

УДК 636.086.783

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА КАЧЕСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ *CHLORELLA VULGARIS**

© А.А. Богданова^{1**}, Е.А. Флёрова^{1, 2}, А.А. Паюта¹

¹ Ярославский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр кормопроизводства и агроэкологии имени В. Р. Вильямса», ул. Ленина, 1, пос. Михайловский, Ярославская обл., 150517 (Россия)

² Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова, ул. Советская, 14, Ярославль, 150003 (Россия)

Исследовано комплексное влияние двух факторов (оптимального соотношения питательных веществ среды и электростатического поля) на качественные и количественные показатели *Chlorella vulgaris*. Показано, что применение среды с оптимальными концентрациями минеральных веществ и электростатического поля с напряжением 15 кВ и временем воздействия 72 ч положительно влияют на ростовые показатели, размер клеток микроводоросли и их жизнеспособность, способствует получению культуры с плотностью 50 млн кл./мл на 18 ч быстрее в сравнении с культивированием по общепринятым методикам. Установлено, что при воздействии двух изучаемых факторов на клетки *Chlorella* мутагенный эффект не наблюдается. Анализ культуры микроводоросли, выращенной при воздействии исследуемых факторов, показал, что ее химический состав соответствовал и по ряду показателей превосходил таковой при культивировании хлореллы по классическим технологиям. Выявлено, что показатели активности каталазы и супероксиддисмутазы микроводоросли, выращенной в оптимальных условиях питательной среды и электростатического поля, достоверно превышали аналогичные значения *C. vulgaris*, не подвергавшейся стимулированию электростатическим полем. Показана большая активность исследуемых ферментов в клетках хлореллы по сравнению с высшими растениями – компонентами биоантиоксидантных препаратов, такими как *Amaranthus paniculatus* L. и *Nicotiana tabacum* L. По результатам токсикологического исследования установлено отсутствие содержания в *Chlorella* основных отравляющих организм животных и человека веществ (ртуть, мышьяк). В результате проведенных исследований предложено использование установленных оптимальных параметров обеих факторов в культивировании *C. vulgaris*.

Ключевые слова: микроводоросль, питательная среда, электростатическое поле, биохимический состав, биотехнология.

Введение

Микроводоросли являются уникальными микроскопическими одноклеточными организмами с широким спектром физиологических и биохимических характеристик, которые посредством фотосинтеза способны превращать солнечную энергию в химическую. Они обладают большим потенциалом и могут использоваться для производства широкого спектра метаболитов, таких как белки, липиды, углеводы, каротиноиды или витамины, кроме того, в качестве пищевых и кормовых добавок, в косметической промышленности и для производства биотоплива. В настоящее время биотехнология микроводорослей активно развивается, так как эти одноклеточные мик-

Богданова Алена Андреевна – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела технологий животноводства, e-mail: bogdanova.ale@gmail.com

Флёрова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела технологий животноводства, профессор кафедры физиологии человека и животных, e-mail: katarinum@mail.ru

Паюта Александра Александровна – научный сотрудник отдела технологий животноводства, e-mail: a.payuta@mail.ru

ким спектром физиологических и биохимических характеристик, которые посредством фотосинтеза способны превращать солнечную энергию в химическую. Они обладают большим потенциалом и могут использоваться для производства широкого спектра метаболитов, таких как белки, липиды, углеводы, каротиноиды или витамины, кроме того, в качестве пищевых и кормовых добавок, в косметической промышленности и для производства биотоплива. В настоящее время биотехнология микроводорослей активно развивается, так как эти одноклеточные мик-

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprtm.2019045130s

** Автор, с которым следует вести переписку.

роорганизмы имеют большую продуктивность биомассы и высокие темпы роста [1–4]. Одной из таких микроводорослей, используемых в качестве объекта массового культивирования, является *Chlorella vulgaris*, так как, по данным ряда исследователей, она обладает большой биологической ценностью и содержит до 60% белка с набором всех незаменимых аминокислот, до 8% липидов, представленных преимущественно ненасыщенными жирными кислотами, является ценным источником многих биологически активных веществ [5–8].

Для ее культивирования в настоящее время используются открытые и закрытые системы [9, 10]. Открытые системы, представляющие собой пруды, естественные водоемы или бассейны, позволяют получать большую биомассу микроводорослей, но их использование ограничено в силу природных факторов, отсутствия регулируемых условий выращивания, а также невозможности выращивать культуру микроводорослей высокого качества в результате большого риска ее заражения микроорганизмами или попадания различных примесей извне. Закрытые системы или фотобиореакторы позволяют решить данные проблемы. Их производительность также высока и зависит от конструктивных особенностей и создания оптимальных условий культивации [5, 11, 12]. Поэтому в настоящее время исследования в области производства микроводорослей, в том числе и *C. vulgaris*, направлены в первую очередь на создание таких условий их культивирования, которые позволяют ускорить процесс получения биомассы культуры с высокими качественными характеристиками.

Установлено, что качественные и количественные характеристики микроводорослей напрямую зависят от компонентов питательной среды и их оптимально подобранных концентраций, что оказывает непосредственное влияние на процесс фотосинтеза и интенсивность метаболизма [5, 13]. При этом при использовании хлореллы в кормовых или пищевых целях питательная среда должна отвечать следующим характеристикам: компоненты не должны быть токсичны для организма животных и человека, прирост биомассы микроводоросли должен осуществляться за короткий срок, а использование компонентов среды должно быть экономически целесообразно.

Известно, что электростатическое поле с определенными параметрами оказывает положительное воздействие на качественные и количественные характеристики низших растений, микроорганизмов, в том числе и *C. vulgaris* [14–16], поэтому данный фактор может быть использован при создании закрытых биореакторов для интенсификации процесса культивирования микроводорослей.

В связи с этим была выдвинута гипотеза о том, что совместное действие двух факторов (оптимального соотношения питательных веществ среды и стимулирующего действия электростатического поля) оказывает стимулирующий эффект на показатели роста хлореллы и не проявляет негативное влияние на биохимический состав хлореллы.

Поэтому цель наших исследований заключается в изучении комплексного воздействия оптимального соотношения компонентов питательной среды и наилучших параметров электростатического поля на рост и развитие, а также биохимический состав *C. vulgaris*.

Экспериментальная часть

Эксперимент №1. Определение оптимального соотношения компонентов питательной среды для культивирования хлореллы осуществляли в серии из 6 опытов, использовали 2 стеклянных биореактора с размерами 600×150×100 мм, имеющих 2 локации объемом 3 л, снабженными нагревателем с терморегулятором и помпой.

Контролем служила модифицированная среда следующего состава: макроэлементы (г/л): KNO_3 – 5.0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2.5, KH_2PO_4 – 1.25; микроэлементы (мг/л): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 10, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.04, MnSO_4 – 1.0, H_3BO_3 – 0.6, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; Трилон Б – 5 мг/л [5]. В составе опытной среды использовались те же макро- и микроэлементы, что и в контроле, при этом концентрации макроэлементов в опыте уменьшали в определенной пропорции по отношению к концентрациям макроэлементов в контроле. Для этого количество каждого макроэлемента уменьшали в два раза по сравнению с аналогичными концентрациями макроэлементов в контрольной среде, в последующих опытах количество первого макроэлемента уменьшали на 0.25 г, соблюдая соотношение к нему остальных компонентов. В одной из локаций биореактора суспензия хлореллы выращивалась на контрольной среде, в другой локации – на опытной. Длительность каждой из серии опытов составляла 72 ч. Исходные условия серий эксперимента были идентичны: водоросли находились в стадии активного роста, начальная концентрация микроводоросли составляла 28 млн кл./мл, температура выращивания – 28 °С.

Эксперимент №2 и 3. Влияние различного напряжения и времени воздействия электростатического поля на морфофизиологические показатели хлореллы определяли в серии из 9 опытов (табл. 1, эксперимент №2), использовали 6 стеклянных емкостей с размерами 80×60×70 мм и объемом 100 мл каждая, снабженные медными электродами, на которые с помощью источника постоянного тока высокого напряжения (установка АКИ-50), в течение 5 мин подавался постоянный электрический ток. Для подбора оптимальных режимов воздействия электростатического поля на процесс культивирования хлореллы изучали стимулирующее действие поля с напряжением в диапазоне от 5 до 45 кВ с шагом 5 кВ и продолжительностью воздействия 5 мин на прирост, размер и выживаемость клеток микроводоросли. Верхний и нижний пределы напряжения электростатического поля обусловлены технологическими характеристиками установки АКИ-50. Исходные условия опытов были идентичны: в каждую емкость вносили по 100 мл суспензии, выращенной на питательной среде с концентрациями минеральных веществ, установленных в эксперименте 1. Клетки хлореллы находились в стадии активного роста, начальная концентрация микроводоросли составляла 5 млн кл./мл, температура выращивания – 28 °С. Контролем служила *Chlorella*, не обработанная электростатическим полем.

В тех же емкостях были проведены опыты по установлению оптимальной продолжительности воздействия электростатического поля на клетку хлореллы (табл. 1, эксперимент №3). На емкости крепились медные электроды, которые подсоединялись к установке АКИ-50. На электроды подавался постоянный электрический ток с напряжением 15 кВ в течение различной продолжительности стимулирования. Исходные условия опытов были идентичны: в каждую емкость вносили по 100 мл суспензии хлореллы, выращенной на питательной среде с концентрациями минеральных веществ, выбранных на основе ранее проведенных экспериментов, и находившейся в стадии активного роста, начальные концентрации микроводоросли – 21.5 млн кл./мл, температура выращивания – 28 °С. Контролем служила хлорелла, не обработанная электростатическим полем.

В качестве источника освещения во всех экспериментах использовали фотолюминесцентные лампы. Длительность каждого эксперимента составляла 72 ч. Каждый опыт в эксперименте №1 проводили в 2 повторностях. На 1, 2 и 3 сут. каждого опыта отбирали среднюю пробу суспензии хлореллы для определения количества клеток в 1 мл суспензии. Каждый опыт в экспериментах №2 и №3 проводили в 3 повторностях. На 1, 2 и 3 сут. опытов отбирали среднюю пробу суспензии хлореллы для определения количества клеток в 1 мл суспензии, их размера и жизнеспособности.

Таблица 1. Условия постановки экспериментов по разработке технологии выращивания суспензии *C. vulgaris* в электростатическом поле

Опыт серии		Эксперимент №2		Эксперимент №3	
№		подбор оптимального напряжения		подбор оптимальной продолжительности	
		напряжение, кВ	продолжительность стимулирования, мин	напряжение, кВ	продолжительность стимулирования, мин
1	контроль опыт	– 5	– 5	– 15	– 1
2	контроль опыт	– 10	– 5	– 15	– 5
3	контроль опыт	– 15	– 5	– 15	– 10
4	контроль опыт	– 20	– 5	– 15	– 15
5	контроль опыт	– 25	– 5	– 15	– 30
6	контроль опыт	– 30	– 5	– 15	– 4320 (72 ч)
7	контроль опыт	– 35	– 5		
8	контроль опыт	– 40	– 5		
9	контроль опыт	– 45	– 5		

Количество клеток хлореллы в 1 мл суспензии определяли спектрофотометрическим методом.

Размеры клеток хлореллы измеряли в программе Image Tools на фотографиях, сделанных с помощью микроскопа МИКМЕД-6 при увеличении 300. Форм-фактор рассчитывали как отношение ширины к длине клетки.

Жизнеспособность хлореллы определяли, окрашивая клетки раствором метиленового синего. На микроскопе МИКМЕД-6 в камере Горяева производили подсчет общего количества клеток и мертвых клеток [17].

Оценку мутагенной активности хлореллы проводили, регистрируя пигментные и морфологические мутации на уровне макроколоний [18].

Химический анализ суспензии хлореллы предусматривал определение: сырого протеина по методу Кьельдаля; сырого жира – методом обезжиренного остатка; сырой золы – весовым методом; сырой клетчатки – методом Геннеберга-Штокмана; общей влаги – двухступенчатым методом; Са – комплексонометрическим методом; Р – фотометрическим методом, Zn, Cu и Fe – атомно-абсорбционным методом [19]. Химический анализ суспензии хлореллы проводили в средней пробе каждой из трех партий. Ферментативную активность каталазы (КАТ) и супероксиддисмутазы (СОД) хлореллы определяли в гомогенате спектрофотометрическими методами [20, 21].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программе MS Excel 2010. Для оценки параметров изучаемых признаков применяли статистические методы. Определяли среднее арифметическое значение, стандартную ошибку среднего. Для определения различий между средними значениями производили проверку статистических гипотез с использованием t-критерия Стьюдента ($P < 0.05$) после предварительной оценки нормальности распределения.

Обсуждение результатов

Разработка оптимального соотношения компонентов питательной среды. Установлено, что через 72 ч культивирования суспензии хлореллы в опытах №4 и №5 прирост клеток достоверно превышал аналогичные значения контроля. В опыте №6 статистически значимые отличия по количеству клеток хлореллы в 1 мл суспензии были получены через 24, 48 и 72 ч культивирования микроводоросли. В том числе было установлено, что после 72 ч выращивания суспензии хлореллы в опыте №6 прирост клеток составлял 62.5 млн/мл, что являлось наилучшим результатом в течение всего исследования.

Установлено, что за 72 ч культивирования суспензии хлореллы наибольшее увеличение количества клеток микроводоросли (62.5 млн/мл) в суспензии относительно контроля (53.2 млн/мл) произошло на питательной среде, содержащей следующие компоненты: макроэлементы (г/л) $\text{KNO}_3 - 1.25$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.6$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.3$; микроэлементы (мг/л): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 5.0$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 10.0$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0.02$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} - 0.01$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.04$, $\text{MnSO}_4 - 1.0$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0.6$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O} - 0.5$; Трилон Б – 5.0 мг/л.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что оптимальной питательной средой для культивирования суспензии хлореллы является среда с концентрациями минеральных веществ, которые использовали в опыте №6 (табл. 2).

Таким образом, оптимальная питательная среда для культивирования суспензии *C. vulgaris* имеет следующий состав: макроэлементы, г/л: $\text{KNO}_3 - 1.25$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.6$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 0.3$; микроэлементы, мг/л: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 5.0$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 - 10.0$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0.02$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} - 0.01$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.04$, $\text{MnSO}_4 - 1.0$, $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0.6$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O} - 0.5$, Трилон Б – 5.0.

Влияние различного напряжения электростатического поля на качественные и количественные показатели хлореллы. Выявлено, что электростатическое поле с напряжением 15 кВ оказало лучшее стимулирующее действие на прирост количества клеток хлореллы, способствовало увеличению размеров и жизнеспособности клеток (табл. 3).

Форм-фактор клеток составил 1.00 ± 0.03 , клеток с нетипичной формой для данного вида микроводорослей и повреждениями в области клеточной стенки и плазматической мембраны не выявлено. Протопласт имел привычный зеленый оттенок и характерную для этого вида клеток форму.

Влияние различного времени воздействия электростатического поля с напряжением 15 кВ на качественные и количественные показатели хлореллы. Культивирование хлореллы в электростатическом поле в течение 72 ч оказывало наибольший стимулирующий эффект на прирост клеток хлореллы, способствовало увеличению размеров и жизнеспособности клеток (табл. 4), а также позволяло получить культуру хлореллы с плотностью 50 млн кл./мл на 18 ч быстрее в сравнении с культивированием без электростатического поля.

Таблица 2. Влияние различных концентраций минеральных веществ питательной среды на прирост клеток *C. vulgaris*

Опыт серии		Прирост клеток хлореллы (млн/мл) при различной продолжительности эксперимента		
№		24 ч	48 ч	72 ч
1	контроль	37.03±0.91	46.74±0.94	53.48±0.92
	опыт	37.31±1.12	48.56±1.25	56.12±1.54
2	контроль	37.84±2.72	47.24±1.87	53.82±1.36
	опыт	41.52±1.43	50.38±1.23	56.92±1.84
3	контроль	37.70±1.24	47.02±1.83	54.56±1.15
	опыт	39.52±1.03	50.11±1.28	56.33±0.95
4	контроль	38.01±2.62	47.36±2.13	53.92±1.94
	опыт	40.90±0.92	51.51±1.84	59.71±1.28*
5	контроль	38.44±1.95	46.32±2.92	53.83±2.04
	опыт	41.86±1.54	51.42±1.40	60.26±1.10*
6	контроль	37.75±3.04	46.82±1.83	53.18±1.67
	опыт	45.03±1.55*	54.02±1.51*	62.53±1.54*

Примечания: * $P < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

Таблица 3. Влияние электростатического поля с различным напряжением на качественные и количественные показатели *C. vulgaris* при продолжительности стимуляции 5 мин

Напряже- ние, кВ	Продолжительность эксперимента, ч								
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
	Прирост клеток, млн/мл			Размер клеток, мкм			Отношение мертвых клеток к общему количеству клеток в суспензии, %		
–**	8.4±0.4	13.4±0.5	23.1±2.1	5.6±0.05	5.6±0.05	5.6±0.05	19.6±2.6	11.9±1.1	2.7±1.8
5	8.3±0.8	14.8±0.6*	30.3±1.2*	5.9±0.05*	5.9±0.04*	5.9±0.03*	19.9±0.8	12.4±0.6	6.5±0.8*
–**	8.5±0.3	12.7±0.6	23.2±1.7	5.6±0.05	5.6±0.04	5.6±0.04	19.6±2.6	11.9±1.1	2.7±1.8
15	8.7±0.6	15.4±0.8*	32.6±2.8*	6.0±0.07*	6.1±0.05*	6.1±0.05*	17.9±1.0	9.3±0.8*	2.4±0.9
–**	8.6±0.3	14.1±0.5	23.4±1.4	5.6±0.05	5.6±0.05	5.6±0.04	19.6±2.6	11.9±1.1	2.7±1.8
45	8.6±0.5	14.6±0.2	26.9±2.2	5.7±0.06	5.5±0.05	5.6±0.02	27.5±3.6*	15.5±1.3*	6.6±0.1*

Примечание. ** – контроль; * $P < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

Таблица 4. Влияние электростатического поля с различным временем действия на прирост, размер и жизнеспособность клеток *C. vulgaris* при напряжении 15 кВ

Продолжи- тельность стимули- рования	Продолжительность эксперимента, ч								
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
	Прирост клеток, млн/мл			Размер клеток, мкм			Отношение мертвых клеток к общему количеству клеток в суспензии, %		
–**	30.7±2.5	40.5±3.7	50.9±3.9	5.6±0.07	5.6±0.07	5.5±0.03	–	–	–
1 мин	30.8±1.7	43.3±1.3	49.9±1.2	5.6±0.03	5.6±0.03	5.6±0.05	–	–	–
–**	28.0±1.9	38.4±2.5	51.9±2.6	5.6±0.04	5.6±0.04	5.6±0.04	–	–	–
5 мин	34.1±3.7*	42.5±1.3*	62.1±3.2*	5.7±0.04	5.6±0.02	5.6±0.05	–	–	–
–**	29.6±1.4	39.0±2.2	51.4±3.5	5.6±0.04	5.6±0.04	5.6±0.02	–	–	–
10 мин	29.8±1.0	41.1±3.4	55.9±4.6	5.6±0.06	5.6±0.03	5.6±0.02	–	–	–
–**	30.5±2.5	39.4±2.3	50.8±3.8	5.6±0.02	5.6±0.05	5.6±0.02	–	–	–
15 мин	32.5±1.7	43.9±3.4	55.9±0.8	5.6±0.02	5.6±0.03	5.6±0.03	–	–	–
–**	29.7±2.2	40.9±0.6	50.1±3.9	5.6±0.07	5.6±0.05	5.5±0.03	–	–	–
30 мин	30.8±0.5	42.8±1.9	56.6±5.6	5.6±0.05	5.6±0.04	5.6±0.05	–	–	–
–**	30.7±2.5	41.3±1.9	52.1±3.1	5.6±0.02	5.6±0.04	5.6±0.02	3.3±0.8	2.6±0.3	2.3±0.6
72 ч	36.8±0.5*	46.6±0.4*	67.1±1.9*	5.7±0.02	5.7±0.02*	5.7±0.02*	2.5±0.6	2.1±0.1*	1.7±0.5

Примечание. ** – контроль; * $P < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

Влияние электростатического поля на мутагенность клеток хлореллы. Исследования мутагенного эффекта электростатического поля на клетки хлореллы проводили на напряжениях 5, 15 и 45 кВ. Выбранные напряжения электростатического поля в результате стимулирования хлореллы показывали лучший стимулирующий эффект на качественные и количественные показатели хлореллы. При учете мутантных макроколоний 100% составили колонии с морфологическими мутациями, пигментных мутаций обнаружено не было.

В ходе анализа представленных данных отмечали, что выбранные значения напряжения не способны индуцировать видимые мутации хлореллы. В первом эксперименте частота возникновения мутантных колоний у хлореллы при действии напряжения различалась в зависимости от значения напряжения. Наибольшая частота видимых мутаций ($0.60 \pm 0.45\%$) установлена при стимуляции суспензии хлореллы напряжением 45 кВ, однако результаты для всех опытных групп достоверно от контроля не отличались. Выраженность мутагенного эффекта в опытных группах варьировала от 0.4 до 0.7 баллов (табл. 5).

При воздействии на клетки микроводоросли электростатическим полем с напряжением 15 кВ в течение 24 ч установлено, что частота видимых мутаций хлореллы составила $0.63 \pm 0.21\%$, длительностью 72 ч – $1.09 \pm 0.16\%$, спонтанный уровень мутаций равнялся $0.90 \pm 0.6\%$ (табл. 6). Полученные результаты для обеих опытных групп от контроля достоверно не отличались, и, таким образом, мутагенный эффект воздействия не наблюдали.

Влияние питательной среды и электростатического поля на биохимический состав суспензии хлореллы. Согласно литературным данным, интенсификация технологии выращивания *Chlorella vulgaris* для пищевой и кормовой промышленности направлены в первую очередь на повышение качественных и количественных характеристик микроводоросли [5, 11]. Поэтому особое значение в таких исследованиях имеет изучение содержания в ней основных питательных веществ (белков, жиров, углеводов), отражающих пищевую ценность хлореллы, и минерального состава, в частности кальция, фосфора, цинка, меди и железа, так как данные элементы являются жизненно важными компонентами, необходимыми для нормального функционирования организма животных и человека. Кальций и фосфор входят в состав минеральных структур скелета, участвуют в деятельности центральной нервной системы, необходимы для нормальной работы сердца и свертывания крови. Цинк является активатором и ингибитором многих ферментов, необходим для синтеза ДНК и белка, влияет на ростовые процессы и половое созревание, иммунитет, энергетический обмен. Железо выполняет кроветворные функции, при участии меди способствует образованию гемоглобина и созреванию эритроцитов до конечной стадии. Оба эти микроэлемента играют важную роль в процессах кроветворения [22, 23].

По результатам проведенного химического анализа выявлено, что в воздушно-сухом веществе хлореллы, выращенной с использованием питательной среды с оптимальным соотношением компонентов и простимулированной электростатическим полем с напряжением 15 кВ в течение 72 ч, показатели сырого протеина и фосфора достоверно превосходили аналогичные значения воздушно-сухого вещества хлореллы, выращенной без стимуляции электростатическим полем. В сравнении с контрольными значениями в опыте отмечено некоторое превышение значений сырого жира – на 0.2%, сырой золы – на 0.3%, Ca – на 0.03%, Zn – на 0.2 мг/кг и Fe – на 0.4 мг/кг (табл. 6).

Кроме того, в настоящее время в фармацевтической промышленности большое внимание уделяется поиску растений, обладающих антиоксидантной активностью. Среди антиоксидантных ферментов большой интерес представляют СОД и КАТ, так как оба этих фермента способствуют защите организма животных от повреждения активными окислителями [24, 25]. СОД замедляет перекисное окисление липидов и белков, КАТ расщепляет перекись водорода до молекул воды и молекулярного кислорода [26, 27]. Для изучения антиоксидантных свойств суспензии хлореллы был проведен анализ микроводоросли на показатели активности каталазы (рис. 1А) и активности супероксиддисмутазы (рис. 1Б).

В результате определения ферментного комплекса в биомассе хлореллы установлено, что показатели активности каталазы и активности супероксиддисмутазы микроводоросли, простимулированной электростатическим полем с напряжением 15 кВ и продолжительностью воздействия 72 ч, достоверно превышали аналогичные значения хлореллы, не подвергавшейся стимулированию электростатическим полем (рис. 1).

Токсикологические исследования суспензии хлореллы, выращенной с применением оптимальных установленных параметров питательной среды и электростатического поля, показали отсутствие содержания в ней основных отравляющих организм животных и человека веществ (ртуть, мышьяк), а также по результатам изучения влияния на выживаемость стилонихий имеет нетоксичный характер (табл. 7).

Таблица 5. Влияние действия электростатического поля на выраженность мутагенного эффекта в тесте учета видимых мутаций у *C. vulgaris*

Напряжение, кВ		Продолжительность воздействия, мин	Частота мутантных колоний, %	Выраженность мутагенного эффекта, балл
контроль	–	–	0.9±0.4	1.0
опыт	5	5	0.4±0.3	0.5
	15	5	0.3±0.2	0.4
	45	5	0.6±0.5	0.7
контроль	–	24	0.9±0.6	1.0
опыт	15	24	0.6±0.2	0.7
контроль	–	72	0.9±0.6	1.0
опыт	15	72	1.1±0.2	1.2

Примечания: * $P < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

Таблица 6. Влияние питательной среды с оптимальным соотношением компонентов и электростатического поля на химический состав воздушно-сухого вещества *C. vulgaris*

	Контроль	Опыт	Состав хлореллы по Сальниковой
Напряжение, кВ	–	15	–
Время воздействия, ч	–	72	–
Сырой протеин, %	41.6±0.5	43.7±1.1*	40–60
Сырая клетчатка, %	2.5±0.8	2.4±0.5	2–5
Сырой жир, %	4.3±0.4	4.5±0.7	4–7
Сырая зола, %	7.4±0.5	7.7±0.3	5–8
Кальций, %	0.23±0.02	0.26±0.03	0.15–0.75
Фосфор, %	0.75±0.03	0.87±0.04*	0.45–1
Цинк, мг/кг	6.9±0.3	7.1±0.4	5–10
Медь, мг/кг	0.008±0.002	0.008±0.002	0.005–0.01
Железо, мг/кг	16.3±1.5	16.7±0.8	10–20

Примечание. * $P < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

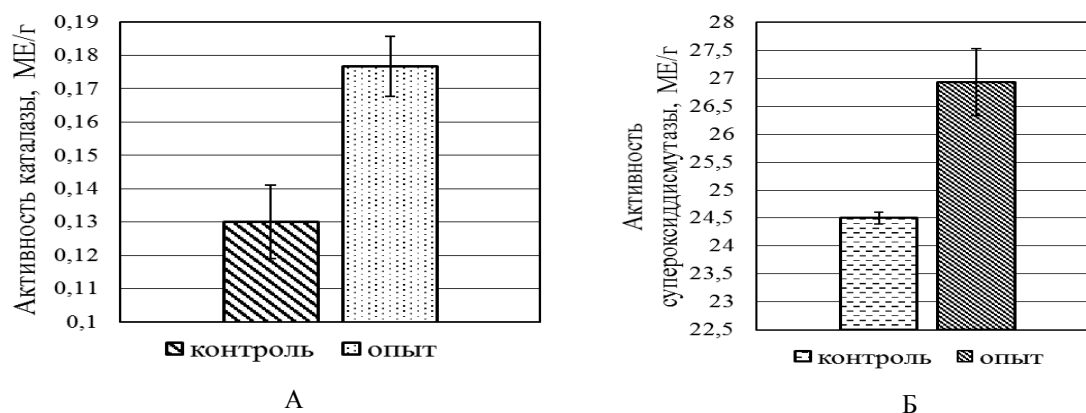


Рис. 1. Активность ферментов: А – активность каталазы биомассы *C. vulgaris*, МЕ/г; Б – активность супероксиддисмутазы биомассы *C. vulgaris*, МЕ/г

Таблица 7. Данные токсикологического анализа суспензии *C. vulgaris*

Наименование показателя	Наименование нормативных документов на метод испытаний	Значение показателя	
		по нормативным документам	при испытании
Нитриты, мг/кг	ГОСТ 13496.19-98	не регламентируется	0.07
Нитраты, мг/кг	ГОСТ 13496.19-98	не регламентируется	4.0
Хлористый натрий, %	ГОСТ 13496.1-98	не регламентируется	0.17
Свинец, мг/кг	ГОСТ 30692-2000	5.0	0.0053
Ртуть, мг/кг	ГОСТ 26927-86	0.1	не обнаружено
Кадмий, мг/кг	ГОСТ 30692-2000	0.3	0.00031
Мышьяк, мг/кг	ГОСТ 26930-86	2.0	не обнаружено
Токсичность – выживаемость стилонихий (ацетоновый и водный экстракт)	ГОСТ Р 52337-2005	не допускается	нетоксична

Исследования по изучению комплексного влияния питательной среды с оптимальным соотношением минеральных веществ и электростатического поля на качественные и количественные показатели микроводоросли *Chlorella vulgaris* ранее не проводились. Тем не менее имеются сведения об обособленном влиянии данных факторов на прирост биомассы хлореллы и содержание в ней основных питательных веществ.

Применение питательных сред с различным составом и концентрациями минеральных солей оказывает неодинаковое действие на интенсивность роста и химический состав микроводоросли. Кроме того, установлено, что содержание в хлорелле основных питательных веществ может варьировать и от соотношения в растворе компонентов, большую часть которых составляют макроэлементы [5, 28, 29]. Показано, что изменение количества внесения только одного компонента питательного раствора недостаточно для стабильного роста микроводоросли, что указывает на важность применения сбалансированной среды [30, 31].

Использование наносекундного импульсного электрического поля в технологии выращивания микроводоросли *Chlorella vulgaris* оказывает влияние на увеличение биомассы микроводоросли на 10–20% [15], а применение умеренного электрического поля проявляет стимулирующее действие на ее рост и проницаемость мембраны клетки [16]. Показано, что использование электростатического поля с различным напряжением в качестве стимулирующего фактора для интенсификации процесса культивирования хлореллы оказывает стимулирующий эффект на рост количества клеток хлореллы в 1 мл суспензии [32]. Данное воздействие достигается за счет возникновения эффекта мембранной электропермеабилитации [33]. Увеличение проницаемости клеточной мембраны происходит за счет элетропорации клетки. Образующиеся таким образом новые поры на клеточной мембране позволяют компонентам питательной среды эффективнее проникать в клетку, тем самым увеличивая скорость обмена веществ. Увеличение проницаемости мембраны клетки ускоряет работу Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и H^+ насосов, способствуя активации транспорта через мембраны сахаров и аминокислот. Таким образом, электростатическое поле оказывает воздействие на внутриклеточные и внеклеточные электролиты и регулирует их концентрацию в клетке, что оказывает влияние на скорость биохимических реакций, которые участвуют в процессах роста и развития клеток [16, 34].

В данной работе продемонстрировано, что комплексное влияние питательной среды с оптимальным соотношением минеральных веществ и электростатического поля с напряжением 15 кВ оказывают влияние на увеличение содержания макронутриентов в суспензии хлореллы, что указывает на соответствие предлагаемой технологии выращивания микроводоросли установленным нормам и режимам культивирования и находится в пределах нормальных значений химического состава для активно растущей культуры [5, 10, 35, 36]. Кроме того, результаты токсикологического анализа показали, что суспензия хлореллы, выращенная по разработанной технологии применима в пищевой промышленности или в качестве кормовой добавки для животных. Использование данных факторов в технологии культивирования микроводоросли способствует увеличению содержания в ней протеина (43.7%), жира (4.5%), клетчатки (2.4%), сырой золы (7.7%), Ca (0.26%), P (0.87%), Zn (7.1 мг/кг) и Fe (16.7 мг/кг), что превосходит аналогичные показатели в хлорелле, выращенной по общепринятым технологиям. При сравнении показателей активности каталазы и активности супероксиддисмутазы в клетках микроводорослей с данными о показателях активности этих ферментов в листьях амаранта метельчатого (*Amaranthus paniculatus L.*) и листьев табака обыкновенного (*Nicotiana tabacum L.*), которые используются в фармацевтической промышленности в качестве компонентов для изготовления биоантиоксидантных препаратов, выявлено, что активность каталазы в биомассе хлореллы достоверно выше, чем аналогичный показатель амаранта обыкновенного, значение активности данного фермента в котором колеблется в пределах от 0.02 до 0.03 МЕ/г [37]. Показатель активности супероксиддисмутазы в клетках хлореллы также превышал показатель активности данного фермента листьев табака, который находится в пределах 22–23 МЕ/г [38]. Это характеризует хлореллу как микроводоросль, обладающую антиоксидантными свойствами, которые не утрачиваются при комплексном действии изучаемых факторов (оптимального соотношения питательных веществ среды и стимулирующего действия электростатического поля).

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что совместное действие среды с оптимальными концентрациями питательных веществ и электростатического поля с наилучшими параметрами оказывает стимулирующий эффект на рост биомассы, размер клеток и биохимический состав *C. vulgaris*. Выявлено, что комплексное использование оптимальных режимов обоих изучаемых факторов в

процессе культивирования микроводоросли позволяет получить нетоксичную, с отсутствием видимых мутаций, жизнеспособную суспензию хлореллы с плотностью клеток 50 млн кл./мл на 18 ч быстрее по сравнению с общепринятыми методиками.

Список литературы

1. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae // Journal of bioscience and bioengineering. 2006. Vol. 101. Issue 2. Pp. 87–96. DOI: 10.1263/jbb.101.87
2. Borowitzka M.A. High-value products from microalgae – their development and commercialization // Journal of Applied Phycology. 2013. Vol. 25. Issue 3. Pp. 743–756. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9.
3. Wijffels R.H., Kruse O., Hellingwerf K.J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae // Current opinion in biotechnology. 2013. Vol. 24. Issue 3. Pp. 405–413. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.04.004.
4. Bogdanova A. A., Flerova E. A. Biochemical and hematological composition of blood of cattle fed with *Chlorella* // Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2018. Vol. 9, issue 2, pp. 244–249. DOI: 10.15421/021836.
5. Сальникова М.Я. Хлорелла – новый вид корма. М., 1977. 96 с.
6. Bishop W.M., Zubeck H.M. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements // J. Nutr. Food. Sci. 2012. Vol. 2. Issue 5. Pp. 1–6. DOI: 10.4172/2155-9600.1000147.
7. Markou G., Nerantzis E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions // Biotechnology advances. 2013. Vol. 31. Issue 8. Pp. 1532–1542. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.011.
8. Oh S.T., Zheng L., Kwon H.J., Choo Y.K., Lee K.W., Kang C.W., An B.K. Effects of dietary fermented *Chlorella vulgaris* (CBT®) on growth performance, relative organ weights, cecal microflora, tibia bone characteristics, and meat qualities in Pekin ducks // Asian-Australasian journal of animal sciences. 2015. Vol. 28(1). Pp. 95–101. DOI: 10.5713/ajas.14.0473.
9. Jorquera O., Kiperstok A., Sales E.A., Embirucu M., Ghirardi M.L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors // Bioresource technology. 2010. Vol. 101. Issue 4. Pp. 1406–1413. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.09.038.
10. Wong Y.K., Ho K.C., Tsang Y.F., Wang L., Yung K.K.L. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in column photobioreactor for biomass production and lipid accumulation // Water Environment Research. 2016. Vol. 88. Issue 1. Pp. 40–46. DOI: 10.2175/106143015X14362865227553.
11. Bodnar O.I., Burega N.V., Palchyk A.O., Viniarska H.B., Grubinko V.V. Optimization of *Chlorella vulgaris* Beij. Cultivation in a bioreactor of continuous action // Biotechnologia Acta. 2016. Vol. 9. N 4. Pp. 42–49. DOI: 10.15407/biotech9.04.042.
12. Fan Z., Qin L., Zheng W., Meng Q., Shen C., Zhang G. Oscillating membrane photoreactor combined with salt-tolerated *Chlorella pyrenoidosa* for landfill leachates treatment // Bioresource technology. 2018. Vol. 269. Pp. 134–142. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.08.093.
13. Suthar S., Verma R. Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock // Process Safety and Environmental Protection. 2018. Vol. 113. Pp. 141–148. DOI: 10.1016/j.psep.2017.09.018.
14. Глушенко Н.А. О некоторых эффектах влияния электро-ионной обработки на дрожжевые микроорганизмы // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. 2013. № 71, Т2. С. 36–40.
15. Gusbeth C.A., Eing C., Göttel M., Frey W. Boost of algae growth by ultra short pulsed electric field treatment // Abstracts IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS). 2013. San Francisco, CA. Pp. 1–1. DOI: 10.1109/PLASMA.2013.6633325.
16. Nezammahalleh H., Ghanati F., Adams II T. A., Nosrati M., Shojaosadati S. A. Effect of moderate static electric field on the growth and metabolism of *Chlorella vulgaris* // Bioresource technology. 2016. Vol. 218. Pp. 700–711. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.018.
17. Smart K.A., Chambers K.M., Lambert I., Jenkins C., Smart C.A. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality // Journal of the American Society of Brewing Chemists. 1999. Vol. 57. Issue 1. Pp. 18–23. DOI: 10.1094/ASBCJ-57-0018.
18. Шмигель В. В., Флёрова Е. А., Богданова А. А., Суховский Н. С., Фигаро А. Л., Ковалева М. И. Оценка токсикологических и токсикогенетических показателей суспензии хлореллы при технологии выращивания в электростатическом поле // Международный технико-экономический журнал. 2015. №1. С. 64–68.
19. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists / ed. K. Helrich. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. 1990. Vol. 1. 800 p.
20. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985. №11. С. 678–680.
21. Корольюк М.А., Иванова Л.К., Майорова И.Г., Токарева В.А. Методы определения активности каталазы // Клиническая лабораторная диагностика. 1988. №4. С. 44–47.
22. Tapiero H., Tew K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2003. Vol. 57. Issue 9. Pp. 399–411. DOI: 10.1016/S0753-3322(03)00081-7
23. Prashanth L., Kattapagari K.K., Chitturi R.T., Baddam V.R.R., Prasad L.K. A review on role of essential trace elements in health and disease // Journal of Dr. NTR university of health sciences. 2015. Vol. 4. Issue 2. Pp. 75–85. DOI: 10.4103/2277-8632.158577.

24. Kim S.J., Han D., Park M.H., Rhee J.S. Screening for superoxide dismutase-like compounds and its activators in extracts of fruits and vegetables // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1994. Vol. 58. Issue 12. Pp. 2263–2265. DOI: 10.1271/bbb.58.2263.
25. Martínez-Álvarez R.M., Morales A.E., Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors // *Reviews in Fish Biology and fisheries*. 2005. Vol. 15. Issue 1-2. Pp. 75–88. DOI: 10.1007/s11160-005-7846-4.
26. Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolín I., Herrera F., Martín V., Reiter R.J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin // *Journal of pineal research*. 2004. Vol. 36. Issue 1. Pp. 1–9. DOI: 10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x.
27. Xue Y.F., Liu Z.P. Antioxidant enzymes and physiological characteristics in two Jerusalem artichoke cultivars under salt stress // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2008. Vol. 55. Issue 6. Pp. 776–781. DOI: 10.1134/S102144370806006X.
28. Lv J.M., Cheng L.H., Xu X.H., Zhang L., Chen H.L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions // *Bioresource technology*. 2010. Vol. 101. Issue 17. Pp. 6797–6804. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.120.
29. Yeh K.L., Chang J.S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31 // *Bioresource technology*. 2012. Vol. 105. Pp. 120–127. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.103.
30. Mandalam R.K., Palsson B. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures // *Biotechnology and bioengineering*. 1998. Vol. 59. Issue 5. Pp. 605–611. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980905)59:5<605::AID-BIT11>3.0.CO;2-8.
31. Abou-El-Soud G.W., Hassan L.H., Morsy E.M. Comparison of Different Media Formulations and the Optimal Growing Conditions on Growth, Morphology and Chlorophyll Content of Green Alga, *Chlorella vulgaris* // *Journal of American Science*. 2016. Vol. 12. Issue 6. Pp. 86–95. DOI: 10.7537/marsjas120616.11.
32. Патент 2558300 (РФ). Способ выращивания хлореллы / В.В. Шмигель, Е.А. Флёрва, А.А. Богданова, Н.А. Суховский. 2015.
33. Silve A., Leray I., Poignard C., Mir L.M. Impact of external medium conductivity on cell membrane electropermeabilization by microsecond and nanosecond electric pulses // *Scientific reports*. 2016. Vol. 6. N 19957. DOI: 10.1038/srep19957.
34. Hunt R., Zavalin A., Bhatnagar A., Chinnasamy S., Das K. Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications // *International Journal of Molecular Sciences*. 2009. Vol. 10. Issue 10. Pp. 4515–4558. DOI: 10.3390/ijms10104515.
35. Cha K.H., Lee J.Y., Song D.G., Kim S.M., Lee D.U., Jeon J.Y., Pan C.H. Effect of microfluidization on in vitro micellization and intestinal cell uptake of lutein from *Chlorella vulgaris* // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011. Vol. 59. Issue 16. Pp. 8670–8674. DOI: 10.1021/jf2019243.
36. Bamba B.S.B., Lozano P., Adjé F., Ouattara A., Vian M.A., Tranchant C., Lozano Y. Effects of temperature and other operational parameters on *Chlorella vulgaris* mass cultivation in a simple and low-cost column photobioreactor // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2015. Vol. 177. Issue 2. Pp. 389–406. DOI: 10.1007/s12010-015-1751-7.
37. Sreelatha S., Dinesh E., Uma C. Antioxidant properties of Rajgira (*Amaranthus paniculatus*) leaves and potential synergy in chemoprevention // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012. Vol. 13. Issue 6. Pp. 2775–2780. DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.6.2775.
38. Popov V., Antipina O., Trunova T. Oxidative stress in the tobacco plants at hypothermia // *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture Sodinkyste Ir Daržininkyste*. 2008. Vol. 27. Issue 2. Pp. 121–127.

Поступила в редакцию 4 февраля 2019 г.

После переработки 27 февраля 2019 г.

Принята к публикации 27 мая 2019 г.

Для цитирования: Богданова А.А., Флёрва Е.А., Паюта А.А. Влияние условий культивирования на качественные и количественные показатели *Chlorella vulgaris* // *Химия растительного сырья*. 2019. №4. С. 293–304. DOI: 10.14258/jcrpm.2019045130.

Bogdanova A.A.^{1*}, Flerova E.A.^{1,2}, Payuta A.A.¹ THE EFFECT OF GROWING CONDITIONS ON THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE INDICATORS OF CHLORELLA VULGARIS

¹ Yaroslavl Scientific Research Institute of livestock breeding and forage production - Federal State Budget Scientific Institution «Federal Williams Research Center of Forage Production and Agroecology», Lenina st., 1, Mikhailovsky village, Yaroslavl region, 150517 (Russia)

² P.G. Demidov Yaroslavl State University, ul. Sovetskaya, 14, Yaroslavl, 150003 (Russia)

The complex effect of two factors (the optimum ratio of nutrients of the medium and the electrostatic field) on the qualitative and quantitative indicators of *Chlorella vulgaris* was investigated. It is shown that the use of a medium with optimal concentrations of mineral substances and an electrostatic field with a voltage of 15 kV and an exposure time of 72 hours has a positive effect on growth rates, the size of microalgae cells and their viability, contributes to obtaining a culture with a density of 50 mln cells / ml 18 hours faster in comparison with the cultivation of generally accepted methods. It has been established that when two factors are influences on the cells of the *Chlorella* a mutagenic effect is not observed. Analysis of the microalgae culture grown under the influence of the studied factors showed that its chemical composition was consistent and with several indicators exceeded that of *chlorella* cultivation according to classical technologies. It was revealed that the activity of catalase and superoxide dismutase of microalgae grown in optimal conditions of the nutrient medium and the electrostatic field, significantly exceeded similar values of *Chlorella vulgaris*, which was not subjected to electrostatic stimulation. The high activity of the studied enzymes in *Chlorella* cells is shown in comparison with higher plants – components of bio-antioxidant preparations, such as *Amaranthus paniculatus* L. and *Nicotiana tabacum* L. According to the results of the toxicological study the absence of the content in *Chlorella* of the main poisonous substances for body animals and humans (mercury, arsenic) has been established. As a result of the research, it was proposed to use the established optimal parameters of both factors in the cultivation of *C. vulgaris*.

Keywords: microalgae, nutrient medium, electrostatic field, biochemical composition, biotechnology.

References

1. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2006, vol. 101, issue 2, pp. 87–96. DOI: 10.1263/jbb.101.87.
2. Borowitzka M.A. *Journal of Applied Phycology*, 2013, vol. 25, issue 3, pp. 743–756. DOI: 10.1007/s10811-013-9983-9.
3. Wijffels R.H., Kruse O., Hellingwerf K.J. *Current opinion in biotechnology*, 2013, vol. 24, issue 3, pp. 405–413. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.04.004.
4. Bogdanova A.A., Flerova E.A. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 2018, vol. 9, issue 2, pp. 244–249. DOI: 10.15421/021836.
5. Sal'nikova M.Ya. *Khlorella – novyy vid korma* [Chlorella is a new type of food], Moskva, 1977, 96 s. (in Russ).
6. Bishop W.M., Zubeck H.M. *J. Nutr. Food. Sci.*, 2012, vol. 2, issue 5, pp. 1–6. DOI: 10.4172/2155-9600.1000147
7. Markou G., Nerantzis E. *Biotechnology advances*, 2013, vol. 31, issue 8, pp. 1532–1542. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.011.
8. Oh S.T., Zheng L., Kwon H.J., Choo Y.K., Lee K.W., Kang C.W., An B.K. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 2015, vol. 28(1), pp. 95–101. DOI: 10.5713/ajas.14.0473.
9. Jorquera O., Kiperstok A., Sales E.A., Embirucu M., Ghirardi M.L. *Bioresource technology*, 2010, vol. 101, issue 4, pp. 1406–1413. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.09.038.
10. Wong Y.K., Ho K.C., Tsang Y.F., Wang L., Yung K.K.L. *Water Environment Research*, 2016, vol. 88, issue 1, pp. 40–46. DOI: 10.2175/106143015X14362865227553.
11. Bodnar O.I., Burega N.V., Palchuk A.O., Viniarska H.B., Grubinko V.V. *Biotechnologia Acta*, 2016, vol. 9, no. 4, pp. 42–49. DOI: 10.15407/biotech9.04.042.
12. Fan Z., Qin L., Zheng W., Meng Q., Shen C., Zhang G. *Bioresource technology*, 2018, vol. 269, pp. 134–142. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.08.093.
13. Suthar S., Verma R. *Process Safety and Environmental Protection*, 2018, vol. 113, pp. 141–148. DOI: 10.1016/j.psep.2017.09.018.
14. Glushchenko N.A. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta im. Yaroslava Mudrogo*, 2013, no. 71, vol. 2, pp. 36–40. (in Russ.)
15. Gusbeth C.A., Eing C., Göttel M., Frey W. *Abstracts IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS)*, 2013, San Francisco, CA, pp. 1–1. DOI: 10.1109/PLASMA.2013.6633325.
16. Nezammahalleh H., Ghanati F., Adams II T. A., Nosrati M., Shojaosadati S. A. *Bioresource technology*, 2016, vol. 218, pp. 700–711. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.018.
17. Smart K.A., Chambers K.M., Lambert I., Jenkins C., Smart C.A. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1999, vol. 57, issue 1, pp. 18–23. DOI: 10.1094/ASBCJ-57-0018.
18. Shmigel' V.V., Flerova E.A., Bogdanova A.A., Suhovskij N.S., Figaro A.L., Kovaleva M.I. *Mezhdunarodnyy tekhniko-ekonomicheskij zhurnal*, 2015, no. 1, pp. 64–68. (in Russ.)
19. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* / ed. K. Helrich, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1990, vol. 1, 800 p.
20. Chevari S., Chaba I., Sekey Y. *Laboratornoye delo*, 1985, no. 11, pp. 678–680. (in Russ.)
21. Korolyuk M.A., Ivanova L.K., Mayorova I.G., Tokareva V.A. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 1988, no. 4, pp. 44–47. (in Russ.)

*Corresponding author.

22. Tapiero H., Tew K.D. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, vol. 57, issue 9, pp. 399–411. DOI: 10.1016/S0753-3322(03)00081-7.
23. Prashanth L., Kattapagari K.K., Chitturi R.T., Baddam V.R.R., Prasad L.K. *Journal of Dr. NTR university of health sciences*, 2015, vol. 4, issue 2, pp. 75–85. DOI: 10.4103/2277-8632.158577.
24. Kim S.J., Han D., Park M.H., Rhee J.S. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1994, vol. 58, issue 12, pp. 2263–2265. DOI: 10.1271/bbb.58.2263.
25. Martínez-Álvarez R.M., Morales A.E., Sanz A. *Reviews in Fish Biology and fisheries*, 2005, vol. 15, issue 1-2, pp. 75–88. DOI: 10.1007/s11160-005-7846-4.
26. Rodríguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolín I., Herrera F., Martín V., Reiter R.J. *Journal of pineal research*, 2004, vol. 36, issue 1, pp. 1–9. DOI: 10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x.
27. Xue Y.F., Liu Z.P. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2008, vol. 55, issue 6, pp. 776–781. DOI: 10.1134/S102144370806006X.
28. Lv J.M., Cheng L.H., Xu X.H., Zhang L., Chen H.L. *Bioresource technology*, 2010, vol. 101, issue 17, pp. 6797–6804. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.120.
29. Yeh K.L., Chang J.S. *Bioresource technology*, 2012, vol. 105, pp. 120–127. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.103.
30. Mandalam R.K., Palsson B. *Biotechnology and bioengineering*, 1998, vol. 59, issue 5, pp. 605–611. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980905)59:5<605::AID-BIT11>3.0.CO;2-8.
31. Abou-El-Souod G.W., Hassan L.H., Morsy E.M. *Journal of American Science*, 2016, vol. 12, issue 6, pp. 86–95. DOI: 10.7537/marsjas120616.11.
32. Patent 2558300 (RU). 2015. (in Russ.)
33. Silve A., Leray I., Poignard C., Mir L.M. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, no. 19957. DOI: 10.1038/srep19957.
34. Hunt R., Zavalin A., Bhatnagar A., Chinnasamy S., Das K. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, vol. 10, issue 10, pp. 4515–4558. DOI: 10.3390/ijms10104515.
35. Cha K.H., Lee J.Y., Song D.G., Kim S.M., Lee D.U., Jeon J.Y., Pan C.H. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011, vol. 59, issue 16, pp. 8670–8674. DOI: 10.1021/jf2019243.
36. Bamba B.S.B., Lozano P., Adjé F., Ouattara A., Vian M.A., Tranchant C., Lozano Y. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2015, vol. 177, issue 2, pp. 389–406. DOI: 10.1007/s12010-015-1751-7.
37. Sreelatha S., Dinesh E., Uma C. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2012, vol. 13, issue 6, pp. 2775–2780. DOI: 10.7314 / APJCP.2012.13.6.2775.
38. Popov V., Antipina O., Trunova T. *Scientific Works of the Lithuanian, Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture Sodrininkyste Ir Daržininkyste*, 2008, vol. 27, issue 2, pp. 121–127.

Received February 4, 2019

Revised February 27, 2019

Accepted May 27, 2019

Forciting: Bogdanova A.A., Flerova E.A., Payuta A.A., *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 293–304. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019045130.