МИК, мкг/мл	≈1000	-	-	830 ¹ (R ² = 1)
Свет (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))				
1000 ± 33	8,67 ± 2,45	-	-	8,80 ± 0,08 ^a
900 ± 30	-	-	-	8,40 ± 0,06 ^a
800 ± 27	-	-	-	7,87 ± 1,49 ^a
500 ± 17	-	-	-	7,70 ± 0,29 ^{ab}
200 ± 7	-	-	-	6,92 ± 0,02 ^b
100 ± 3	-	-	-	6,40 ± 0,25 ^b
МИК, мкг/мл	≈1000	-	-	72 ¹ (R ² = 0,94)

* – значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n = 3); значения с разными буквами достоверно отличаются при p < 0,05; ¹ – режим 1 (свет) и режим 1 (темнота) не имеют достоверных различий (p = 0,51).

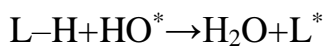
По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что неполярные вещества биомассы *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 обладают антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м²·с)), так и в темноте. Условия культивирования штамма значительно влияют на эффективность воздействия экстракта в отношении грамположительных бактерий, наиболее перспективен режим культивирования 4, позволяющий получить неполярные экстракты, имеющие величины МИК 72 – 830 мкг/мл.

В таблице 27 представлены результаты анализа жирнокислотного состава экстрактов из культуральной жидкости и биомассы *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

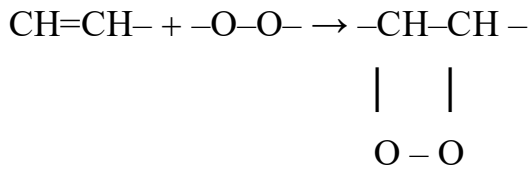
Таблица 27 – Результаты анализа жирнокислотного состава экстрактов из культуральной жидкости и биомассы *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

Жирные кислоты	Содержание в экстрактах жирных кислот, % (об.)							
	Режимы							
	Культуральная жидкость				Биомасса			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Миристиновая (C14:0)	2,2	1,2	1,6	4,5	1,2	10,0	6,4	10,5
Пальмитиновая (C16:0)	5,9	2,1	21,9	26,8	24,9	18,3	29,4	24,5
Маргариновая (C17:0)	-	2,9	-	-	-	2,4	2,2	-
Олеиновая (C18:1)	12,7	7,9	9,3	-	13,8	10,1	8,4	10,0
Стеариновая (C18:0)	11,5	12,7	24,7	24,9	9,5	10,1	14,3	12,9
Линолевая (C18:2)	12,9	19,6	-	1,6	6,7	10,1	-	14,0
Бегеновая (C22:0)	-	-	-	-	4,3	4,7	9,2	14,0
Эруковая (C22:1)	-	-	-	-	-	-	11,3	-
Докозагексаеновая (C22:6)	11,1	19,5	1,4	1,8	0,2	1,4	-	0,9
Нервоновая (C24:1)	7,4	-	-	-	-	-	-	-
Насыщенные	19,6	18,9	48,2	56,2	39,9	45,5	61,5	61,9
Ненасыщенные	44,1	47	10,7	3,4	20,7	21,6	19,7	24,9
Итого	63,7	65,9	58,9	59,6	60,6	67,1	81,2	86,8

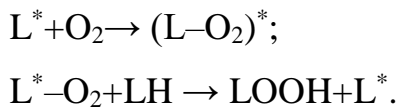
Влияние освещенности на интенсивность антибактериального действия липидов, по всей видимости, объясняется теорией перекисного окисления липидов Баха-Энглера и теорией цепных разветвленных реакций Н.Н. Семенова [213]: поток фотонов инициирует образование реактивных форм кислорода (фотоокислительный стресс), которые взаимодействуют с веществами липидной природы, происходит атака сопряженных двойных связей со стороны HO^* и HO_2^* (активные формы кислорода), что приводит к появлению липидных радикалов:



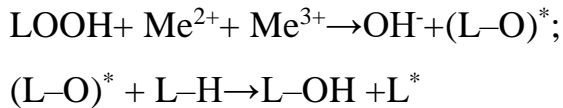
Ненасыщенные соединения будут окисляться по месту двойных связей с образованием циклических перекисей, обладающих высокой реакционной способностью:



Липидные радикалы реагируют с O_2 с образованием пероксильных радикалов, которые взаимодействуют с новыми молекулами, что приводит к появлению липидных пероксидов:



Гидроперекиси липидов при взаимодействии с переходными металлами, находящимися в культуральной жидкости или внутри клеток, также превращаются в активные радикалы, которые продолжают цепь окисления липидов:



Образующиеся реакционные активные радикалы вызывают окисление липидов, входящих в состав цитоплазматических мембран грамположительных бактерий, в то время как у микроводорослей и цианобактерий гораздо лучше развита защита от подобных соединений, образующихся в результате воздействия света. Так как данные организмы используют световое излучение в качестве источника энергии и выработали способ защиты от его негативного воздействия (антиоксидантная система) [215]. Такому окислению подвергаются в первую очередь вещества, содержащие в своем составе двойные связи, например, ненасыщенные жирные кислоты (табл. 27). Причем их превращения могут идти как с разрывом двойной связи и образованием перекисей, так и без – по свободно-радикальному механизму. Насыщенные соединения реагируют медленно и только по свободно-радикальному механизму.

Исследование антибактериальных свойств водорастворимых пептидных фракций осуществлялось с помощью метода лунок, согласно методике, описанной в [212]. Полученные водорастворимые пептидные фракции из культуральной жидкости и из биомассы клеток *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 были протестированы на наличие антибактериальных свойств в отношении грамположительных бактерий.

Таблица 28 – Результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств водорастворимых пептидных фракций, извлеченных из биомассы цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

Количество, мкг	Зоны ингибирования пептидных экстрактов из биомассы <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS B-404, мм*			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота			
800 ± 27	-	-	-	10,73 ± 0,82 ^a
600 ± 20	-	-	-	8,40 ± 1,49 ^b
500 ± 17	-	-	-	7,20 ± 0,38 ^c
400 ± 13	-	-	-	6,72 ± 0,52 ^c
300 ± 10	-	-	-	6,27 ± 0,05 ^c
200 ± 7	-	-	-	-
МИК, мкг/мл	-	-	-	323 ¹ (R ² = 0,90)
	Свет (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))			
800 ± 27	-	-	-	11,80 ± 0,06 ^a
600 ± 20	-	-	-	10,67 ± 0,66 ^b
500 ± 17	-	-	-	9,93 ± 0,03 ^b
400 ± 13	-	-	-	9,80 ± 0,56 ^{bc}
300 ± 10	-	-	-	7,40 ± 0,95 ^c
200 ± 7	-	-	-	-
МИК, мкг/мл	-	-	-	191 ² (R ² = 0,93)

* – значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n=3); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$; ^{1,2} – значения достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Установлено, что пептидные фракции из биомассы обладают антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м²·с)), так и в темноте в условиях

режима 4, что делает его наиболее перспективным для получения пептидных фракций, имеющих величины МИК 191 – 323 мкг/мл (табл. 28).

Предполагаемый механизм антибактериального действия пептидов, по всей видимости, объясняется тем, что в процессе гидролиза белков микроводорослей и цианобактерий пепсином образуются короткоцепочечные пептиды. Несмотря на структурное разнообразие, эти соединения обладают общими физико-химическими свойствами, многие из них являются катионными или амфифильными. Эти свойства позволяют пептидам взаимодействовать с цитоплазматическими мембранами бактерий, состоящими из фосфолипидов (рис. 31).

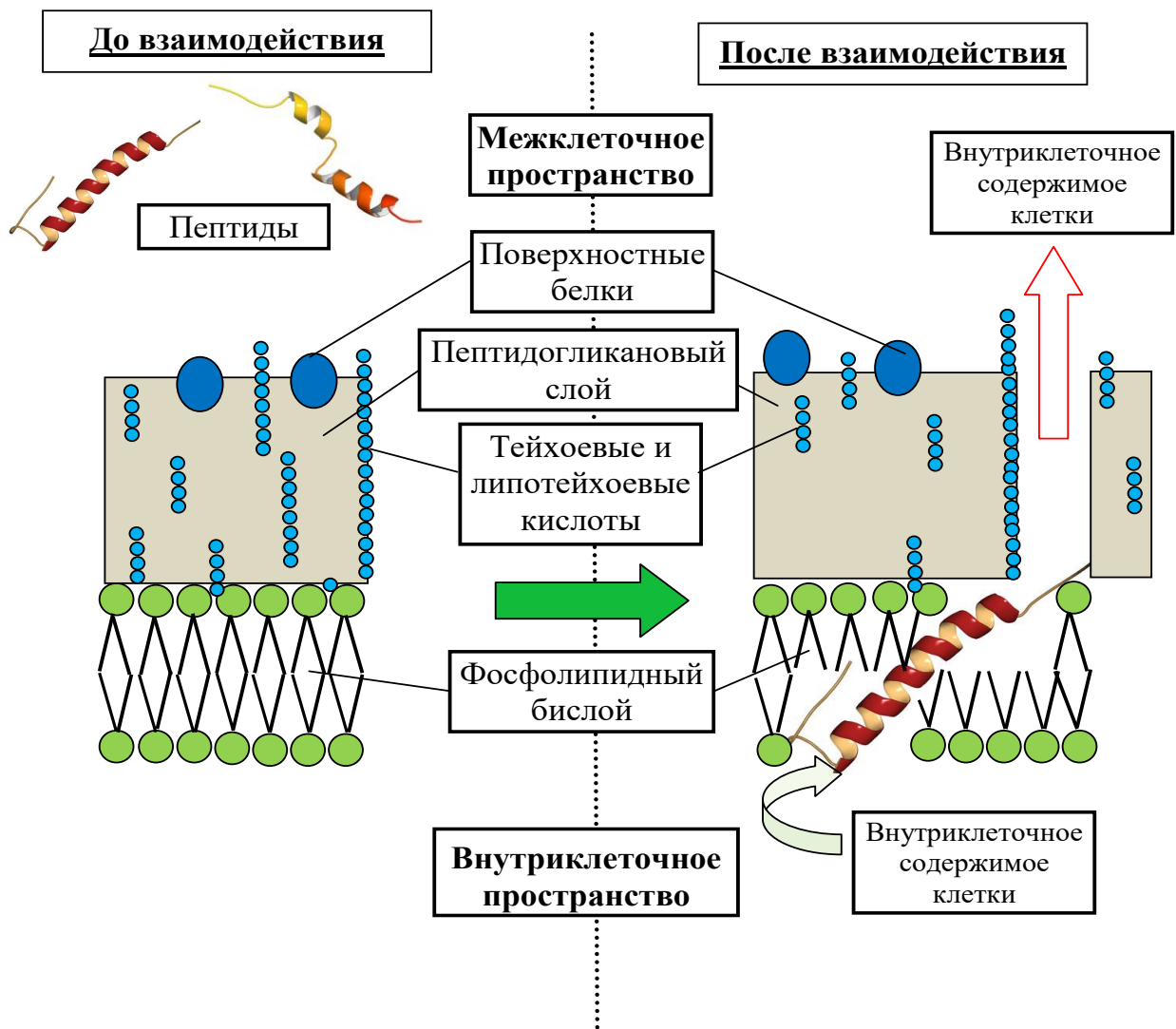


Рисунок 31 – Предполагаемый механизм антибактериального действия пептидной фракции микроводорослей

Мембраны бактериальных клеток богаты такими фосфолипидами, как фосфатидилглицерин и кардиолипин. Пептиды проникают в липидный матрикс клеточных мембран, и образуют там поры, через которые внутриклеточное содержимое вытекает в межклеточное пространство. Хотя некоторые пептиды имеют внутриклеточные мишени. Но даже в последнем случае для проникновения пептида в клетку важно пептидно-мембранное взаимодействие. Пептиды, содержащие большое количество положительно заряженных аминокислот (аргинин, гистидин, лизин), могут интегрироваться в отрицательно заряженную цитоплазматическую мембрану бактериальной клетки (мембраны бактериальных клеток имеют больший отрицательный заряд по сравнению с эукариотическими клетками).

3.5 Исследование потенциала белкового экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Целью эксперимента являлось исследование влияния водного белкового экстракта *Chlorella sorokiniana* на процесс культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В таблице 29 приведены условия проведения эксперимента.

Таблица 29 – Условия проведения эксперимента

№ образца	Питательная среда для культивирования <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Количество внесенного водного экстракта <i>Chlorella sorokiniana</i> , мл/ мл питательной среды
1 (контроль)	480 мл	-
2		0,0025
3		0,005
4		0,01

К жидкой питательной среде объемом 400 мл [216] добавляли суспензию посевного материала – дрожжи вида *Saccharomyces cerevisiae* – в количестве 10 % от объема питательной среды, а также водорастворимый белковый экстракт. Затем колбы помещали в термостат с мешалкой при температуре 30 – 31 °С, суспензию барботировали газовой смесью с расходом 1 л/мин. Отбор проб

производился каждый час для измерения рН, концентрации клеток и концентрации редуцирующих сахаров.

Анализ результатов эксперимента показал, что, культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на питательной среде с добавлением водорастворимого белкового экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в количестве 0,005 и 0,01 мл / мл питательной среды (образцы №3 и №4) – существенно отличается от контрольного образца (без добавления экстракта) и образца №2 (экстракт в количестве 0,0025 мл / мл питательной среды) (рис. 32 – 34).

Увеличение основных количественных характеристик процесса культивирования (образцы №3 и №4), по-видимому, связаны с тем, что в составе водорастворимого экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* содержатся вещества, стимулирующие рост и размножение клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, белки, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, водорастворимые витамины, стероидные соединения растительного происхождения, которые стимулируют протекание различных метаболических процессов клеток. Данное предположение подтверждается более эффективным преобразованием сахарозы в редуцирующие сахара (глюкоза и фруктоза) образцами №3 и №4 (рис. 33).

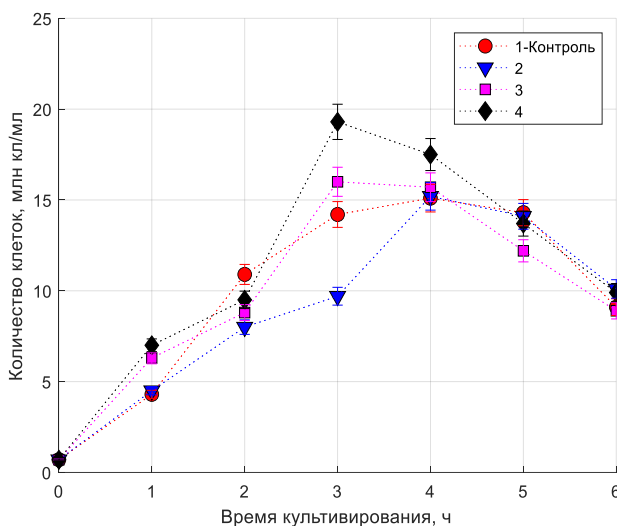


Рисунок 32 – Изменение концентрации клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

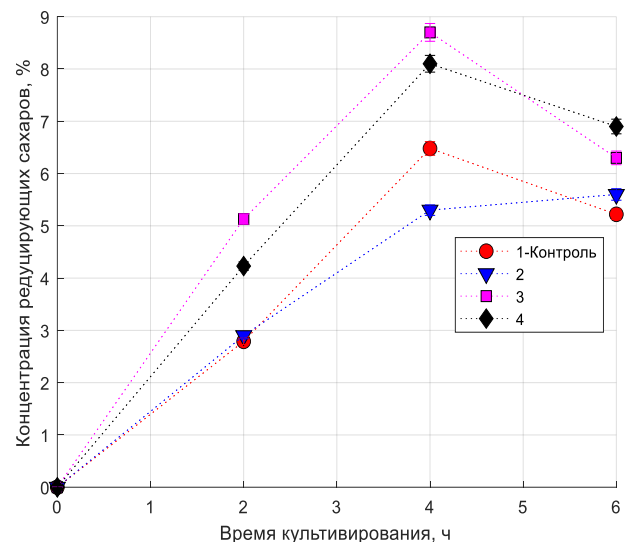


Рисунок 33 – Изменение концентрации редуцирующих сахаров

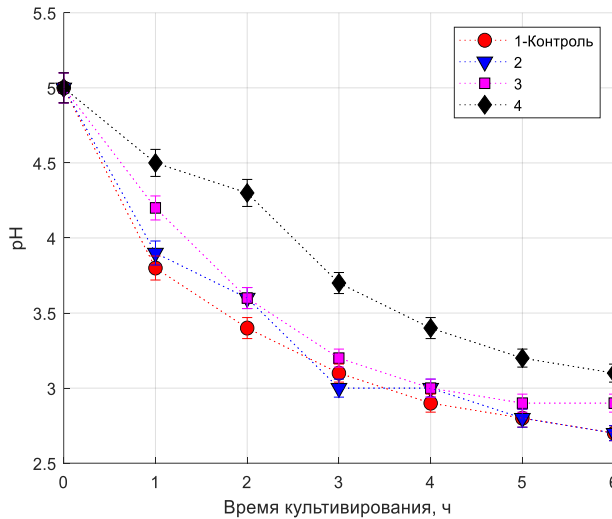


Рисунок 34 – Изменение кислотности питательной среды

У образцов №3 и №4 на 5,2 % и 27 % возрастает емкость популяции, величина удельной скорости роста на экспоненциальной фазе в 1,3 – 1,4 раза и уменьшается время генерации клеток на 23 – 27 % соответственно (табл. 30), по сравнению с контролем и образцом №2, который по своим основным количественным характеристикам близок к контролю (образец №1).

Таблица 30 – Расчет удельной скорости роста (экспоненциальная фаза), максимальной удельной скорости роста, времени генерации (экспоненциальная фаза) *

№	Экстракт, мл / мл ПС	μ , ч ⁻¹	g, ч	τ , ч	N, млн кл/мл
1 (К)	-	$0,80 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,03$	$4 \pm 0,20$	$15,20 \pm 0,30$
2	0,0025	$0,80 \pm 0,02^1$	$0,90 \pm 0,03^1$	$4 \pm 0,10^1$	$15,20 \pm 0,30^1$
3	0,005	$1,05 \pm 0,02^2$	$0,67 \pm 0,02^2$	$3 \pm 0,20^2$	$16,00 \pm 0,20^2$
4	0,01	$1,10 \pm 0,03^2$	$0,63 \pm 0,02^2$	$3 \pm 0,10^2$	$19,30 \pm 0,20^2$

К – контроль, ПС – питательная среда, μ – удельная скорость роста клеток, g – время генерации, τ – время экспоненциальной фазы N – емкость популяции; * – значения представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов; ¹ - значения достоверно не различаются с контролем при $p < 0,05$; ² - значения достоверно отличаются с контролем при $p < 0,05$.

Необходимо отметить, что длина экспоненциальной фазы образцов №3 и №4 уменьшилась до 3 часов по сравнению с контрольным образцом №1 и образцом №2 (рис. 32). Это объясняется тем, что стимулирующие вещества экстракта *Chlorella sorokiniana* ускоряют метаболические процессы в клетках и приводят к более раннему накоплению метаболитов-ингибиторов, более высокие концентрации которых, подавляют рост клеток раньше, чем у образцов №1 и №2.

Глава 4. Аппаратурно-технологическое оформление производства метаболитов из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

4.1 Расчет материального баланса производства антибактериальных пептидов из микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Ожидаемый выпуск антибактериальных пептидов составляет 1 т/год в виде раствора с влажностью 65 %. На основании того, что целевые компоненты накапливаются в экспоненциальной фазе роста клеток, целесообразно проводить культивирование в периодическом режиме в течение 7 суток. Нормируемые потери производства при таком режиме представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Нормируемые потери производства антибактериальных пептидов

Стадия	Потери, %
Приготовление чистой культуры	0,03
Приготовление маточной культуры	0,03
Приготовление посевной культуры	0,05
Приготовление питательной среды	0,05
Стерилизация питательной среды	0,001
Тонкая очистка воздуха	0,5
Культивирование	0,5
Центрифугирование	1,2
Экстракция в ультразвуковом поле	1,2
Центрифугирование	1,2
Ультрафильтрация	1,5
Протеолиз	0,5
Ионообменная хроматография	1,0
Фасовка	0,5

Задаем режимом работы предприятия: число рабочих суток в году – 247; продолжительность цикла – 7 суток.

Количество циклов производства определим по формуле:

$$N = \frac{T_{\text{эф.}}}{T_{\text{длит.ст.}}}, \quad (16)$$

где $T_{эф.}$ – число рабочих суток в году периодического режима работы, дн;
 $T_{длит.ст.}$ – длительность самой продолжительной стадии производства, дн.

Тогда количество циклов производства составляет:

$$N = \frac{249}{7} = 35 \text{ циклов.}$$

Производительность цикла производства:

$$P_{ц} = \frac{P_{г}}{N}, \quad (17)$$

где $P_{г}$ – годовая производительность, кг/год.

$$P_{ц} = \frac{1000}{35} = 28,57 \text{ кг.}$$

Стадия фасовки

На стадию фасовки с учетом потерь (0,5 %) должно прийти антимикробных пептидов:

$$G_1 = P_{ц} \cdot \left(1 + \frac{0,5}{100}\right) = 28,57 \cdot 1,005 = 28,71 \text{ кг.}$$

Стадия ионообменной хроматографии

Со стадии хроматографии с учетом потерь (1 %) должно выйти антимикробных пептидов с влажностью 65 %:

$$G_5 = G_3 \cdot \left(1 + \frac{1}{100}\right) = 28,71 \cdot 1,01 = 29 \text{ кг.}$$

Сухих веществ содержится:

$$G_5^{CB} = G_5 \cdot \frac{35}{100} = 29 \cdot 0,35 = 10,15 \text{ кг.}$$

Пептидные фракции, отделенные в процессе хроматографии, составляют 75 % от сухих веществ общей фракции, тогда в элюате осталось 25 % антимикробных пептидов. Тогда количество отделенных пептидов:

$$G_{пеп} = G_5^{CB} \cdot \frac{75}{25} = 10,15 \cdot 3 = 30,45 \text{ кг.}$$

Общее количество пептидов:

$$G_6 = G_5^{CB} + G_{пеп} = 10,15 + 30,45 = 40,6 \text{ кг.}$$

Также на данной стадии отделяются низкомолекулярные вещества: витамины (0,25 %), свободные аминокислоты (1 %) и моносахариды (11 %). По результатам экспериментальных данных в биомассе содержится 20,6 % белка от сухих веществ. Тогда сухих веществ в биомассе:

$$G_{\text{БМ}}^{\text{CB}} = G_6 \cdot \frac{100}{20,6} = 40,6 \cdot 4,85 = 196,91 \text{ кг.}$$

Витаминов удалено:

$$G_{\text{ВИТ}} = G_{\text{БМ}}^{\text{CB}} \cdot \frac{0,25}{100} = 196,91 \cdot 0,0025 = 0,49 \text{ кг.}$$

Свободных аминокислот удалено:

$$G_{\text{АК}} = G_{\text{БМ}}^{\text{CB}} \cdot \frac{1}{100} = 196,91 \cdot 0,01 = 1,97 \text{ кг.}$$

Моносахаридов удалено:

$$G_{\text{МОИ}} = G_{\text{БМ}}^{\text{CB}} \cdot \frac{11}{100} = 196,91 \cdot 0,11 = 21,66 \text{ кг.}$$

После ультрафильтрации пептиды содержат 35 % сухих веществ, тогда количество влажных пептидов составляет:

$$G_7 = G_{\text{БМ}}^{\text{CB}} \cdot \frac{100}{65} = 196,91 \cdot 1,54 = 303,24 \text{ кг.}$$

Стадия протеолиза

На стадию протеолиза с учетом потерь (0,5 %) должно прийти ретентанта:

$$G_8 = G_7 \cdot \left(1 + \frac{0,5}{100}\right) = 303,24 \cdot 1,005 = 304,76 \text{ кг.}$$

Стадия ультрафильтрации

Со стадии ультрафильтрации с учетом потерь (1,5 %) должно выйти ретентата:

$$G_9 = G_8 \cdot \left(1 + \frac{1,5}{100}\right) = 304,76 \cdot 1,015 = 309,33 \text{ кг.}$$

После ультрафильтрации ретентат содержит 35 % сухих веществ, тогда количество сухих веществ составляет:

$$G_9^{\text{CB}} = G_9 \cdot \frac{35}{100} = 309,33 \cdot 0,35 = 108,27 \text{ кг.}$$

Количество удаленной со стадии влаги составляет:

$$G_9^\phi = G_9^{\text{CB}} \cdot \frac{72}{28} = 108,27 \cdot 2,6 = 281,49 \text{ кг.}$$

На стадию ультрафильтрации должно прийти супернатанта:

$$G_{10} = G_9^{\text{CB}} + G_9^\phi = 108,27 + 281,49 = 389,76 \text{ кг.}$$

Стадия центрифугирования

Количество белков микроводорослей *Chlorella sorokiniana* составляет $\approx 50\%$ от количества сухих веществ клеток (учитывалось содержание общего азота (по Къельдалю [217]), %).

Количество сухих веществ пептидов составляет 18% , биошрота – 30% , тогда:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{10}^{\text{CB}} : G_6^{\text{CB}} = 8,4 : 1,6,$$

$$389,76 \cdot 0,18 : G_6 \cdot 0,3 = 0,5 : 0,5;$$

$$G_6 = 233,86 \text{ кг.}$$

На стадию центрифугирования с учетом потерь ($1,2\%$) должно прийти:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{11} = (G_{10} + G_6) \cdot \left(1 + \frac{1,2}{100}\right) = (389,76 + 233,86) \cdot 1,012 = 631,1 \text{ кг.}$$

Стадия экстрагирования в ультразвуковом поле

На данной стадии добавляется фосфатный буфер в качестве экстрагента в соотношении с концентратом $5:1$, тогда с учетом потерь ($1,2\%$):

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{11} = \frac{x + 5x}{1 + \frac{1,2}{100}},$$

$$631,1 = \frac{x + 5x}{1,01}.$$

$$x = G_{12} = 106,24 \text{ кг} - \text{вышло со стадии центрифугирования.}$$

Количество фосфатного буфера: $5 \cdot 106,24 = 531,18 \text{ кг.}$

Стадия сушки

На стадию сушки приходит биомасса с влажностью 98 %. Масса биомассы, приходящей на стадию сушки:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{13} = 106,24 \cdot \frac{1 - \frac{15}{100}}{1 - \frac{98}{100}} = 4515,2 \text{ кг.}$$

На стадию сушки с учетом потерь (1,2 %) должно прийти биомассы:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{14} = G_{13} \cdot \left(1 + \frac{1,2}{100}\right) = 4515,2 \cdot 1,012 = 4569,38 \text{ кг.}$$

Стадия центрифугирования

Со стадии центрифугирования с учетом потерь (1,2 %) должно выйти биомассы:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{15} = G_{14} \cdot \left(1 + \frac{1,2}{100}\right) = 4569,38 \cdot 1,012 = 4624,21 \text{ кг.}$$

Количество биомассы в культуральной жидкости составляет до 10 %, следовательно, культуральной жидкости отделено:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{\text{КЖ}} = G_{15} \cdot \frac{90}{100} = 4624,21 \cdot 0,9 = 41617,9 \text{ кг.}$$

На стадию центрифугирования должно прийти культуральной жидкости с биомассой:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{16} = G_{15} + G_{\text{КЖ}} = 4624,21 + 41617,9 = 46242,14 \text{ кг.}$$

Стадия культивирования

Со стадии культивирования с учетом потерь (0,5 %) должно выйти:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{17} = G_{16} \cdot \left(1 + \frac{0,5}{100}\right) = 46242,14 \cdot 1,005 = 46935,78 \text{ кг.}$$

На данную стадию приходят питательная среда и посевной материал в количестве 10 % от питательной среды, пусть количество питательной среды – x , тогда:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{18} = x + 0,1x = 46935,78.$$

$G_{19} = x = 42668,89$ кг – количество питательной среды, приходящей на стадию.

Количество посевного материала:

$$G_{\text{ПМ}} = G_{19} \cdot 0,1 = 42668,89 \cdot 0,1 = 4266,89 \text{ кг.}$$

Стадия приготовления посевного материала

Со стадии приготовления посевной культуры с учетом потерь (0,05 %) должно выйти:

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$G_{20} = G_{\text{ПМ}} \cdot \left(1 + \frac{0,05}{100}\right) = 4266,89 \cdot 1,0015 = 4273,29 \text{ кг.}$$

На данную стадию приходят питательная среда и посевной материал в количестве 10 % от питательной среды, пусть количество питательной среды – x , тогда:

$$G_{21} = x + 0,1x = 4273,29.$$

$G_{22} = x = 3884,8$ кг – количество питательной среды, приходящей на стадию.

Количество посевного материала:

$$G_{\text{ПМ}} = G_{22} \cdot 0,1 = 3884,8 \cdot 0,1 = 388,48 \text{ кг.}$$

3. Стадия стерилизации питательной среды

На стадию стерилизации питательной среды поступает с учетом потерь (0,001 %):

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

$$\begin{aligned} G_{23} &= (G_{19} + G_{22}) \cdot \left(1 + \frac{0,001}{100}\right) = (4273,29 + 388,48) \cdot \left(1 + \frac{0,001}{100}\right) = \\ &= 4661,82 \text{ кг.} \end{aligned}$$

Стадия приготовления питательной среды

Для микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

На стадию приготовления питательной среды с учетом потерь (0,05 %) должно прийти:

$$G_{24} = \frac{G_{23}}{\rho_{\text{ПС}}} = \frac{4661,82}{1,1463} \cdot \left(1 + \frac{0,05}{100}\right) = 4068,87 \text{ л} = 4 \text{ м}^3.$$

Используя таблицу 32, рассчитаем необходимые массы солей макроэлементов для составления питательной среды:

$$m_{\text{KNO}_3} = 4068,87 \cdot 3,2 \cdot 10^{-3} = 13,02 \text{ кг};$$

$$m_{\text{MgSO}_4} = 4068,87 \cdot 0,2 \cdot 10^{-3} = 0,81 \text{ кг};$$

$$m_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 4068,87 \cdot 0,013 \cdot 10^{-3} = 0,05 \text{ кг};$$

$$m_{\text{ЭДТА}} = 4068,87 \cdot 0,0001 \cdot 10^{-3} = 0,0004 \text{ кг};$$

$$m_{\text{макро}} = 13,02 + 0,81 + 0,05 + 0,0004 = 13,88 \text{ кг}.$$

Таблица 32 – Состав питательной среды Тамия

Соль	Содержание, г/л	Растворимость, г/100 г
Нитрат калия	3,2	31,6
Дегидрофосфат калия	0,125	22,6
Сульфат магния	0,2	35,1
Гептагидрат сульфата железа	0,013	26,6
ЭДТА (этилендиаминтетраацетат)	0,0001	73,9
Тетрагидрат хлорида марганца	0,8	73,9
Гептагидрат сульфата цинка	0,1	54,1
Сульфат меди	0,8	20,5
Оксид молибдена	0,018	0,1066
Борная кислота	0,28	4,72
Метаванад аммония	0,023	0,52

Используя таблицу 32, рассчитаем необходимые массы солей микроэлементов для составления питательной среды:

$$m_{\text{MnCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}} = 4068,87 \cdot 0,8 \cdot 10^{-3} = 3,26 \text{ кг};$$

$$m_{\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 4068,87 \cdot 0,1 \cdot 10^{-3} = 0,41 \text{ кг};$$

$$m_{\text{CuSO}_4} = 4068,87 \cdot 0,8 \cdot 10^{-3} = 3,26 \text{ кг};$$

$$m_{\text{MoO}_3} = 4068,87 \cdot 0,018 \cdot 10^{-3} = 0,07 \text{ кг};$$

$$m_{H_3BO_3} = 4068,87 \cdot 0,28 \cdot 10^{-3} = 1,14 \text{ кг};$$

$$m_{NH_4VO_3} = 4068,87 \cdot 0,023 \cdot 10^{-3} = 0,09 \text{ кг};$$

$$m_{\text{микро}} = 3,26 + 0,41 + 3,26 + 0,07 + 1,14 + 0,09 = 8,23 \text{ кг}.$$

Используя таблицу 32, рассчитаем необходимые массы фосфатов для составления питательной среды:

$$m_{KH_2PO_4} = 4068,87 \cdot 0,125 \cdot 10^{-3} = 0,5 \text{ кг}.$$

Рассчитаем расход воды для растворения сухих солей соли макроэлементов:

$$m_{H_2O(KNO_3)} = 13,02 \cdot \frac{100}{31,6} = 41,2 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(MgSO_4)} = 0,81 \cdot \frac{100}{35,1} = 2,31 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(FeSO_4 \cdot 7H_2O)} = 0,05 \cdot \frac{100}{26,6} = 0,19 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(\text{ЭДТА})} = 0,0004 \cdot \frac{100}{10,5} = 0,004 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(\text{макро})} = 41,2 + 2,31 + 0,19 + 0,004 = 43,7 \text{ кг}.$$

Рассчитаем массу раствора солей макроэлементов для составления питательной среды:

$$m_{\text{р-р.макро}} = 13,88 + 43,7 = 57,58 \text{ кг}.$$

Рассчитаем расход воды для растворения сухих солей соли микроэлементов:

$$m_{H_2O(MnCl_4 \cdot 4H_2O)} = 3,26 \cdot \frac{100}{73,9} = 4,41 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)} = 0,41 \cdot \frac{100}{54,1} = 0,76 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(CuSO_4)} = 3,26 \cdot \frac{100}{20,5} = 15,9 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(MoO_3)} = 0,07 \cdot \frac{100}{0,1066} = 65,67 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(H_3BO_3)} = 1,14 \cdot \frac{100}{4,72} = 24,15 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(NH_4VO_3)} = 0,09 \cdot \frac{100}{0,52} = 17,31 \text{ кг};$$

$$m_{H_2O(\text{микро})} = 4,41 + 0,76 + 15,9 + 65,67 + 24,15 + 17,31 = 128,2 \text{ кг.}$$

Рассчитаем массу раствора солей микроэлементов для составления питательной среды:

$$m_{\text{р-р.микро}} = 8,23 + 128,2 = 136,43 \text{ кг.}$$

Рассчитаем расход воды для растворения сухих солей фосфатов:

$$m_{H_2O(KH_2PO_4)} = 0,5 \cdot \frac{100}{22,6} = 2,21 \text{ кг.}$$

Рассчитаем массу водного раствора солей фосфатов для составления питательной среды:

$$m_{\text{р-р.фосф}} = 0,5 + 2,21 = 2,71 \text{ кг.}$$

Определим расход технической воды, для создания объёма культивирования:

$$m_{H_2O} = 4068,87 - 57,58 - 136,43 - 2,71 = 3872,15 \text{ кг.}$$

4.2 Расчет и подбор технологического оборудования

В случае выбора емкостных аппаратов учитывают коэффициент их заполнения, то есть отношение объема реакционной массы в аппарате (рабочего объема аппарата) к объему аппарата. Таким образом, объем аппарата рассчитывается по формуле 18:

$$V = \frac{V_p}{\varphi}, \quad (18)$$

где V_p – объем реакционной массы в аппарате, м³, φ – коэффициент заполнения аппарата, зависящий от особенностей процесса: при кипении, вспенивании реакционной массы коэффициент заполнения составляет 0,3-0,5; при перемешивании – 0,5-0,8; для стадии хранения жидкостей – 0,9.

Тонкая очистка воздуха

Для нормального роста и жизнедеятельности микроводорослей *Chlorella sorokiniana* необходима постоянная подача очищенного воздуха (для стадий приготовления посевного материала и культивирования) со следующим объемным расходом:

$$G_{\text{возд}} = 35 \frac{\text{м}^3}{\text{м}^3 \cdot \text{ч}}$$

Приведем данные расчетов материального баланса, объемы посевного материала и культивируемой суспензии:

$$V_{\text{пм}}^{11} = \frac{6966,63}{998} = 6,98 \text{ м}^3;$$

$$V_{\text{к}}^{10} = 69,8 \text{ м}^3.$$

Рассчитаем номинальный объемный расход воздуха:

$$V_{\text{возд}}^{\text{НОМ}} = 35 \cdot (69,8 + 6,98) = 2687,3 \text{ м}^3/\text{ч}.$$

Согласно вышеизложенным данным, необходима установка тонкой очистки воздуха с расходом не менее 2687,3 м³/ч.

Условное обозначение: АКФ-2/80. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 33.

Таблица 33 – Технические характеристики установки очистки воздуха АКФ-2/80

Показатель	Значение
Номинальный расход воздуха, м ³	2400
Скорость воздуха, м/с	2,4
Длина, мм	3100
Высота, мм	1650
Ширина, мм	615
Масса, кг	185

Приготовление и стерилизация питательной среды

Согласно эскизной схеме используется стерилизованная питательная среда Тамия, причем смешение солей, входящих в состав питательной среды, и стерилизация первичных растворов солей макроэлементов, микроэлементов и фосфатов происходит отдельно, после чего данные растворы смешиваются в конечной емкости.

Согласно технологии приготовления питательной среды, растворы солей фосфатов и макроэлементов проходят стерилизацию горячим способом, в то время как раствор микроэлементов – методом фильтрации.

Определим емкость для приготовления и стерилизации горячим способом раствора солей фосфатов, масса которого, основываясь на расчетах материального баланса, составляет:

$$m_{\text{р-р.фосф}} = 0,5 \text{ кг.}$$

Учитывая среднюю плотность раствора фосфатов $\rho = 1\,136 \text{ кг/м}^3$, рассчитаем объем готового раствора фосфатов:

$$V_{\text{р.фосф}} = \frac{0,5}{1\,136} = 0,0004 \text{ м}^3.$$

Рассчитаем номинальный объем резервуара с перемешивающим устройством для приготовления раствора фосфатов по формуле 3:

$$V_{\text{фосф}}^{\text{НОМ}} = \frac{0,0004}{0,7} = 0,0006 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать аппарат для приготовления водного раствора фосфатов и его стерилизации, проводимой горячим способом, номинальным объемом не менее $0,0006 \text{ м}^3$.

Согласно вышеизложенным данным, необходимый аппарат с механическим лопастным перемешивающим устройством, выполненный по ГОСТ 20680-2002 [218], который обладает номинальным объемом $0,01 \text{ м}^3$, эллиптическим днищем и эллиптической отъемной крышкой, теплообменным устройством в виде гладкой рубашки, рабочим давлением в корпусе $0,6 \text{ МПа}$, корпусом коррозионно-стойкого исполнения. Условное обозначение: 01-0,01-0,6-К ГОСТ 20680-2002. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 34.

Таблица 34 – Технические характеристики Аппарата 01-0,01-0,6-К

Показатель	Значение
Номинальный объем, м^3	0,01
Теплообменное устройство	гладкая рубашка
Перемешивающее устройство	механическое лопастное
Число оборотов, об/мин	80
Высота, мм	220
Диаметр, мм	250
Высота опор, мм	245
Масса, кг	40

Определим емкость для приготовления и стерилизации горячим способом раствора солей макроэлементов, масса которого, основываясь на расчетах материального баланса, составляет:

$$m_{p-p.макро} = 57,58 \text{ кг.}$$

Учитывая среднюю плотность раствора макроэлементов $\rho = 1\,136 \text{ кг/м}^3$, рассчитаем объем готового раствора макроэлементов:

$$V_{p.макро} = \frac{57,58}{1\,136} = 0,05 \text{ м}^3.$$

Рассчитаем номинальный объем резервуара с перемешивающим устройством для приготовления раствора макроэлементов по формуле 4:

$$V_{макро}^{ном} = \frac{0,05}{0,7} = 0,07 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать аппарат для приготовления водного раствора макроэлементов и его стерилизации, проводимой горячим способом, номинальным объемом не менее $0,07 \text{ м}^3$.

Согласно вышеизложенным данным, необходимый аппарат с механическим лопастным перемешивающим устройством, выполненный по ГОСТ 20680-2002, обладает номинальным объемом $0,16 \text{ м}^3$, эллиптическим днищем и эллиптической отъемной крышкой, теплообменным устройством в виде гладкой рубашки, рабочим давлением в корпусе $0,6 \text{ МПа}$, корпусом коррозионно-стойкого исполнения. Условное обозначение: 01-0,16-0,6-К ГОСТ 20680-2002. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 35.

Таблица 35 – Технические характеристики Аппарата 01-0,16-0,6-К

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	0,16
Теплообменное устройство	гладкая рубашка
Перемешивающее устройство	механическое лопастное
Число оборотов, об/мин	80
Высота, мм	625
Диаметр, мм	600
Высота опор, мм	245
Масса, кг	140

Определим емкость для приготовления раствора солей микроэлементов, масса которого, основываясь на расчетах материального баланса, составляет:

$$m_{\text{р-р.микро}} = 136,43 \text{ кг.}$$

Учитывая среднюю плотность раствора микроэлементов $\rho = 1\,136 \text{ кг/м}^3$, рассчитаем объем готового раствора микроэлементов:

$$V_{\text{р.микро}} = \frac{136,43}{1\,136} = 0,12 \text{ м}^3.$$

Рассчитаем номинальный объем резервуара с перемешивающим устройством для приготовления раствора микроэлементов по формуле 4:

$$V_{\text{микро}}^{\text{ном}} = \frac{0,12}{0,7} = 0,17 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать аппарат для приготовления водного раствора микроэлементов номинальным объемом не менее $0,17 \text{ м}^3$.

Согласно вышеизложенным данным, необходимый аппарат с механическим лопастным перемешивающим устройством, выполненный по ГОСТ 20680-2002, обладает номинальным объемом $0,4 \text{ м}^3$, эллиптическим днищем и эллиптической отъемной крышкой, без теплообменного устройства, рабочим давлением в корпусе $0,6 \text{ МПа}$, корпусом коррозионно-стойкого исполнения.

Условное обозначение: 00-0,4-0,6-К ГОСТ 20680-2002. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Технические характеристики Аппарата 00-0,4-0,6-К

Показатель	Значение
Номинальный объем, м^3	0,4
Теплообменное устройство	нет
Перемешивающее устройство	механическое лопастное
Число оборотов, об/мин	80
Высота, мм	875
Диаметр, мм	800
Высота опор, мм	245
Масса, кг	180

Определим мембранный фильтр для стерилизации раствора микроэлементов, масса которого, основываясь на расчетах материального баланса, составляет:

$$m_{p-р.микро} = 136,43 \text{ кг},$$

с содержанием сухих веществ:

$$m_{микро} = 8,01 \text{ кг}.$$

Удельная часовая производительность фильтра рассчитывается формулой:

$$Q = \frac{h \cdot \rho}{\tau}, \quad (5)$$

где $h = 0,015$ м – слой примесей, остающихся на мембране, $\rho = 1300$ кг/м³ – плотность примесей, $\tau = 1$ ч – продолжительность фильтрации.

$$Q = \frac{0,015 \cdot 1400}{1} = 21 \text{ м}^2/\text{ч}.$$

Мембранный фильтр выпускается с количеством мембранных перегородок 7 и 16 штук. Диаметр пор в данных перегородках составляет 0,01-0,1 мкм. Толщина мембранной перегородки 10 – 20 мм. Площадь 1 мембранной перегородки определяется формулой:

$$S = \frac{Q}{N}, \quad (6)$$

$$S = \frac{21}{16} = 1,313 \text{ м}^2.$$

Таблица 37 – Технические характеристики мембранного фильтра МВФ-16-

21

Показатель	Значение
Количество перегородок, шт.	16
Количество трубок для отведения пермеата, шт.	16
Площадь фильтрования, м ²	1,35
Высота, мм	1525
Ширина, мм	1620
Длина, мм	1825
Масса, кг	130

Исходя из данных величин, принимаем вертикальный мембранный фильтр типа МФФ-16-21 с 16 мембранными перегородками. Технические характеристики вертикального мембранного фильтра представлены в таблице 37.

Определим конечную емкость для приготовления питательной среды Тамия, объем которой должен составлять не менее суммы объемов аппаратов для приготовления составных частей питательной среды – растворов фосфатов, макроэлементов и микроэлементов:

$$V_{\text{ПС}}^{\text{НОМ}} = 0,0004 + 0,05 + 0,12 = 0,17 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать аппарат для приготовления водного раствора номинальным объемом не менее $0,17 \text{ м}^3$.

Таблица 38 – Технические характеристики Аппарата 00-0,25-0,6-К

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	0,25
Теплообменное устройство	нет
Перемешивающее устройство	механическое лопастное
Число оборотов, об/мин	80
Высота, мм	700
Диаметр, мм	700
Высота опор, мм	245
Масса, кг	320

Согласно вышеизложенным данным, необходимый аппарат с механическим лопастным перемешивающим устройством, выполненный по ГОСТ 20680-2002, обладает номинальным объемом $0,25 \text{ м}^3$, эллиптическим днищем и эллиптической отъемной крышкой, без теплообменного устройства, рабочим давлением в корпусе $0,6 \text{ МПа}$, корпусом коррозионно-стойкого исполнения.

Условное обозначение: 00-0,63-0,6-К ГОСТ 20680-2002. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 38.

Стадия приготовления посевной культуры

Определим фотобиореактор для приготовления посевной культуры, рабочий объем которого, основываясь на расчетах материального баланса, составляет:

$$V_{\text{ПМ}} = \frac{6966,63}{998} = 6,98 \text{ м}^3.$$

Рассчитаем номинальный объем фотобиореактора для приготовления посевного материала по формуле 3:

$$V_{\text{ФТБ.ПМ}}^{\text{НОМ}} = \frac{6,98}{0,9} = 7,76 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать фотобиореактор для получения посевного материала номинальным объемом не менее $7,76 \text{ м}^3$.

В качестве аппарата для культивирования выберем 4 трубчатых фотобиореактора с диаметром трубы $0,1 \text{ м}$, межтрубное расстояние – $0,07 \text{ м}$, количество труб – 12, высота фотобиореактора – $1,97 \text{ м}$, длина трубы – 25 м .

Объем одного фотобиореактора:

$$V = 12 \cdot ((3,14 \cdot 0,05^2 \cdot 25) + 11 \cdot (2 \cdot 3,14^2 \cdot 0,05^2 \cdot 0,085)) = 2,4 \text{ м}^3.$$

Стадия культивирования

Определим основной фотобиореактор, объем культивируемой суспензии в котором, основываясь на расчетах материального баланса, составляет:

$$V_{\text{БМ}} = \frac{76632,92}{998} = 76,79 \text{ м}^3,$$

тогда номинальный объем необходимого фотобиореактора по формуле 3:

$$V_{\text{ФТБ БМ}}^{\text{НОМ}} = \frac{76,79}{0,9} = 85,3 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать фотобиореактор номинальным объемом не менее $85,3 \text{ м}^3$.

В качестве аппарата для культивирования выберем 3 трубчатых фотобиореактора с диаметром трубы $0,25 \text{ м}$, межтрубное расстояние – $0,07 \text{ м}$, количество труб – 12, высота фотобиореактора – $1,97 \text{ м}$, длина трубы – 55 м .

Объем одного фотобиореактора:

$$V = 12 \cdot ((3,14 \cdot 0,125^2 \cdot 55) + 11 \cdot (2 \cdot 3,14^2 \cdot 0,125^2 \cdot 0,085)) = 35,83 \text{ м}^3.$$

Стадия центрифугирования

Согласно расчетам материального баланса, объем суспензии, поступающей на стадию центрифугирования после культивирования, составляет:

$$V_{\text{сусп}} = \frac{75500,41}{988} = 75,65 \text{ м}^3.$$

Процесс центрифугирования длится 10 мин.

$$G_{\text{сусп}} = \frac{75,65}{10} = 7,57 \text{ м}^3/\text{мин.}$$

Согласно расчетам материального баланса, объем экстракта, поступающего на стадию центрифугирования после экстрагирования, составляет:

$$V_{\text{экстр}} = \frac{1030,47}{998} = 1,03 \text{ м}^3.$$

Процесс центрифугирования длится 10 минут.

$$G_{\text{сусп}} = \frac{1,03}{10} = 0,1 \text{ м}^3/\text{мин.}$$

Таблица 39 – Технические характеристики трубчатой центрифуги Hi-Torreg GQ150

Показатель	Значение
Объем барабана, м ³	0,73
Внутренний диаметр, м	0,15
Скорость вращения, об/мин	3000 – 14000
Диаметр сопла, мм	5,6
Фактор разделения	17000
Производительность (поток жидкости), кг/ч	3000
Мощность, кВт	3
Высота барабана, м	0,73
Ширина, м	0,76
Высота, м	1,7
Глубина, м	0,96
Вес, кг	550

Таким образом, для отделения биомассы и экстракта белка необходимо подобрать 1 трубчатую центрифугу с диаметром разделяемой части от 5 до 10 мкм объемом 0,359 м³. Согласно вышеизложенным данным, необходимо использовать трубчатую центрифугу Hi-Torreg GQ150, производительностью 3000 кг/ч, технические характеристики которой представлены в таблице 39.

В процессе центрифугирования отводится биомасса, объем которой, по расчетам материального баланса, составляет 75,65 м³.

Рассчитаем номинальный объем резервуара для кратковременного хранения биомассы:

$$V_{\text{рез}}^{\text{ном}} = \frac{75,65}{0,9} = 84,1 \text{ м}^3.$$

Согласно вышеизложенным данным, необходим вертикальный емкостной аппарат, выполненный по ГОСТ 9931-85 [219], обладающий номинальным объемом 100 м³ с коническим днищем, рабочим давлением в корпусе 0,6 МПа, установленных на опорах-лапах.

Условное обозначение: ВКП 2-1-100-0,6 ГОСТ 9931-85. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Технические характеристики аппарата ВКП 2-1-100-0,6 ГОСТ 9931-85

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	100
Высота, м	13,9
Диаметр, м	3
Угол при вершине, °	90
Площадь внутренней поверхности, м ²	136
Высота опор, м	12,3

В процессе центрифугирования культуральная жидкость, объем которой, по расчетам материального баланса, составляет 68,1 м³.

Рассчитаем номинальный объем резервуара для кратковременного хранения культуральной жидкости для последующей утилизации:

$$V_{\text{рез}}^{\text{ном}} = \frac{68,1}{0,9} = 75,65 \text{ м}^3.$$

Таким образом, для кратковременного хранения культуральной жидкости и экстракта белка необходимо подобрать один емкостной аппарат номинальным объемом не менее 75,65 м³.

Согласно вышеизложенным данным, необходим вертикальный емкостной аппарат, выполненный по ГОСТ 9931-85, обладающий номинальным объемом 80 м³ с коническим днищем, рабочим давлением в корпусе 0,6 МПа, установленных на опорах-лапах.

Условное обозначение: ВКП 2-1-80-0,6 ГОСТ 9931-85. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Технические характеристики аппарата ВКП 2-1-80-0,6 ГОСТ 9931-85

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	80
Высота, м	9,02
Диаметр, м	3,4
Угол при вершине, °	90
Площадь внутренней поверхности, м ²	103
Высота опор, м	7,2

Стадия экстракции в ультразвуковом поле

Согласно расчетам материального баланса, на стадию экстракции в ультразвуковом поле поступают паста биомассы и фосфатный буфер в количестве:

$$G_6 = 173,46 \text{ кг};$$

$$G_{ф.6} = 867,31 \text{ кг}.$$

При плотности пасты 940 кг/м³, загружаемый объем пасты биомассы:

$$V_6 = \frac{173,46}{940} = 0,184 \text{ м}^3.$$

При плотности экстрагента 1000 кг/м³, загружаемый объем фосфатного буфера:

$$V_{ф.6} = \frac{867,31}{1000} = 0,867 \text{ м}^3.$$

Суммарный объем потока, поступающий на экстракцию, составляет:

$$V_{\text{общ}} = 0,184 + 0,867 = 1,05 \text{ м}^3.$$

Рассчитаем номинальный объем камеры экстракции по формуле 6:

$$V_{\text{экстр}}^{\text{ном}} = \frac{1,05}{0,7} = 1,5 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать ультразвуковой экстрактор номинальным объемом не менее 1,5 м³.

Согласно вышеизложенным данным, необходимо использовать ультразвуковой экстрактор НО-58, оснащенный встроенными ультразвуковыми излучателями, рубашкой, в которую подается вода из внешнего источника для поддержания температуры. Снаружи экстрактор покрыт теплоизоляционным

материалом и облицовочными панелями. Внутри находится рамная мешалка с приводом во взрывобезопасном исполнении.

Таблица 42 – Технические характеристики ультразвукового экстрактора НО-242

Показатель	Значение
Потребляемая электроэнергия, В (Гц)	380 (50)
Максимальный рабочий объём, м ³	2,05
Мощность ультразвука, кВт	0,1
Установленная мощность, кВт	3
Скорость вращения рамной мешалки, об/мин	27
Габаритные размеры (диаметр×высота), мм	1586×3560
Масса экстрактора, кг	950

Технические характеристики ультразвукового экстрактора НО-242 представлены в таблице 42.

Стадия ультрафильтрации

Согласно расчетам материального баланса, объем супернатанта, поступающего на стадию ультрафильтрации, составляет:

$$V_{\text{суперн}} = \frac{389,76}{1050} = 0,37 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать мембранный фильтр-пресс номинальным объемом не менее 0,37 м³.

Согласно вышеизложенным данным, необходимо использовать мембранный фильтр-пресс с боковой подвеской плит М1-6/470-1У-12-42, технические характеристики которого представлены в таблице 43.

На стадии ультрафильтрации из супернатанта удаляется пермеат, составляющий 21,18 % от общей массы, тогда масса ретентата составляет:

$$M_{\text{рет}} = \frac{389,76 \cdot 78,82}{100} = 307,21 \text{ кг.}$$

$$\text{Объем ретентата: } V_{\text{рет}} = \frac{307,21}{1250} = 0,25 \text{ м}^3.$$

Выгрузка ретентата из фильтра производится, когда его объем становится равным:

$$V_{\text{рет.ф}} = 0,025 \cdot 6 = 0,15 \text{ м}^3.$$

Рассчитаем необходимое количество фильтров:

$$n = \frac{0,25}{0,15} = 1,6.$$

Таким образом, необходим 2 мембранных фильтр-пресса.

Таблица 43 – Технические характеристики мембранного фильтр-пресса М1-6/470-1У-12-42

Показатель	Значение
Площадь фильтрования, м ²	6
Камерный объём, м ³	0,066
Количество камер, шт	19
Толщина осадка, м	0,025
Производительность по пермеату, м ³ /ч	1
Длина, м	2,2
Ширина, м	0,7
Высота, м	0,75
Масса, кг	1080

Согласно расчетам материального баланса на стадии ультрафильтрации отводится осадок белков в количестве 0,25 м³. Рассчитаем номинальный объем резервуара для кратковременного хранения пасты белков:

$$V_{\text{рез}}^{\text{ном}} = \frac{0,25}{0,9} = 0,28 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать емкостной аппарат номинальным объемом не менее 0,28 м³.

Таблица 44 – Технические характеристики аппарата ВКЭ 1-1-1 ГОСТ 9931-85

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	1
Высота, м	2,15
Диаметр, м	1
Высота опор, м	0,430

Согласно вышеизложенным данным, необходим вертикальный емкостной аппарат, выполненный по ГОСТ 9931-85, обладающий номинальным объемом 1 м³ с коническим днищем и эллипсоидной отъемной крышкой, рабочим давлением в корпусе 0,6 МПа, установленных на опорах-лапах.

Условное обозначение: ВКЭ 1-1-1 ГОСТ 9931-85. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 44.

В процессе ультрафильтрации отводится пермеат, объем которого, по расчетам материального баланса, составляет 0,04 м³.

Рассчитаем номинальный объем резервуара для кратковременного хранения пермеата для последующей утилизации:

$$V_{\text{рез}}^{\text{ном}} = \frac{0,068}{0,9} = 0,076 \text{ м}^3.$$

Таким образом, для кратковременного хранения пермеата необходимо подобрать один емкостной аппарат номинальным объемом не менее 0,076 м³.

Таблица 45 – Технические характеристики аппарата ВКЭ 2-1-0,1-0,6 ГОСТ 9931-85

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	0,1
Высота, м	0,55
Диаметр, м	0,4
Угол при вершине, °	90
Площадь внутренней поверхности, м ²	1,15
Высота опор, м	0,6

Согласно вышеизложенным данным, необходим вертикальный емкостной аппарат, выполненный по ГОСТ 9931-85, обладающий номинальным объемом 0,1 м³ с коническим днищем и эллипсоидной отъемной крышкой, рабочим давлением в корпусе 0,6 МПа, установленных на опорах-лапах.

Условное обозначение: ВКЭ 2-1-0,1-0,6 ГОСТ 9931-85. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 45.

Стадия протеолиза

Основываясь на расчетах материального баланса, на стадии протеолиза объем ретентата составляет 0,25 м³. Тогда номинальный объем емкостного аппарата с перемешивающим устройством:

$$V_{\text{ем.апп}}^{\text{ном}} = \frac{0,12}{0,7} = 0,36 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать емкостной аппарат для протеолиза номинальным объемом не менее 0,36 м³.

Согласно вышеизложенным данным, необходимый вертикальный емкостной аппарат с механическим лопастным перемешивающим устройством, выполненный по ГОСТ 20680-2002, обладает номинальным объемом 0,4 м³, коническим днищем и эллиптической отъемной крышкой, теплообменным устройством в виде электронагревателя, рабочим давлением в корпусе 0,6 МПа, корпусом коррозионно-стойкого исполнения.

Условное обозначение: 01-0,4-0,6-К ГОСТ 20680-2002. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 46.

Таблица 46 – Технические характеристики емкостного аппарата 01-0,4-0,6-К

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	0,4
Теплообменное устройство	Электронагреватель
Перемешивающее устройство	Механическое лопастное
Число оборотов, об/мин	80
Потребляемая мощность, кВт	1,5
Высота, м	0,875
Диаметр, м	0,8

Стадия ионообменной хроматографии

Согласно расчетам материального баланса, объем гидролизата, поступающего на стадию ионообменной хроматографии, составляет:

$$V_{\text{гидр}} = \frac{303,24}{1200} = 0,25 \text{ м}^3.$$

Тогда номинальный объем ионообменной хроматографической установки:

$$V_{\text{ион.уст}}^{\text{ном}} = \frac{0,25}{0,7} = 0,36 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать ионообменную хроматографическую установку для очистки антимикробных пептидных фракций номинальным объемом не менее 0,36 м³.

Согласно вышеизложенным данным, необходимо использовать параллельноточный ионитный фильтр ФИПа I-0,7-0,6, технические характеристики которого представлены в таблице 47.

Согласно расчетам материального баланса на стадии ионообменной хроматографии отводится паста антимикробных пептидов в количестве 0,02 м³.

Рассчитаем номинальный объем резервуара для кратковременного хранения пасты антимикробных пептидов:

$$V_{\text{рез}}^{\text{ном}} = \frac{0,02}{0,9} = 0,03 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать емкостной аппарат номинальным объемом не менее 0,03 м³.

Согласно вышеизложенным данным, необходим вертикальный емкостной аппарат, выполненный по ГОСТ 9931-85, обладающий номинальным объемом 0,063 м³ с коническим днищем и эллипсоидной отъемной крышкой, рабочим давлением в корпусе 0,6 МПа, установленных на опорах-лапах.

Таблица 47 – Технические характеристики фильтра ионитного параллельноточного ФИПа 1-0,7-0,6

Показатель	Значение
Производительность, м ³ /ч	10
Вместимость корпуса, м ³	1,1
Объем фильтрующей загрузки, м ³	0,79
Диаметр фильтра, м	0,7
Высота слоя загрузки, м	2
Рабочее давление, МПа	0,6
Потребляемая мощность, кВт	6
Ширина, м	3,445
Высота, м	0,72
Длина, м	0,72
Масса, кг	479

Условное обозначение: ВКЭ 2-1-0,063-0,6 ГОСТ 9931-85. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 48.

В процессе ионообменной хроматографии отводятся пептиды, не обладающие антимикробным действием, витамины, свободные аминокислоты, моносахариды, объем которых, по расчетам материального баланса, составляет 0,02 м³. Рассчитаем номинальный объем резервуара для кратковременного хранения отходов после ионообмена для последующей утилизации:

$$V_{\text{рез}}^{\text{ном}} = \frac{0,02}{0,9} = 0,02 \text{ м}^3.$$

Таким образом, необходимо подобрать один емкостной аппарат номинальным объемом не менее 0,02 м³. Согласно вышеизложенным данным, необходим вертикальный емкостной аппарат, выполненный по ГОСТ 9931-85, обладающий номинальным объемом 0,063 м³ с коническим днищем и эллипсоидной отъемной крышкой, рабочим давлением в корпусе 0,6 МПа, установленных на опорах-лапах.

Таблица 48 – Технические характеристики аппарата ВКЭ 2-1-0,063-0,6 ГОСТ 9931-85

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	0,063
Высота, м	0,687
Диаметр, м	0,4
Угол при вершине, °	90
Площадь внутренней поверхности, м ²	0,85
Высота опор, мм	245

Условное обозначение: ВКЭ 2-1-0,063-0,6 ГОСТ 9931-85. Технические характеристики аппарата представлены в таблице 49.

Таблица 49 – Технические характеристики аппарата ВКЭ 2-1-0,063-0,6 ГОСТ 9931-85

Показатель	Значение
Номинальный объем, м ³	0,063
Высота, м	0,687
Диаметр, м	0,4
Угол при вершине, °	90
Площадь внутренней поверхности, м ²	0,85
Высота опор, мм	245

Фасовка

Согласно расчетам материального баланса на стадию фасовки поступает порошок антимикробных пептидов в количестве 28,71 кг. Необходимым аппаратом является линия для автоматического наполнения фармацевтической

тары AFL-4. Технические характеристики линия для автоматического наполнения фармацевтической тары AFL-4 представлены в таблице 50.

Таблица 50 – Технические характеристики линии для автоматического наполнения фармацевтической тары AFL-4

Показатель	Значение
Заполняя емкость (мл)	15 – 110
Головки заполнения (шт.)	8
Скорость (шт. /мин)	40 – 60
Напряжение (В) / Частота (Гц)	220 / 60
Мощность (л.с)	1,75
Габаритные размеры (см)	134×32×75

Насосное оборудование

Для транспортировки материалов по трубопроводам необходимо насосное оборудование. В проектируемом производстве по трубопроводам транспортируются материалы, которые условно можно разделить по категориям:

1. жидкости близкие по плотности к воде: питательная среда, посевной материал, суспензия клеток, культуральная жидкость, экстракт белков;
2. вязкая жидкость: концентрированная биомасса, паста белкового гидролизата и антимикробных пептидов влажностью 65 %.

Условное обозначение: СТН АА-03. Технические характеристики насоса представлены в таблице 51.

Таблица 51 – Технические характеристики насоса СТН АА-03

Показатель	Значение
Производительность, м ³ /ч	5
Напор, м	12
Мощность двигателя, кВт	0,37
Частота вращения, об/мин	2900
Длина, м	0,358
Ширина, м	0,145
Высота, м	0,171

Для жидкостей близких по плотности к воде принимаем к установке гигиенические центробежные насосы производительностью 5 м³/ч и напором до 12 м. Данная серия насосов СТН предназначена для использования в пищевой и

фармацевтической промышленности. Корпус насоса и импеллер изготовлены из электрополированной нержавеющей стали, возможность промывки и оснащения гигиеническим кожухом, предусмотренным в конструкции насосов.

Для вязких жидкостей принимаем к установке самовсасывающий импеллерный насос НСУ-1,8/12-0,25-АМ, предназначенный для перекачивания средневязких и вязких веществ, неагрессивных к материалам насоса, а также веществ, содержащих твердые включения с размером частиц до 3 мм.

Технические характеристики насоса НСУ-1,8/12-0,25-АМ представлены в таблице 52.

Таблица 52 – Технические характеристики насоса НСУ-1,8/12-0,25-АМ

Показатель	Значение
Производительность, м ³ /ч	1,75
Напор, м	12
Частота вращения, об/мин	750
Потребляемая мощность, кВт	0,75
Длина, мм	0,33
Ширина, мм	0,17
Высота, мм	0,2

На базе полученного массива экспериментальных данных предложена технологическая схема производства неполярных веществ липидной природы антибактериального действия (линия 1), антибактериальных пептидов (линия 2) и водного экстракта стимулирующего действия (линия 3), из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* (рис. 35).

На схеме представлено технологическое оборудование: 1 – установка для тонкой очистки воздуха; 2-4,6 – емкости для приготовления питательной среды; 5, 14, 25 – фильтр мембранный; 7, 8 – фотобиореакторы; 9, 24, 34 – центрифуга; 10 – емкость для культуральной жидкости; 11 – сушилка; 12, 21 – емкость для фосфатного буфера; 13, 22 – ультразвуковой экстрактор; 15 – резервуар для пермеата; 16 – резервуар для пасты белков; 17 – установка для протеолиза; 18 – установка для ионнообменной хроматографии; 19, 26 – емкость для примесей; 20 – емкость для пептидов; 23,33 – емкость для отработанной биомассы; 28 – емкость для водного экстракта; 29 – емкость для петролейного эфира; 30 –

экстрактор СВЧ; 27, 31 – дистиллятор; 32 – емкость для отработанного петролейного эфира; 35 – емкость для липидов; 36 – фасовочный аппарат.

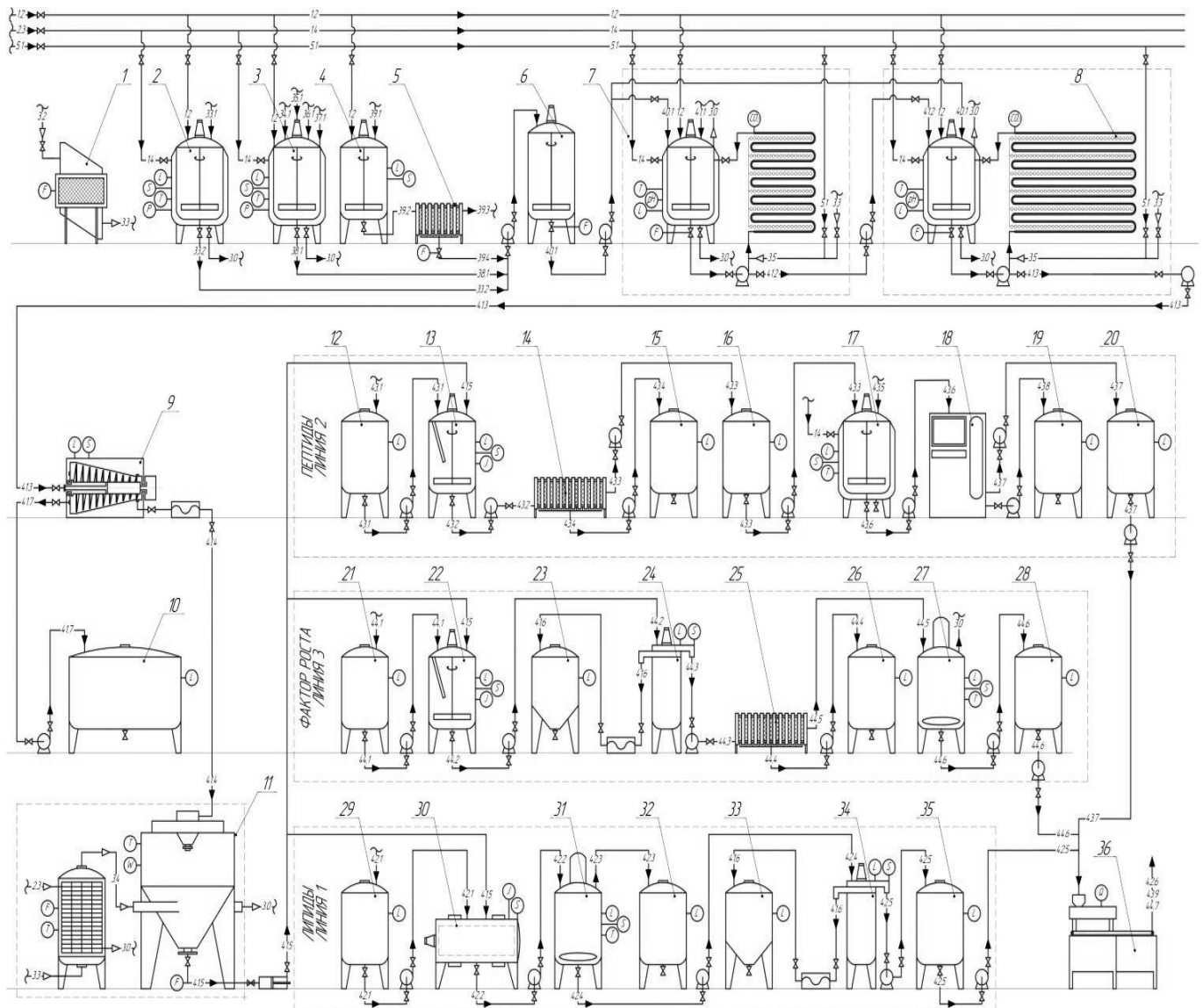


Рисунок 35 – Принципиальная технологическая схема производства антибактериальных и стимулирующих веществ из микроводорослей

Chlorella sorokiniana

На схеме представлены технологические потоки: 1.2 – вода техническая, 1.4 – вода горячая, 2.3 – пар влажный, 3.0 – воздух отработанный, 3.2 – воздух кондиционированный, 3.3 – воздух очищенный, 3.4 – воздух горячий, 5.1 – сжиженная двуокись углерода, 33.1 – сухая соль дегидрофосфата натрия, 33.2 – стерилизованный раствор фосфатов, 34.1 – сухая соль нитрат калия, 35.1 – сухая соль сульфат магния, 36.1 – сухая соль гептагидрат сульфата железа, 37.1 – сухая

соль ЭДТА, 38.1 – стерилизованный раствор солей макроэлементов, 39.1 – сухая соль микроэлементов, 39.2 – водный раствор солей микроэлементов, 39.3 – концентрат раствора солей микроэлементов, 39.4 – стерилизованный раствор солей микроэлементов, 40.1 – питательная среда Тамия, 41.1 – маточная культура *Chlorella sorokiniana*, 41.2 – посевной материал *Chlorella sorokiniana*, 41.3 – биомасса *Chlorella sorokiniana*, 41.4 – концентрированная биомасса *Chlorella sorokiniana*, 41.5 – высушенная биомасса *Chlorella sorokiniana*, 41.6 – отработанная биомасса *Chlorella sorokiniana*, 41.7 – культуральная жидкость, 42.1 – петролейный эфир, 42.2 – смесь биомассы и петролейного эфира, 42.3 – отработанный экстрагент для липидов, 42.4 – экстрагированная смесь липидов, 42.5 – очищенная суспензия липидов, 42.6 – упакованная суспензия липидов. 43.1, 44.1 – фосфатный буфер, 43.2 – смесь биомассы и фосфатного буфера, 43.3 – белковый раствор, 43.4 – пермеат, 43.5 – фермент пепсин, 43.6 – пептиды, 43.7 – очищенная смесь пептидов, 43.8 – отходы после ионнообменной хроматографии, 43.9 – упакованная суспензия пептидов, 44.2 – смесь биомассы и фосфатного буфера для фактора роста, 44.3 – экстракт, 44.4 – примеси, 44.5 – очищенная смесь фактора роста, 44.6 – концентрированная смесь фактора роста, 44.7 – упакованная суспензия фактора роста.

ВЫВОДЫ

1. Найдены эффективные технологические режимы (уровень ФАР, температура) культивирования цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 и микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, позволяющие накопить биомассу клеток с повышенным содержанием неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков.
2. Определены эффективные режимы дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* с точки зрения наибольшего выхода внутриклеточных водорастворимых белков.
3. Выявлена закономерность влияния белого света на антибактериальное действие неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404.
4. Определено, что добавление водорастворимой белковой фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana* приводит к повышению емкости популяции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на 21 % и увеличению удельной скорости роста клеток на экспоненциальной фазе в 1,4 раза по сравнению с контролем.
5. Предложена принципиальная технологическая схема получения веществ антибактериального и стимулирующего действия из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Список использованных источников

1. Макарова Е. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурина, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 20. – С. 120-133.
2. Bazarnova Y. Illumination influence on *Chlorella sorokiniana* biomass synthesis / Y. Bazarnova, N. Lyskova, T. Kuznetsova, E. Trukhina / *Biotechnologia acta*. – 2019 – Т. 12, №3. – С. 50-56.
3. Дворецкий Д.С. Вопросы разработки эффективной биотехнологии синтеза ценных компонентов из биомассы микроводорослей / Д.С. Дворецкий, М.С. Темнов, И.В. Маркин, Я.В. Устинская, М.А. Еськова // Теоретические основы химической технологии. – 2022. – Том 56. – № 4. – С. 418-433.
4. Sinetova M.A. Assessment of the Biotechnological Potential of Cyanobacterial and Microalgal Strains from IPPAS Culture Collection / M.A. Sinetova, R.A. Sidorov, A.Y. Starikov, A.S. Voronkov, A.S. Medvedeva, Z.V. Krivova, M.S. Pakholkova, D. Bachin, V.S. Bedbenov, D. Gabrielyan, B.K. Zayadan, K. Bolatkhan, D.A. Los // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2020. – Vol.56. – P. 794-808.
5. Wu Y.-H. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review / Y.-H. Wu, H.-Y. Hu, Y. Yu, T.-Y. Zhang, S.-F. Zhu, L.-L. Zhuang, X. Zhang, Y. Lu // *Renew. Sust. Energ. Rev.* – 2014. – Vol. 33. – P. 675-688.
6. Matos Â.P. Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application. / Â.P. Matos, R. Feller, E.H. Siegel Moecke, J.V. Oliveira, A.F. Jr, R. Derner, E.S. Sant'Anna // *Journal of the American Oil Chemists Society*. – 2016. – Vol. 93. – P. 963-972.
7. Muhaemin M. Biomass nutrient profiles of marine microalgae *Dunaliella salina* / M. Muhaemin, R.F. Kaswadji // *Journal Penelitian Sains*. – 2009. – Vol. 13. – P. 64-67.
8. Shah M.R. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products / M.R. Shah // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – № 278. – P. 531-558.

9. Kim J.H. Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (*Haematococcaceae*, *Chlorophyta*) isolated from Korea / J.H. Kim, M.A. Affan, J. Jang, M. Kang, A.-R. Ko, S.-M. Jeon, C. Oh, S.-J. Heo, Y.-H. Lee, S.-J. Ju, D.-H. Kang // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – Vol. 25. – № 2. – P. 238-246.
10. Sánchez J.F. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis* / J.F. Sánchez, J.M. Fernandez-Sevilla, G. Acien, A. Rueda, J. Pérez-Parra, E. Molina-Grima // *Process Biochemistry*. – 2008. – Vol. 43. – P. 398-405.
11. Andrade C. J. An overview on the application of genus *Chlorella* in biotechnological processes / C.J. Andrade, L.M. Andrade // *J Adv Res Biotech*. – 2017. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-9.
12. Темнов М.С., Маркин И.В., Устинская Я.В., Еськова М.А., Дворецкий Д.С. К вопросу о культивировании биомассы микроводорослей *Chlorella Vulgaris* с повышенным содержанием ценных метаболитов. Проблемы и инновационные решения в химической технологии ПИРХТ-2019: материалы всероссийской конференции с международным участием / Воронеж. гос. ун-т инж. техн. – Воронеж: ВГУИТ, 2019. С. 95-96.
13. Цоглин Л.Н. Биотехнология микроводорослей / Л.Н. Цоглин, Н.А. Пронина – Москва: Научный мир, 2012. – 182 с.
14. Базарнова Ю.Г. Выделение ценных компонентов из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* / Ю.Г. Базарнова, Н.А. Политаева, Т.А. Кузнецова, А. Тоуми // *Вестник технологического университета*. – 2018. – Т. 21. – № 2. – P. 176-179.
15. Liang Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions / Y. Liang, N. Sarkany, Y. Cui // *Biotechnol. Lett.* – 2009. – Vol. 31. – P. 1043-1049.
16. Lee S.Y. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. / S.Y. Lee, J.M. Cho, Y.K. Chang, Y.-K. Oh // *Bioresource Technology*. – 2017. – Vol. 244. – № 2. – P. 1317-1328.

17. Cronmiller E. Cell wall integrity signaling regulates cell wall-related gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* / E. Cronmiller, T. Deepak, S. Nai Chun, K. Thamali, M. H. Wang – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 12204-12217.
18. Molina-Grima, E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics / E. Molina-Grima, E. Belarbi, G. Acien // Biotechnology advances. – 2003. – Vol. 20. – P. 491-515.
19. Lee A.K. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // Bio. Bioenergy. – 2012. – Vol. 46. – P. 89-101.
20. Kauff F. Phylogeny of cyanobacteria: an overview / F. Kauff, B. Büdel // Progress in Botany. – 2010. – Vol. 72. – P. 209-224.
21. Nabout J.C. How many species of cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number / J.C. Nabout, B. da Silva Rocha, F.M. Carneiro, C.L. Sant'Anna // Biodivers. Conserv. – 2015. – Vol. 22. – № 12. – P. 2907-2918.
22. Gugger M. Cyanotoxins and Other Bioactive Compounds from the Pasteur Cultures of Cyanobacteria (PCC) / M. Gugger, A. Boullié, T. Laurent // Toxins (Basel). – 2023. – Vol. 15. – № 6.
23. Sciuto K. Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group / K. Sciuto, I. Moro // Biodivers. Conserv. – 2015. – Vol. 24. – P. 711-738.
24. Abushelaibi A.A. Use of antimicrobial agents in food processing systems / A.A. Abushelaibi, M.S. Al Shamsi, H.S. Afifi // Recent Pat Food Nutr Agric. – 2012. – Vol. 4. – № 1. – P. 2-7.
25. Поляк Ю.М. Цианобактерии и их метаболиты / Ю.М. Поляк, В.И. Сухаревич, М.С. Поляк – СПб.: Нестор-История, 2022. – 328 с.
26. Ciebiada M. Modifying the Cyanobacterial Metabolism as a key to efficient biopolymer production in photosynthetic microorganisms / M. Ciebiada, K. Kubiak, M. Daroch. // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21. – № 19. – P. 7204-7230

27. Abdel-Raouf N. Antibiotic activity of two *Anabaena* species against four fish pathogenic *Aeromonas* species / N Abdel-Raouf, IBM Ibraheem // *African Journal of Biotechnology*. – 2018. – Vol. 7. – № 15. – P. 2644-2648.
28. Гогонин А.В. Применение микроводорослей в очистке сточных вод, содержащих отходы целлюлозно-бумажного производства и коммунальные стоки / А.В. Гогонин, Т.Н. Щемелинина, И.В. Новаковская, Е.Н. Патова, Е.М. Анчугова, В.А. Лукьянов, Т.Н. Гаева, В.В. Володин // *Вестник биотехнологии*. – 2021. – Т. 17. – № 4. – С. 24-33.
29. Gifuni I. Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery / I. Gifuni, A. Pollio, C. Safi, A. Marzocchella, G. Olivier // *Trends in Biotechnol.* – 2019. – Vol. 37. – P. 242-252.
30. Ma R. Comprehensive Utilization of Marine Microalgae for Enhanced Co-Production of Multiple Compounds / R. Ma, B. Wang, E.T. Chua, X. Zhao, K. Lu, S.H. Ho, X. Shi, L. Liu, Y. Xie, Y. Lu, J. Chen // *Mar. Drugs*. – 2020. – Vol. 18. – № 9. – P. 467-492.
31. Coronado-Reyes J.A. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review / J.A. Coronado-Reyes, J.A. Salazar-Torres, B. Juárez-Campos, J.C. González-Hernández // *Food Science and Technology*. – 2020. – Vol. 42. – P. 1-11.
32. Нельсон Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т. Т. 2. Биоэнергетика и метаболизм / Д. Нельсон, М. Кокс. – пер. с англ. – 3-е изд., испр. – М.: Лаборатория знаний, 2017. – 694 с.
33. Tan L. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery / L. Tan // *Phytochemistry*. – 2007. – Vol. 68. – P. 954-979.
34. Whitton B.A. Introduction to the cyanobacteria / B.A. Whitton, M. Potts // *Ecology of Cyanobacteria*. – 2012. – P. 1-13.
35. Mazard S. Tiny microbes with a big impact: The role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future / S. Mazard, A. Penesyán, M. Ostrowski, I. Paulsen, S. Egan // *Mar. Drugs*. – 2016. – Vol. 14. – P. 97-116.

36. Carpine R. Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health / R. Carpine, S. Sieber // *Current Research in Biotechnology*. – 2021. – Vol. 33. – P. 65-81.

37. Cruz-Casas D.E. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides / D.E. Cruz-Casas, C.N. Aguilar, J.A. Ascacio-Valdés, R. Rodríguez-Herrera, M.L. Chávez-González, A.C. Flores-Gallegos // *Food Chemistry: Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 3.

38. Beaulieu L. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicruris* and identification of peptides implied in bioactivity / L. Beaulieu, S. Bondu, K. Doiron, L.-E. Rioux, S.L. Turgeon // *J. Funct. Foods*. – 2015. – Vol. 17. – P. 685-697.

39. Vidal A.R. Effect of ultrasound on the functional and structural properties of hydrolysates of different bovine collagens / A.R. Vidal, R.L. Cansian, R. de O. Mello, E.H. Kubota, I.M. Demiate, A.A.F. Zielinski, R.C.P. Dornelles // *Food Sci. Technol*. – 2020. – Vol. 40. – № 2.

40. Hu H. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions / H. Hu, J.H. Wu, E.C.Y. Li-Chan, L. Zhu, F. Zhang, X.Y. Xu, G. Fan, L.F. Wang, X.J. Huang, S.Y. Pan // *Food Hydrocolloids*. – 2013. – Vol. 30. – P. 647-655.

41. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicruris* and identification of peptides implied in bioactivity / L. Beaulieu, S. Bondu, K. Doiron et al. // *J. Funct. Foods*. – 2015. – Vol. 17. – P. 685-697.

42. Kormilets D.Y. Antibiotic Peptides / D.Y. Kormilets, A.D. Polyanovsky, V.A. Dadali, A.T.Maryanovich // *J. Evol Biochem Physiol*. – 2019. – Vol. 55(4). – P. 269-276.

43. Duran R. Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae as Emerging Sources of Antibacterial Peptides / R. Duran, M.V.L. Rivas, C. Cárdenas, F. Guzmán // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 24. – P. 5804-5830.

44. Swain S.S. Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria / S.S. Swain, S.K. Paidesetty, R.N. Padhy // *Biomed. Pharmacother.* – 2017. – Vol. 90. – P. 760-776.
45. Biswaro L.S., da Costa Sousa M.G., Rezende TMB., Dias S.C., Franco O.L. Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges / L.S. Biswaro, M.G. da Costa Sousa, T.M.B. Rezende, S.C. Dias, O.L. Franco // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 855-868.
46. Harada K. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17 / K. Harada, K. Fujii, T. Shimada, M. Suzuki, H. Sano, K. Adachi, W.W. Carmichael // *Tetrahedron Letters.* – 1995. – Vol. 27. – P. 1511-1514.
47. Nagarajan M. SAR analysis and bioactive potentials of freshwater and terrestrial cyanobacterial compounds: A review / M. Nagarajan, V. Maruthanayagam, M. Sundararaman // *J. Appl. Toxicol.* – 2013. – Vol. 33. – P. 313-349.
48. Gademann K. Biomimetic Total Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Anachelin H. / K. Gademann, Y. Bethuel, H.H. Locher, C. Hubschwerlen // *J. Org. Chem.* – 2007. – Vol. 72. – P. 8361-8370.
49. Ishida K. Kawaguchipeptin B, an antibacterial cyclic undecapeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* / K. Ishida, H. Matsuda, M. Murakami, K. Yamaguchi // *J. Nat. Prod.* – 1997. – Vol. 60. – P. 724-726.
50. Xue Y. Cyanobacteria-derived peptide antibiotics discovered since / Y. Xue, P. Zhao, C. Quan, Z. Zhao, W. Gao, J. Li, X. Zu, D. Fu, S. Feng, X. Bai // *Peptides.* – 2018. – Vol. 107. – P. 17-24.
51. Zainuddin, E.N. Lyngbyazothrins A-D, antimicrobial Cyclic Undecapeptides from the Cultured Cyanobacterium *Lyngbya* sp / E.N. Zainuddin, R. Jansen, M. Nimtz, V. Wray, M. Preisitsch, M. Lalk, S. Mundt, // *J. Nat. Prod.* – 2009. – Vol. 72. – P. 1373-1378.
52. Nagatsu A. Muscoride A: A new oxazole peptide alkaloid from freshwater cyanobacterium *Nostoc muscorum* / A. Nagatsu, H. Kajitani, J. Sakakibara // *Tetrahedron Lett.* – 1995. – Vol. 36. – P. 4097-4100.

53. Liu L. New peptides isolated from *Lyngbya* species: A review / L. Liu, K.S. Rein // *Mar. Drugs*. – 2010. – Vol. 8. – P. 1817-1837.
54. Sadeghi S. Anticancer and antibacterial properties in peptide fractions from hydrolyzed spirulina protein / S. Sadeghi, H. Jalili, S.O. Ranaei Siadat, M. Sedighi // *J. Agric. Sci. Technol.* – 2018. – Vol. 20. – P. 673-683.
55. Helms G.L. Scytonemin A, a novel calcium antagonist from a blue-green alga / G.L. Helms, R.E. Moore, W.P. Niemczura, G.M.L. Patterson, K.B. Tomer, M.L. Gross // *J. Org. Chem.* – 1988. – Vol. 53. – P. 1298-1307.
56. Suetsuna K. Identification of antihypertensive peptides from peptic digests of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* / K. Suetsuna, J.R. Chen // *Marine Biotechnology*. – 2001. – Vol. 3. – P. 305-309.
57. El-Desouki N.I. Improvement in beta-islets of Langerhans in alloxan-induced diabetic rats by erythropoietin and *Spirulina* / N.I. El-Desouki, G.A. Tabl, K.K. Abdel-Aziz, E.I. Salim, N. Nazeeh // *The Journal of Basic & Applied Zoology*. – 2015. – Vol. 71. – P. 20-31.
58. Wang Z.J. Inhibitory effects of small molecular peptides from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* on cancer cell growth / Z.J. Wang, X.W. Zhang // *Food & Function*. – 2016. – Vol. 7. – № 2. – P. 781-788.
59. Sun Y. Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis* / Y. Sun, R. Chang, Q. Li, B. Li // *European Food Research Technolgy*. – 2015. – P. 1-8.
60. Gupta V. Antimicrobial effect of a cyclic peptide Nostophycin isolated from wastewater cyanobacteria, *Nostoc calcicola* / V. Gupta, D. Vyas // *Current Botany*. – 2021. – Vol. 12. – P. 94-101.
61. Santos R.S. Nanomaterials and molecular transporters to overcome the bacterial envelope barrier: Towards advanced delivery of antibiotics. / R.S. Santos, C. Figueiredo, N.F. Azevedo, K. Braeckmans, S.C. De Smedt // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – Vol. 137. – P. 28-48.
62. Arif M. Target CPP: Accurate prediction of cell-penetrating peptides from optimized multi-scale features using gradient boost decision tree. / M. Arif, S. Ahmad,

F. Ali, G. Fang, M. Li, D.-J. Yu // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 2020. – Vol. 34. – P. 841-856.

63. Kini S. Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications. In *Advances in Cyanobacterial Biology* / S. Kini, M. Divyashree, M.K. Mani, B.S. Mamatha // Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. – 2020. – P. 173-194.

64. Verdugo González L. Antimicrobial potential of a hydrolyzed protein extract of the microalgae *Nannochloropsis* sp. / L. Verdugo González, A. Acosta Cárdenas, A.D. Zapata, E.M. Cadena Chamorro, S.A. Pulido Muñoz // *DYNA* – 2019. – Vol. 86. – № 211. – P. 192-198. doi:10.15446/dyna.v86n211.78865

65. Papo N. Can We Predict Biological Activity of Antimicrobial Peptides from their Interactions with Model Phospholipid Membranes / N. Papo, Y. Shai // *Peptides*. – 2003. – Vol. 24. – P. 1693-1703.

66. Holanda M.L. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria / M.L. Holanda, V.M.M. Melo, L.M.C.M. Silva, R.C.N. Amorim, M.G. Pereira, N.M.B. Benevides // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2005. – Vol. 38. – P. 1769-1773.

67. Strathmann M. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* / M. Strathmann, J. Wingender, H.-C. Flemming // *J. Microbiol. Methods*. – 2002. – Vol. 50. – P. 237-248.

68. Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis* / Y. Sun, R. Chang, Q. Li et al. // *European Food Research Technology*. – 2015. – P. 1-8.

69. Cepas V. Microalgae and Cyanobacteria Strains as Producers of Lipids with Antibacterial and Antibiofilm Activity / V. Cepas, I. Gutiérrez-Del-Río, Y. López, S. Redondo-Blanco, Y. Gabasa, M.J. Iglesias, R. Soengas, A. Fernández-Lorenzo, S. López-Ibáñez, C.J. Villar // *Mar. Drugs*. – 2021. – Vol. 19. – P. 675-694.

70. Lee Chang K.J. Comparison of thraustochytrids *Aurantiochytrium* sp., *Schizochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp., and *Ulkenia* sp. for production of biodiesel,

long-chain omega-3 oils, and exopolysaccharide / K.J. Lee Chang, C.M. Nichols, S.I. Blackburn, G.A. Dunstan, A. Koutoulis, P.D. Nichols // *Mar. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 16.

71. Paz A. Valorization of exhausted olive pomace for the production of omega-3 fatty acids by *Cryptocodinium cohnii* / A. Paz, A. Karnaouri, C.C. Templis, N. Papayannakos, E. Topakas // *Waste Manag.* – 2020. – Vol. 118. – P. 435-444.

72. Berman J. Nutritionally important carotenoids as consumer products / J. Berman, U. Zorrilla-López, G. Farré, C. Zhu, G. Sandmann, R. Twyman, T. Capell, P. Christou // *Phytochemistry Reviews.* – 2014. – Vol. 14. – P. 727-743.

73. El-Mekkawi S.A. Assessment of stress conditions for carotenoids accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* as added-value algal products / S.A. El-Mekkawi, H.S. Hussein, S.A. Abo El-Enin, N.N. El-Ibiari // *Bulletin of the National Research Centre.* – 2019. – Vol. 43.

74. Minhas A.K. A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids / A.K. Minhas, P. Hodgson, C.J. Barrow, A. Adholeya // *Front Microbiol.* – 2016. – Vol. 7.

75. Wang L.L. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides / L.L. Wang, E.A. Johnson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – Vol. 58. – P. 624-629.

76. Keusgen M. Sulfoquinovosyl diacylglycerols from the alga *Heterosigma carterae* / M. Keusgen, J.M. Curtis, P. Thibault, J.A. Walter, A. Windust, S.W. Ayer // *Lipids.* – 1997. – Vol. 32. – P. 1101-1112.

77. Kurihara H. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and inhibition of insoluble glucan production by free fatty acids obtained from dried *Gloiopeltis furcata* / H. Kurihara, Y. Goto, M. Aida, M. Hosokawa, K. Takahashi // *Fish. Sci.* – 1999. – Vol. 65. – P. 129-132.

78. Won, S.-R.; Hong, M.-J.; Kim, Y.-M.; Li, C.Y.; Kim, J.-W.; Rhee, H.-I. Oleic acid: An efficient inhibitor of glucosyltransferase / S.-R. Won, M.-J. Hong, Y.-M. Kim, C.Y. Li, J.-W. Kim, H.-I. Rhee // *FEBS Lett.* – 2007. – Vol. 581. – P. 4999-5002.

79. Zhou X. The transcriptome response of the ruminal methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* strain M1 to the inhibitor lauric acid / X. Zhou, M.J. Stevens, S. Neuenschwander, A. Schwarm, M. Kreuzer, A. Bratus-Neuenschwander, J.O. Zeitz // BMC Res. Notes. – 2018. – Vol. 11.

80. Chamberlain N.R. Correlation of carotenoid production, decreased membrane fluidity, and resistance to oleic acid killing in *Staphylococcus aureus* 18Z / N.R. Chamberlain, B. Mehrrens, Z. Xiong, F. Kapral, J. Boardman, J. Rearick // Infect. Immun. – 1991. – Vol. 59. – P. 4332-4337.

81. Greenway D. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus* / D. Greenway, K. Dyke // Microbiology. – 1979. – Vol. 115. – P. 233-245.

82. Salton M. The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects / M. Salton // Microbiology. – 1951. – Vol. 5. – P. 391-404.

83. Hilmarsson H. Virucidal effect of lipids on visna virus, a lentivirus related to HIV / H. Hilmarsson, L. Larusson, H. Thormar // Arch. Virol. – 2006. – Vol. 151. – P. 1217-1224.

84. Pratt R. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella* / R. Pratt, T.C. Daniels, J.J. Eiler, J.B. Gunnison, W.D. Kumler, J.F. Oneto, L.A. Strait // Science. – 1944. – Vol. 99. – P. 351-352.

85. Pratt R. Studies on *Chlorella vulgaris*. X. Influence of the age of the culture on the accumulation of chlorellin / R. Pratt, J.F. Oneto, J. Pratt // American Journal of Botany. – 1945. – Vol. 32. – P. 405-408.

86. Селиванова Е.А. Антагонистическая активность новых штаммов зеленых микроводорослей / Е.А. Селиванова, М.Е. Игнатенко, Н.В. Немцева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 4. – С. 72-76.

87. Субботина Ю.М. Механизм антибактериального действия фитопланктона и высшей водной растительности на процессы самоочищения сточных вод / Ю.М. Субботина, М.И. Шопинская // Отходы, причины их

образования и перспективы использования: сборник научных трудов по материалам Международной научной экологической конференции. Краснодар. – 2019. – С. 441-445.

88. Treyvaud Amiguet V. Antibacterial properties of a glycolipid-rich extract and active principle from Nunavik collections of the macroalgae *Fucus evanescens* C. Agardh (Fucaceae) / V. Amiguet Treyvaud, L.E. Jewell, H. Mao, M. Sharma, J.B. Hudson, T. Durst, M. Allard, G. Rochefort, J.T. Arnason // *Can. J. Microbiol.* – 2011. – Vol. 57. – P. 745-749.

89. Fadhli A.A. Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura / A.A. Fadhli, S. Wahidulla, L. D'Souza // *Glycobiology.* – 2006. – Vol. 16. – P. 902-915.

90. Skřivanová E. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C₂–C₁₈ fatty acids / E. Skřivanová, M. Marounek, G. Dlouha, J. Kaňka // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 41. – P. 77-81.

91. Ward O.P. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production / O.P. Ward, A. Singh // *Process Biochemistry.* – 2005. – Vol. 40. – P. 3627-3652.

92. Señoráns M. Advanced Extraction of Lipids with DHA from *Isochrysis galbana* with Enzymatic Pre-Treatment Combined with Pressurized Liquids and Ultrasound Assisted Extractions / M. Señoráns, N. Castejón, F.J. Señoráns // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – № 14. – P. 3310-3323.

93. Santoyo S. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae / S. Santoyo, I. Rodríguez-Meizoso, A. Cifuentes, L. Jaime, G. García-Blairsy Reina, F.J. Señorans, E. Ibáñez // *LWT-Food Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 42. – P. 1213-1218.

94. Guedes A.C. Microalgal and cyanobacterial cell extracts for use as natural antibacterial additives against food pathogens / A.C. Guedes, C.R. Barbosa, H.M. Amaro, C.I. Pereira, F.X. Malcata // *Int. J. Food Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 46. – P. 862-870.

95. Ohta S. Antibiotic effect of linolenic acid from *Chlorococcum* strain HS-101 and *Dunaliella primolecta* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / S. Ohta, Y. Shiomi, A. Kawashima, O. Aozasa, T. Nakao, T. Nagate, K. Kitamura, H. Miyata // *J. Appl. Phycol.* – 1995. – Vol. 7. – P. 121-127.

96. Desbois A.P. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum* / A.P. Desbois, T. Lebl, L. Yan, V.J. Smith // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 81. – P. 755-764.

97. Davoodbasha B. Microbial pathogenesis an evidence of C16 fatty acid methyl esters extracted from microalgae for effective antimicrobial and antioxidant property / B. Davoodbasha, T. Edachery, S. Lee Nooruddin // *Microbial Pathogenesis.* – 2018 – Vol. 115. – P. 233-238.

98. Dolganyuk V. Study of the Physicochemical and Biological Properties of the Lipid Complex of Marine Microalgae Isolated from the Coastal Areas of the Eastern Water Area of the Baltic Sea / V. Dolganyuk, A. Andreeva, S. Sukhikh, E. Kashirskikh, A. Prosekov, S. Ivanova, P. Michaud, O. Babich // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27. – P. 58-71.

99. Chauhan A. In vitro antibacterial evaluation of *Anabaena* sp. against several clinically significant microflora and HPTLC analysis of its active crude extracts / A. Chauhan, G. Chauhan, P. Gupta, P. Goyal, P. Kaushik // *Indian Journal of Pharmacology.* – 2010. – Vol. 42. – № 2. – P. 105-107.

100. Zhou J. Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches / J. Zhou, M. Wang, J. A. Saraiva, et al. // *Food Chemistry.* – 2022. – Vol. 384.

101. Parveez Ahamed, A.A. In vitro antibacterial activity of MGDG-palmitoyl from *Oscillatoria acuminata* NTAPC05 against extended-spectrum β -lactamase producers / A.A. Parveez Ahamed, M.U. Rasheed, K. Peer Muhamed Noorani, N. Reehana, S. Santhoshkumar, Y.M. Mohamed Imran, N.S. Alharbi, C. Arunachalam, S.A. Alharbi, M.A. Akbarsha // *J. Antibiot.* – 2017. – Vol. 70. – P. 754-762.

102. Dvoretzky D. Experimental research into the antibiotic properties of *Chlorella vulgaris* algal exometabolites / D. Dvoretzky, S. Dvoretzky, M. Temnov, I. Markin, E. Akulinin, O. Golubyatnikov, Y. Ustinskaya, M. Eskova // *Chemical engineering transactions*. – 2019. – C. 1429-1434.

103. Okechukwu Q. Enzymatic extraction of growth factor in *Chlorella* and possible protective effects of *Chlorella* extracts on yeast growth / Q. Okechukwu, I. Yama, E. Kovaleva // *AIP Conference Proceedings*. – 2020. – Vol. 2280. – № 1. – P. 24-36.

104. Zhuang X. A comparison on the preparation of hot water extracts from *Chlorella pyrenoidosa* (CPEs) and radical scavenging and macrophage activation effects of CPEs / X. Zhuang, D. Zhang, W. Qin, J. Deng, H. Shan, L. Tao, Y. Li, // *Food and Function*. – 2014. – Vol. 5. – № 12. – P. 3252-3260.

105. Jung E. H. AMPK activation by liquiritigenin inhibited oxidative hepatic injury and mitochondrial dysfunction induced by nutrition deprivation as mediated with induction of farnesoid X receptor / E. H. Jung, J.-H. Lee, S. C. Kim, Y.W. Kim // *European Journal of Nutrition*. – 2017. – Vol. 56. – P. 635-647.

106. Song S.-H. Effect of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* on proliferation of IEC-6 / S.-H. Song, I.-H. Kim, T.-J. Nam // *International Journal of Molecular Medicine*. 2012. – Vol. – 29. – № 5. – P. 741-746.

107. Proud C.G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery / C.G. Proud // *Biochem. J.* – 2007. – Vol. 403. – P. 217-234.

108. Chevallier V. Oxidative stress-alleviating strategies to improve recombinant protein production in CHO cells / V. Chevallier, M. R. Andersen, L. Malphettes // *Biotechnol. Bioeng.* – 2019. – Vol. 117. – P. 1172-1186.

109. Safafar H. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater / H. Safafar, J. Van Wagenen, P. Møller, C. Jacobsen // *Mar. Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – P. 7339-7356.

110. Diaz-Vivancos P. Glutathione–linking cell proliferation to oxidative stress / P. Diaz-Vivancos, A. de Simone, G. Kiddle, C.H. Foyer // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – Vol. 89. – P. 1154-1164.
111. Jung E.H. AMPK activation by liquiritigenin inhibited oxidative hepatic injury and mitochondrial dysfunction induced by nutrition deprivation as mediated with induction of farnesoid X receptor / E.H. Jung, J.-H. Lee, S.C. Kim, Y.W. Kim // *Eur. J. Nutr.* – 2017. – Vol. 56. – P. 635-647.
112. Ng J.Y. *Chlorella vulgaris* Extract as a Serum Replacement That Enhances Mammalian Cell Growth and Protein Expression / J.Y. Ng , M.L. Chua, C. Zhang , S. Hong , Y. Kumar , R. Gokhale, P.L. Rachel Ee // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 8.
113. Becker E.W. Microalgae as a source of protein / E.W. Becker // *Biotechnol Advances.* – 2007. – P. 207-210.
114. Drira N. Fatty acids from high rate algal pond's microalgal biomass and osmotic stress effects / N. Drira, N. Dhouibi, S. Hammami, A. Piras, A. Rosa, S. Porcedda, H. Dhaouadi // *Bioresour. Technol.* – 2017. – V. 244. – P. 860-864.
115. Krzemińska I. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities / I. Krzemińska, A. Piasecka, A. Nosalewicz, D. Simionato, J. Wawrzykowski // *Bioresour. Technol.* – 2015. – V. 196. – P. 72-77.
116. Koller M. Microalgae as versatile cellular factories for valued products / M. Koller, A. Muhr, G. Braunegg // *Algal Research.* – 2014. – Vol. 6. – P. 52-63.
117. Семеновко В.Е. К вопросу о выращивании Культуры *Chlorella pyrenoidosa* в условиях освещения импульсным светом / В.Е. Семеновко, М.Г. Владимирова, М.А. Попова // *Физиология растений.* – 1960. – Т. 7, вып. 4. – С. 459-465.
118. Dvoretzky D. Research into the influence of cultivation conditions on the fatty acid composition of lipids of *Chlorella vulgaris* microalgae / D. Dvoretzky, S. Dvoretzky, M. Temnov, E. Akulinin, I. Markin, Y. Ustinskaya, M. Yeskova, K. Meronyuk // *Chemical Engineering Transactions* – 2020. – Vol. 79. – P. 31-36.

119. Roy U.K. Production of Metabolites in Microalgae Under Alkali Halophilic Growth Medium Using a Dissolved Inorganic Carbon Source / U.K. Roy, J. Wagner, T. Radu // Waste Biomass Valor. – 2023.

120. Zhu C. A recycling culture of *Neochloris oleoabundans* in a bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system with harvesting by auto-flocculation / C. Zhu, R. Zhang, L. Cheng, Z. Chi, // Biotechnol. Biofuels. – 2018. – Vol. 11. – P. 1-11.

121. Shen X.-F. Biosynthesis of high yield fatty acids from *Chlorella vulgaris* NIES-227 under nitrogen starvation stress during heterotrophic cultivation / X.-F. Shen, F.-F. Chu, P.K.S. Lam, R.J. Zeng // Water Res. – 2015. – Vol. 81. – P. 294-300.

122. Shen X.-F. Enhancement of FAME productivity of *Scenedesmus obliquus* by combining nitrogen deficiency with sufficient phosphorus supply in heterotrophic cultivation / X.-F. Shen, J.-J. Liu, F.-F. Chu, P.K.S. Lam, R.J. Zeng // Appl. Energy. – 2015. – Vol. 158. – P. 348-354.

123. Singhasuwan S. Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production / S. Singhasuwan, W. Choorit, S. Sirisansaneeyakul, N. Kokkaew, Y. Chisti // J. Biotechnol. – 2015. – Vol. 216. – P. 169-177.

124. Russo G.L. Techno-economic assessment of DHA-rich *Aurantiochytrium* sp. production using food industry by-products and waste streams as alternative growth media / G.L. Russo, A.L. Langellotti, R. Sacchi, P. Masi // Bioresour. Technol. Rep. – 2022. – Vol. 18.

125. Sim S.J. Split mixotrophy: A novel cultivation strategy to enhance the mixotrophic biomass and lipid yields of *Chlorella protothecoides* / S.J. Sim, J. Joun, M.E. Hong, A.K. Patel // Bioresour. Technol. – 2019. – Vol. 291.

126. Nguyen M.A. A review on microalgae and cyanobacteria in biofuel production / M.A. Nguyen, A.L. Hoang // Economics and Finance. 2016. <https://hal-enpc.archives-ouvertes.fr/hal-01383026/document>.

127. Семеновко В.Е. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / В.Е. Семеновко // М.: ИФР, 1991. – 227 с.

128. Абдуллин Ш.Р. Миксотрофия цианобактерий и водорослей в условиях пещер / Ш.Р. Абдуллин, В.Б. Багмет // Журнал общей биологии. – 2016. – Vol. 77. – № 1. – P. 54-62.
129. Harke M.J. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium / M.J. Harke, M.M. Steffen, C.J. Gobler, T.G. Otten, S.W. Wilhelm, S.A. Wood, H.W. Paerl // *Microcystis spp. Harmful Algae*. – 2016. – Vol. 54. – P. 4-20.
130. Wu X. Effect of urea on growth and microcystins production of *Microcystis aeruginosa* / X. Wu, Y. Yan, P. Wang, L. Ni, J. Gao, R. Dai // *Bioresour Technol.* – 2015. – Vol. 181. – P. 72-77.
131. Kazbar A. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors / A. Kazbar, G. Cogne, B. Urbain, H. Marec, B. Le-Gouic, J. Tallec, H. Takache, A. Ismail, J. Pruvost // *Algal Research*. – 2019. – Vol. 39.
132. Lee Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. / Y. K. Lee // *Journal of applied phycology*. – 2001. – Vol. 13(4). – P. 307–315.
133. Benemann, J.R. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of carbon dioxide to biomass / J. R. Benemann, W. J. Oswald // *Pittsb. Energy Technol. Center*. – 1996.
134. Mass production of microalgae: photobioreactors / M. R. Tredici et al. // *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. – 2004. – Ch. 9. – P. 178-214.
135. Vasumathi K. K. Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae / K. K. Vasumathi, M. Premalatha, P. Subramanian // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2012. – Vol. 16. – №. 7. – C. 5443-5450.
136. Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics / S. K. Wang, et al. // *Engineering in Life Sciences*. – 2014. – Vol. 14. – №. 6. – P. 550-559.

137. Chanquia S.N. Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives / S.N. Chanquia, G. Vernet, S. Kara // *Engineering in Life Sciences*. – 2021. – P. 1-11.

138. Borella L. Effect of residence time in continuous photobioreactor on mass and energy balance of microalgal protein production / L. Borella, E. Sforza, A. Bertucco // *New Biotechnology*. – 2021. – Vol.64. – P. 46-53.

139. Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: a review / H. Ting, L. Haifeng, M. Shanshan, et al. // *Int. J. Agric. & Biol. Eng.* – 2017. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-29.

140. Цоглин Л. Н. Потенциальная продуктивность микроводорослей в промышленных фотобиореакторах / Л.Н. Цоглин, Б. В. Габель, Т. Н. Фалькович и др. – М.: Физиология растений. – 2000. – Т. 47. – № 5. – С. 761–767.

141. Growth comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion piggery effluent / E. G. Nwoba, et al. // *Algal Research*. – 2016.– Vol. 17. – P. 268–276.

142. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways / E. Posadas, et al. // *Chemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 265. – P. 239–248.

143. Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: Prediction from a batch experiment / J. Ruiz, et al // *Bioresour. Technol.* – 2013. – Vol. 127. – P. 456-463.

144. Cultivation of *Chlorella protothecoides* with urban wastewater in continuous photobioreactor: biomass productivity and nutrient removal / E.A.R. Tercero, et al. // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 172. – № 3. – P. 1470 – 1485.

145. Biodiesel production from algae cultivated in winter with artificial wastewater through pH regulation by acetic acid / L. Zhu, et al // *Applied Energy*. – 2014. – Vol. 128. – P. 103-110.

146. Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent / A. Ruiz-Martinez, et al. // *Bioresour. Technol.* – 2012. – Vol. 126. – P. 247-253.

147. Tan, X. *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch processing wastewater in an airlift circulation photobioreactor / X. Tan, H. Chu, Y. Zhang // *Bioresour Technol.* – 2014. – Vol. 170. – 538-548.

148. Arbib, Z. Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater / Z. Arbib, J. Ruiz, P. Alvarez-Diaz // *Ecological Engineering.* – 2013. – Vol. 52. – P. 143-153.

149. Phycoremediation of alcohol distillery wastewater with a novel *Chlorella sorokiniana* strain cultivated in a photobioreactor monitored on-line via chlorophyll fluorescence / A. Solovchenko, et al. // *Algal Research.* – 2014. – Vol. 6. – P. 234-241.

150. Boonchai, R. Microalgae membrane photobioreactor for further removal of nitrogen and phosphorus from secondary sewage effluent / R. Boonchai, G. Seo // *Korean Journal of Chemical Engineering.* – 2015. – Vol. 32. – № 10. – P. 2047-2052.

151. Biomass and bioenergy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium / S. Chinnasamy, et al. // *Bioresour. Technol.* – 2010. – Vol. 101. – № 17 – P. 6751-6760.

152. Marin, A. R. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater / A. R. Marin, L. G. Mendoza-Espinosa, T. Stephenson // *Bioresour. Technol.* – 2010. – Vol. 101. – № 1. – P. 58-64.

153. Dixon C., Wilken L.R. Green microalgae biomolecule separations and recovery / C. Dixon, L.R. Wilken // *Bioresour. Bioprocess.* – 2018. – Vol. 5.

154. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. / S. Lee, et al. // *Bioresource Technology.* – 2017. – Vol. 244. – № 2.

155. Baudelet P.-H. New Insight into Cell Walls of Chlorophyta / P.-H. Baudelet, G. Ricochon, M. Muniglia Linder // *Algal Research.* – 2017. – Vol. 25. P. 333.

156. Cronmiller E. Cell wall integrity signaling regulates cell wall-related gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* / E. Cronmiller, D. Toor, N. Chun Shao, T. Kariyawasam, M.H. Wang, J.-H. Lee // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – № 1.
157. Jegathese S.J.P. Microalgae as a Renewable Source of Energy: A Niche Opportunity / S.J.P. Jegathese, M. Farid // *J. Renew Energy.* – 2014. – P. 1.
158. Lardon L. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae / L. Lardon, A. Helias, B. Sialve, J.P. Steyer, O. Bernard // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol. 43. – P. 6475.
159. Lee, A. K. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // *Bio. Bioenergy.* – 2012. – V. 46. – P. 89-101.
160. Viner K. Comparison of cell disruption techniques prior to lipid extraction from *Scenedesmus* sp. slurries for biodiesel production using liquid CO₂ / K. Viner, P. Champagne, P. G. Jessop // *Green Chemistry* – 2018. – Vol. 20. – P. 4330- 4338.
161. González-Delgado, A. D. Microalgae based biorefinery: Evaluation of oil extraction methods in terms of efficiency, costs, toxicity and energy in lab-scale / A.D. González-Delgado, V. Kafarov // *Rev. Ion* – 2013. – Vol. 26. – P. 29-37.
162. Bernaerts T. Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization / T. Bernaerts, L. Gheysen, I. Foubert, M. E. Hendrickx, Ann M. Van Loey // *Algal Research* – 2019. – Vol. 42.
163. Elain A. Green extraction of polysaccharides from *Arthrospira platensis* using high pressure homogenization / A. Elain; C. Nkounkou; M. Le Fellic; K. Donnart // *Journal of Applied Phycology* – 2020. – Vol. 32. – P. 1719-1727.
164. Lee Jae-Y. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae / Jae-Y. Lee, C. Yoo, So-Y. Jun, Chi-Y. Ahn, Hee-M. Oh // *Bioresource Technology* – 2010. – Vol. 101. – P. 75-77.
165. Adam F. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process / F. Adam, M. Abert Vian, G. Peltier, F. Chemat // *Bioresource Technology* – 2012. – Vol. 114. – P. 457-465.

166. Lam G.P. Pulsed Electric Field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans* / . G.P. 't Lam, P.R. Postma, D.A. Fernandes, R.A.H. Timmermans, M.H. Vermuë, M.J. Barbosa, M.H.M. Eppink, R.H. Wijffels, G. Olivieri // *Algal Research* – 2017. – Vol. 24. – P. 181-187.

167. Günerken E., Dhondt E., Eppink M., Garcia-Gonzalez L., Elst K., Wijffels R.H. Cell disruption for microalgae biorefineries // *Biotechnol. Adv.* V. 33. P. 243.

168. Roux J-M., Lamotte H. An Overview of Microalgae Lipid Extraction in a Biorefinery Framework // *Energy Procedia*. – 2017. – Vol. 112. – P. 680.

169. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review / T. Dong, et al. // *Appl. Energy*. – 2016. – Vol. 177. – P. 879.

170. Show K.Y., Lee D.J., Tay J.H., Lee T.M., Chang J.S. Microalgal drying and cell disruption—recent advances // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 184. P. 258.

171. ПАТЕНТ № 10465159 СИИА, МИК C12M 1/00, C12N 1/06. Optimised method for breaking chlorella walls by mechanical crushing: № 051704: заявл. 04.07.2013: опубл. 03.07.2014 / Toursel B., Delannoy F., Patinier S. – 14 с.

172. Drira N. Fatty acids from high rate algal pond's microalgal biomass and osmotic stress effects / N. Drira, N. Dhouibi, S. Hammami, A. Piras, A. Rosa, S. Porcedda, H. Dhaouadi // *Bioresour. Technol.* – 2017. – Vol. 244. – P. 860-864.

173. Kim J. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae / J. Kim, G. Yoo, H. Lee, J. Lim, K. Kim, C.W. Kim, M.S. Park, J.W. Yang // *Biotechnology Advances*. – 2013. – Vol. 31. – P. 862.

174. Lenneman E.M. Potential application of algicidal bacteria for improved lipid recovery with specific algae / E.M. Lenneman, P. Wang, B.M. Barney // *FEMS Microbol Lett.* – 2014. – Vol. 354. – P. 102.

175. Demuez M. Algicidal microorganisms and secreted algicides: New tools to induce microalgal cell disruption / M. Demuez, C. González-Fernández, M. Ballesteros // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – Vol. 33. – P. 1615.

176. Huang Wen-C. Cationic surfactant-based method for simultaneous harvesting and cell disruption of a microalgal biomass / Wen-C. Huang; Jong-D. Kim // *Bioresource Technology*– 2013. – Vol. 149. – P. 579-581.

177. Wang M. Algal cell lysis by bacteria: A review and comparison to conventional methods. / M. Wang, S. Chen, W. Zhou, W. Yuan, D. Wang // *Algal Research* – 2020. – Vol. 46.

178. Zhang Y. Optimization of enzymatic hydrolysis for effective lipid extraction from microalgae *Scenedesmus* sp. / Y. Zhang, X. Kong, Z. Wang, Y. Sun, S. Zhu, L. Li, P. Lv // *Renewable Energy* – 2018. – Vol. 125. – P. 1049-1057.

179. Dvoretzky D. The Study of the Lipid Extraction Process for the Production of Third-generation Biofuel from the Pre-treated Microalgae *Chlorella Vulgaris* Biomass / D. Dvoretzky, S. Dvoretzky, M. Temnov, E. Tugolukov, E. Akulinin, O. Golubyatnikov, Y. Ustinskaya, M. Eskova // *Chemical Engineering Transactions*. – 2019. – Vol. 74. – P. 73-78.

180. 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*. – 2013. – Vol. 1, № 10.

181. Fajardo A.R. Lipid extraction from the microalga *Phaedactylum tricornutum* / A.R. Fajardo, L.E. Cerdan, A.R. Medina, F.G.A. Fernandez, P.A.G. Moreno, E.M. Grima // *European Journal of Lipid Science Technology*. – 2007. – Vol. 109. – P. 120-126.

182. Ryckebosch E. Influence of extraction solvent system on extractability of lipid components from different microalgae species / E. Ryckebosch, C. Bruneel, R. Termote-Verhalle, K. Muylaert, I. Foubert // *Algal Research*. – 2014. – Vol. 3. – P. 36-43.

183. Уилсон К. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / ред. К. Уилсон, Дж. Уолкер. – пер. с англ. – 5-е изд. – М.: Лаборатория знаний, 2022. – 848 с.

184. Зверев В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Зверев В.В., Бойченко М.Н. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2021. – Т.1. – 448 с.
185. Булыгина Е.С. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий / Е.С. Булыгина, Б.Б. Кузнецов, А.И. Марусина, И.К. Кравченко, С.А. Быкова, Т.В. Колганова, В.Ф. Гальченко // Микробиология. – 2002. – Т. 71. – №4. – С. 500-508.
186. Lane D.J. 16S/23S sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (Eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 1991. – P. 115-175.
187. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1977. – Vol. 74. – №12. – P. 5463-5467.
188. Владимирова М.Г. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР / М.Г. Владимирова и др. – Рос. акад. наук, Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева. – Москва: ИФР, 1991. – 227 с.
189. Stanier R.Y. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) / R.Y. Stanier, R. Kunisawa, M. Mandel, G. Cohen-Bazire // Bacteriol. Rev. – 1971. – Vol. – 35. – P. 171-205.
190. Пиневиц Г.Д. Изучение *Spirulina platensis* – нового объекта высокоинтенсивного культивирования / Г.Д. Пиневиц, Н.Н. Верзилин, А.А. Михайлов // Физиология растений. – 1970. – Т. 17. – Вып. 5. – С. 1037-1046.
191. Каталог коллекции культур микроводорослей IPPAS (ИФР РАН им. К.А. Тимирязева). <http://cellreg.org/catalog/>.
192. Tamiya H. Mass culture of algae / H. Tamiya // Ann Rev Plant Physiol. – 1957. – Vol.8. – P. 309-334.
193. Dvoretzky D.S. Optimization of the process of cultivation of microalgae *Chlorella Vulgaris* biomass with high lipid content / D.S. Dvoretzky, S.I. Dvoretzky, E.V. Peshkova, M.S. Temnov // Chemical Engineering Transactions. – 2015. – Vol.43. – P. 361-366.

194. Temnov M.S. Analysing the influence of cultivation conditions on the activity of metabolic pathways of bcaa biosynthesis in *Chlorella vulgaris* microalgae / M.S. Temnov, Y.V. Ustinskaya, M.A. Eskova, K.I. Meronyuk, O.O. Golubyatnikov, S.I. Dvoretzky, D.S. Dvoretzky // Chem. Eng. Transact. – 2021. – Vol. 86. – P. 169-174.

195. Androutsopoulou C. Antibacterial Activity against Four Fish Pathogenic Bacteria of Twelve Microalgae Species Isolated from Lagoons in Western Greece / C. Androutsopoulou, P. Makridis // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11. – №. 6. – P. 1396.

196. Kirhner Ju. Thin-layer chromatography / Ju. Kirhner. – Moscow. Mir Publ., 1981. – 616 p.

197. Владимирова М.Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей [Текст]: (Инструкция по первичным испытаниям, выделяемых из природы и селекционируемых форм фотоавтотрофных одноклеточных водорослей) / М. Г. Владимирова, В. Е. Семененко. – Акад. наук СССР. Ин-т физиологии растений им. К. А. Тимирязева. – Москва: [Изд-во] Акад. наук СССР, 1962. – 59 с.

198. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С., Горнова И.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии / Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, И.Б. Горнова. – М.: Дели принт., 2004. – 144 с.

199. Устинская Я.В. Экспериментальное исследование белковой продуктивности клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* / Я.В. Устинская, М.А. Еськова, К.И. Меронюк, Н.А. Кокорев, А.А. Коломоец, М.С. Темнов // Пищевые технологии и биотехнологии: материалы XVII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвящённой году науки и технологий в Российской Федерации: в 3 частях. – Казань: Изд-во КНИТУ, 2021. - С. 493-497.

200. Темнов М.С. Сравнительный анализ методов дезинтеграции клеток *Chlorella sorokiniana*, повышающих эффективность экстракции внутриклеточных водорастворимых белков / М.С. Темнов, Я.В. Устинская, М.А. Еськова, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий // Изв. вузов. Химия и хим. технология. – 2022. – Т. 65. – Вып. 4. – С. 79-86.

201. Krishnaveni S. Sugar distribution in sweet stalk sorghum / S. Krishnaveni, T. Balasubramanian, S. Sadasivam, // *Food Chemistry*. – 1984. – Vol. 15 . – № 3. – P. 229-232.
202. Araujo Glacio S. 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.
203. Tejano L.A. Bioactivities of enzymatic protein hydrolysates derived from *Chlorella sorokiniana* / L.A. Tejano, J.P. Peralta, E.E.S. Yap, Yu-W. Chang // *Food Science and Nutrition*. – 2019. – Vol. 7. – № 7. – P. 2381-2390.
204. Pandey A. Pretreatment of biomass: processes and technologies / A. Pandey, S. Negi, P. Binod, C. Larroche. – Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2014.
205. Досон Р. Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
206. Денситометр Сорбфил. Версия 2.0: Руководство пользователя . - г. Краснодар: ООО Имид, 2013. – 19 с.
207. Дворецкий Д.С. Оценка возможности комплексного использования сточных вод для биосинтеза липидов и молочной кислоты / Д.С. Дворецкий, М.С. Темнов, И.В. Маркин, А.И. Бушковская, Я.В. Устинская, Р.Д. Санталов, М.А. Еськова // *Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского*. – 2017. – Т. 3. – № 65. – С. 9-16.
208. Меледина Т.В. Математические методы планирования экспериментов в биотехнологии: Учеб. Пособие / Т.В. Меледина, М.М. Данина. – СПб.: СПбГУНиПТ, 2005. – 101 с.
209. Gerken H.G. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production / H.G. Gerken, B.S. Donohoe, E.P. Knoshaug // *Planta*. – 2012. – Vol. 237. – № 1. – P. 239-253.
210. Zheng H. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic

lysis, and microwaves / H. Zheng, J. Yin, Z. Gao, H. Huang, X. Ji., C. Dou // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2011. – Vol. 164. – № 7. – P. 1215-1224.

211. Taylor D.J. Biological Science 1&2 / D.J. Taylor, N.P. Green, G.W. Stout, R. Soper. – Cambridge, England: Cambridge University Press, 1997.

212. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров. – Москва: Наука, 2004. – 528 с.

213. Rubin A.B. Compendium of Biophysics / A.B. Rubin. – Wiley-Scrivener, 2017. – 660 p.

214. Bonev B. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method / B. Bonev, J. Hooper, J. Parisot // J Antimicrob Chemother. – 2008. – Vol. 61. – № 6. – P. 1295-301.

215. Rai R. Regulation of antioxidant defense and glyoxalase systems in cyanobacteria / R. Rai, S. Singh, K.K. Rai, A. Raj, S. Sriwastaw, L.C. Rai.// Plant Physiology and Biochemistry. – 2021. – Vol. 168. – P. 353-372.

216. Dymond J.S. *Saccharomyces cerevisiae* growth media / J. S. Dymond // Methods in Enzymology. – 2013. – Vol. 533. – P. 191-204.

217. ГОСТ 23327-98. Межгосударственный стандарт. Молоко и молочные продукты. Метод измерения массовой доли общего азота по Кьельдалю и определение массовой доли белка. – Москва: Стандартинформ, – 2009.

218. ГОСТ 20680-2002. Межгосударственный стандарт. Аппараты с механическим перемешивающими устройствами. Общие технические условия. – Межгосудаственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. Минск. ИПК Издательство стандартов, 2002.

219. ГОСТ 9931-85. Государственный стандарт союза ССР. Корпуса цилиндрические стальных сварных сосудов и аппаратов. Типы, основные параметры и размеры. Государственный комитет СССР по стандартам. Москва. Издательство стандартов, 1988.

ПРИЛОЖЕНИЕ. Свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО
о государственной регистрации программы для ЭВМ
№ 2020662770

«Расчет концентрации клеток микроводорослей в суспензии»

Правообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный технический университет» (RU)*

Авторы: *Темнов Михаил Сергеевич (RU), Дворецкий Дмитрий Станиславович (RU), Дворецкий Станислав Иванович (RU), Акулинин Евгений Игоревич (RU), Голубятников Олег Олегович (RU), Маркин Илья Владимирович (RU), Устинская Яна Витальевна (RU), Еськова Мария Александровна (RU)*

Заявка № **2020619842**
Дата поступления **31 августа 2020 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре программ для ЭВМ **19 октября 2020 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 **Г.П. Ивлиев**



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**RU2021660334**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ПРОГРАММЫ ДЛЯ ЭВМ

Номер регистрации (свидетельства):
2021660334
Дата регистрации: 24.06.2021
Номер и дата поступления заявки:
2021619573 16.06.2021
Дата публикации и номер бюллетеня:
24.06.2021 Бюл. № 7
Контактные реквизиты:
нет

Автор(ы):
Темнов Михаил Сергеевич (RU),
Дворецкий Дмитрий Станиславович (RU),
Дворецкий Станислав Иванович (RU),
Акулинин Евгений Игоревич (RU),
Голубятников Олег Олегович (RU),
Устинская Яна Витальевна (RU),
Еськова Мария Александровна (RU)
Правообладатель(и):
федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Тамбовский государственный
технический университет» (RU)

Название программы для ЭВМ:

Расчет кинетики метаболических путей глутамина и триацилглицеринов в клетке микроводорослей

Реферат:

Программа предназначена для решения задач математического моделирования, численных исследований процесса периодического и непрерывного культивирования микроводорослей. Областью применения программы являются процессы культивирования клеток микроводорослей, протекающие в фотобиореакторах при различных условиях, влияющих на активность метаболических путей биосинтеза глутамина и триацилглицеринов. Программа представляет собой комплекс специальных программ, позволяющих рассчитать концентрацию клеток микроводорослей в суспензии. Тип ЭВМ: IBM PC-совмест. ПК; ОС: Windows XP/7/8.

Язык программирования: MatLabR2011b

Объем программы для ЭВМ: 38 КБ