

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
Институт биомедицинских систем и биотехнологий

Высшая школа биотехнологии и пищевых производств



На правах рукописи
УДК: 576.32/36
УДК: 57.03/04
УДК: 664.691/663.15

Туми Амира

**Получение липидов из биомассы *Chlorella sorokiniana* и выбор
оптимальных условий культивирования**

05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и
биологически активных веществ

**НАУЧНО – КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(ДИССЕРТАЦИЯ)**

Научный руководитель:
д.т.н., профессор Политаева Н.А.

г. Санкт-Петербург - 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	14
1.1.Общая характеристика микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	14
1.1.1.Биология и свойства микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	17
1.2.Классификация липидов.....	35
1.2.1.Общая классификация липидов.....	35
1.2.1.1. Нейтральные липиды.....	37
1.2.1.2. Полярные липиды.....	41
1.3.Направленное культивирование микроводорослей <i>Chlorella</i> для получения биомассы с максимальным содержанием липидов.....	44
1.3.1.Накопление липидов в клетках водорослей.....	44
1.3.2.Механизм липогенеза у микроводорослей.....	45
1.3.3.Факторы, стимулирующие накопление липидов.....	48
1.3.3.1. Влияние химических факторов на накопление липидов в биомассе микроводорослей.....	50
1.3.3.2. Влияние физических факторов на накопление липидов в биомассе микроводорослей.....	54
1.4. Получение липидов из микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> ...	56
1.4.1. Стужения биомассы.....	56
1.4.2. Сушка биомассы.....	59
1.4.3. Дезинтеграция клеток.....	61
1.4.4. Экстракция липидов.....	63
1.4.5.Методы анализа липидов.....	70
1.5. Сорбционные свойства сухой биомассы микроводорослей <i>Chlorella</i>	73
1.6. Оценка рынка производства ценных компонентов из микроводорослей.....	75
1.6.1. Основные ограничивающие факторы, влияющие на стоимость культивирования и сбора биомассы микроводорослей	76
1.6.2.Затраты, связанные с биопереработкой биомассы.....	79
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1.....	81
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	82
2.1. Объекты исследования.....	82
2.2. Методы исследования.....	84
2.2.1. Метод определения роста биомассы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	84
2.2.1.1. Определение количества клеток микроводорослей с помощью камеры Горяева.....	84
2.2.1.2. Определение роста микроводорослей спектрофотометрическим методом.....	86

2.2.2. Методы концентрации биомассы микроводорослей.....	87
2.2.2.1. Физико-химические методы.....	87
2.2.2.2. Механические методы.....	89
2.2.2.2.1. Центрифугирование.....	89
2.2.2.2.2. Микрофльтрация.....	90
2.2.3. Сушка биомассы.....	90
2.2.3.1. ИК-сушка.....	90
2.2.3.2. Лиофильная сушка.....	91
2.2.3.3. Естественная сушка.....	92
2.2.4. Методы дезинтеграции клеток микроводорослей.....	92
2.2.4.1. СВЧ-излучение.....	92
2.2.4.2. Ультразвуковая гомогенизация.....	93
2.2.4.3. Ферментативная обработка.....	93
2.2.4.5. «Осмотический шок».....	94
2.2.5. Методы извлечения липидов.....	95
2.2.5.1. Метод Сокслета.....	95
2.2.5.2. Метод Рандалла.....	97
2.2.6. Методы анализа липидов.....	99
2.2.6.1. Тонкослойная хроматография.....	99
2.2.6.2. Газо-жидкостная хроматография.....	100
2.2.7. Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье.....	100
2.2.8. Вольтамперометрический метод для измерения массовых концентраций тяжёлых металлов.....	102
2.2.9. Проведение анализа токсичности суммы липидов полученных из биомассы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> методом биотестирования.....	102
2.2.10. Измерение рН растворов.....	107
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 2.....	108
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА.....	109
3.1. Направленное культивирование микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	109
3.1.1. Изучение влияния физико-химических параметров на скорость культивирования.....	114
3.1.1.1. Влияние рН среды на рост биомассы <i>C. sorokiniana</i>	114
3.1.1.2. Влияние температуры на рост биомассы <i>C. sorokiniana</i>	116
3.1.1.3. Изучение влияния параметров освещения на скорость культивирования.....	117
3.1.1.3.1. Интенсивность освещения.....	117
3.1.1.3.2. Спектр излучения.....	118
3.1.1.4. Изучение влияния количества азота в составе питательной среды на скорость культивирования микроводорослей и состав биомассы.....	121
3.2. Получения сухой биомассы.....	124
3.2.1. Влияние способа концентрирования биомассы.....	124

3.2.1.1. Физико-химический метод.....	124
3.2.1.2. Механические методы.....	128
3.2.2. Влияние способа сушки биомассы на выход липидов.....	130
3.2.3. Результаты токсикологического анализа биомассы.....	132
3.3. Экстракция липидов из биомассы.....	135
3.3.1. Дезинтеграция клеток микроводорослей.....	135
3.3.2. Изучение влияния экстракционных растворителей на выход липидов.....	137
3.3.4. Изучение влияния продолжительности экстракции на выход липидов.....	138
3.3.5. Изучение влияния температуры экстракции на выход общих липидов.....	140
3.4. Определение состава липидов.....	140
3.4.1. Разделение липидов методом тонкослойной хроматографии.....	141
3.4.2. Анализ жирных кислот методом газовой хроматографии.....	141
3.4.3. Влияние спектр света на выход общих липидов из биомассы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	143
3.4.4. Влияние концентрация нитратов в питательной среде на выход и жирно-кислотный профиль общих липидов полученных из биомассы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i>	144
3.4.5. Результаты токсикологического анализа липидов.....	149
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	152
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	153

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

НАСА/NASA – национальное управление по авиации и исследованию космического пространства

C.s/ C.sorokiniana – Chlorella sorokiniana

C. vulgaris – Chlorella vulgaris

ППД – пруд с принудительным движением

OD – optical density / оптическая плотность

ТМ – тяжелые металлы

ИТМ – ионы тяжелых металлов

pH – водородный показатель

Э – эффективность, %

A – сорбционная емкость, мг/г, г/г

C – концентрация, мг/дм³

ТСХ – тонкослойная хроматография

ГЖХ, ГХ – газо-жидкостная хроматография

АТФ – аденозинтрифосфат

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

PS – photosystem

PSF – photosynthetic Factories

СИД – Светоизлучающие диоды

НЛ – нейтральные липиды

ПЛ – полярные липиды

ОЛ – омыляемые липиды

ДГК – докозагексаеновая кислота

ЭПК – эйкозапентаеновая кислота

АК – арахидоновой кислоты

СЖК – свободных жирных кислот

ТАГ – триацилглицериды

ЖК – жирные кислоты

ФЛ – фосфолипидов

ФГ – фосфатидилглицерин

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ФС – фосфатидилсерин

ФИ – фосфатидилинозит

ФК – фосфатидная кислота

МГДГ – моногалактозилдиацилглицерин

ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин

СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицерин

ДГТС – 1,2-диацилглицерил-3-О-4' - (N, N, N-триметил) гомосерин

ДГТА – 1,2-диацилглицерил-3-О -2' . - (гидроксиметил) - (N, N, N -триметил) -
β-аланин

ДГКХ – 1,2-диацилглицерил-3-О-карбоксо- (гидроксиметил) холин

АСР – из английского: acyl carrier protein - Ацилпереносящие белки)

КоА – Кофермент А

MaB-flocs – из английского: Microalgal bacterial flocs – Хлопья бактерии и
микроводорослей

ВЭЖХ – высокоэффективной жидкостной хроматографии

ТФК – твердофазную колонку

ДИП – детектор ионизации пламени

ДИРС – детектор испарительного рассеяния света

ВОДИРУ – буровой дипиррометен

МС – масс-спектрокопия

СФВ – колориметрический сульфосфосванилиновый

БИК – спектроскопия – ближняя инфракрасная спектроскопия

ЯМР – спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

АЛК – α -линоленовую кислоту

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Многочисленные исследования показали важность диеты для долголетия и общего состояния здоровья человека. К сожалению, в последнее время становятся все более доступными и популярными продукты быстрого приготовления. Длительное употребление этих продуктов может нанести вред здоровью человека, поскольку они содержат много сахара и насыщенных жиров, но не содержат незаменимых и ценных питательных веществ, таких как полиненасыщенные жирные кислоты омега-3.

Микроводоросли считаются одними из самых многообещающих организмов в качестве устойчивого источника пищи, кормов, фармацевтических препаратов и биотоплива. Кроме того, фототрофные микроводоросли часто имеют высокую скорость деления, поглощают атмосферный CO₂ и не нуждаются в пахотной земле. Такие виды, как *Chlorella sorokiniana*, также являются исключительными продуцентами жирных кислот омега-3 и длинноцепочечных ПНЖК, таких как эйкозапентаеновая, докозагексаеновая, которые имеют ряд преимуществ для здоровья. Обогащение современного рациона пищевыми добавками, полученными из микроводорослей, - интересная стратегия для балансирования соотношения омега-3 / омега-6 при одновременном снижении необходимости полагаться на уже истощенные рыбные запасы. Однако еще предстоит решить ряд проблем из-за особенностей этого сырья и высокой стоимости существующих технологий производства.

Таким образом, актуальным является проведение исследований, направленных на улучшение последующей обработки продуктов из микроводорослей.

Настоящая работа направлена на разработку биотехнологии получения липидов и на повышение продуктивности биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* с использованием направленного культивирования.

Степень разработанности темы исследования. Возможное многоцелевое использование биомассы микроводорослей привлекает внимание ученых с 1950-х годов. Технология культивирования микроводорослей разрабатывалась и совершенствовалась многими авторами, среди которых – Голлербаха М.М. (1951), Strathmann R (1967), Bennemann J. и др. (1977), Borowitzka M. (1988), Becker E.W. (1994), Janssen M. и др. (1999), Rodríguez H. et al. (2000), Belay A. (2002), Chisti Y. (2007), Andersen R. (2005), Campo J.A.D. и др. (2008), Azma M. и др. (2010), Béchet Q. и др. (2013), White D. и др. (2015), Loftus S. E. и др. (2017), Xie M. и др. (2018), Esbroeck E.V. (2018). Такие исследователи, как Huang, Q. и др. (2017), Degen, J. (2019), Helisch, H. и др. (2020), Roughton L. (2020), Zhou W. и др. (2020). разрабатывали различные системы культивирования и фотобиореакторы для повышения продуктивности биомассы. Исследование Ruiz J. и др. (2016) продемонстрировало, что производство ценных компонентов на основе микроводорослей более экономически целесообразно, чем производство биомассы в целом или производства биотоплива. Таким образом, использование микроводорослей для производства нутрицевтиков, таких как омега-3, стало особенно привлекательным. Примеры использования микроводорослей для получения липидов пищевого назначения представлены в работах авторов Chu F. и др. (2008), Kovač, D.J. и др. (2013), Camacho F. и др. (2019), Lafarga, T. и др. (2019), Uma V.S. и др. (2020), Remize M. и др. (2021). Липиды из микроводорослей содержат большое количество длиноцепочных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Было обнаружено, что эти соединения обладают многими полезными свойствами. Тем не менее, технология производства ценных компонентов из микроводорослей всё еще нуждается в оптимизации. Таким образом, разработка эффективной биотехнологии производства липидов из микроводорослей является актуальной областью исследований.

Связь работы с научными проектами. Диссертационная работа выполнена в рамках реализации федеральной целевой программы

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы» по теме проекта: «Разработка и внедрение инновационных биотехнологий переработки микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и ряски *Lemna minor*» (Соглашение № 14.587.21.0038, от 17 июля 2017 г.) Уникальный идентификатор проекта RFMEFI58717X0038.

Цель работы: разработка биотехнологии получения суммы липидов из сухой биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и подбор условий их культивирования.

Для достижения поставленной цели в ходе исследования были поставлены следующие задачи:

1. Подбор условий для высокоскоростного культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana*;
2. Подбор условий направленного культивирования микроводорослей (спектр света; содержание нитратов в среде) для увеличения содержания липидов;
3. Исследование целесообразности выбора методов сгущения, сушки и дезинтеграции с целью получения сухой биомассы;
4. Выбор параметров экстракции суммы липидов для его максимального выхода;
5. Определение жирнокислотного состава полученных липидов;
6. Проведение токсикологического анализа методом био-тестирования суммы липидов.

Теоретическая и практическая значимость.

1. Разработана высокоэффективная биотехнология получения липидов из сухой биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* с использованием замкнутого цикла за счёт многократного использования растворителей после регенерации и вторичного использования остаточной биомассы в качестве сорбентов для очистки воды.

2. Заключён лицензионный договор с ООО «Элис» на использования разработанной нами биотехнология получения липидов из сухой биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

3. Акт внедрение в учебный процесс. Результаты диссертационной работы используется в учебном процессе при чтении лекции по дисциплинам эко-биотехнология и биотехнология и выполнение курсовых и дипломных работ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований по влиянию технологических режимов направленного культивирования микроводорослей на скорости роста биомассы и липидный состав биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

2. Результаты исследования по выбору подходящих методов сгущения биомассы, дезинтеграции клеток, сушки и экстракции для получения более высокого выхода суммы липидов из микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

3. Характеристика полученной суммы липидов (жирнокислотный профиль, токсикологический анализа).

Степень достоверности результатов работы подтверждается применением современных методов исследования, утвержденных в нормативных документах методик, высокоточного оборудования, а также значительным объемом исследований и применением статистических методов обработки данных. Основные положения коррелируют с известными закономерностями в области исследования.

Апробация работы. Основные научные результаты и положения диссертации докладывались и обсуждались на 11 Международных и Всероссийских научных конференциях: All-Russian research-to-practice conference "Ecology and safety in the technosphere" (Юрга, 2017), International conference (Алушта, 2018), ЕЕСЕ-2018, International scientific conference "Energetics, ecology and construction" (Санкт-Петербург, 2018), I Национальной научно-практической конференции (Керчь, 2018), Неделя науки СПбПУ (Санкт-Петербург, 2018), Biosystems Engineering BSE 2019

(Тарту-Эстония, 2019), International science and technology conference "Earth science" (Русский-Владивосток, 2019), Третья международная конференция. Физика - Наука о жизни, (Санкт-Петербург, 2019), Всероссийский научно-практический Форум «Экологический форсайт» (Саратов, 2019), Алферовский форум «Физика микро- и наносистем» (Санкт-Петербург, 2020), Международная научно-практическая конференция «Германия и Россия: экосистемы без границ» (Калининград, 2020).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 публикаций, включая 5 статьи в журналах, рекомендованных к изданию ВАК РФ и 12 статьи, проиндексированные в системе Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 главы, выводов, списка использованной литературы включающего 376 наименований, приложений. Работа изложена на 195 страницах, содержит 22 таблиц и 49 рисунков.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Общая характеристика микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Мир сталкивается с рядом глобальных проблем, связанных с быстрым ростом населения и ускорением человеческой деятельности. Существует острая необходимость в новых целостных подходах для решения таких проблем, как экологический и продовольственный кризис [1]. Фактические схемы потребления и производства не считаются устойчивыми в долгосрочной перспективе. Исследования показывают, что нынешний способ производства продуктов питания оказывает несколько негативных воздействий на окружающую среду и здоровье человека. Чрезмерная эксплуатация пахотных земель, использование пестицидов и даже повышение концентрации CO₂ в атмосфере способствуют снижению качества производимых пищевых продуктов, которые стали менее питательными [2,3]. Кроме того, некачественные продукты питания и не здоровая пища стали распространенной проблемой во многих странах, когда люди потребляют продукты, в которых отсутствуют рекомендуемые уровни ценных компонентов, таких как полифенолы, антиоксиданты и Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) [4,5]. По этим причинам существует потребность в новых устойчивых источниках пищи, богатых ценными питательными веществами, которые будут производиться более экологически чистым способом.

В настоящее время ученые активно изучают микроводоросли, поскольку эти микроорганизмы обладают ценными свойствами, которые предлагают многочисленные применения. Их потенциал еще более интересен, поскольку он может способствовать решению ранее упомянутых проблем.

Микроводоросли использовались людьми в течение тысяч лет. Первые записи о потреблении микроводорослей в пищу датируются 2000 лет назад, когда китайцы использовали *Nostoc*, чтобы пережить голод [6]. Историческая литература показывает, что сине-зеленые микроводоросли спирулина

использовались для потребления человеком в Чаде, Африка, в течение 9-го века и в Мексике Ацтеками с 13-го по 16-й век [8]. Тем не менее, биотехнологии микроводорослей действительно начали развиваться только в середине прошлого века [6]. Совершенствование технологий культивирования микроорганизмов открыло путь для новых потенциальных решений проблем, связанных с энергетикой и пищевой и кормовой промышленностью. В начале 1950-х годов НАСА (Национальное управление по аэронавтике и исследованию космического пространства) начало изучать возможность использования биомассы водорослей и микроводорослей в качестве пищи во время длительных космических путешествий [7]. Идея использования богатые белком микроводорослей для решения продовольственного кризиса в нескольких частях мира была довольно соблазнительной, но слишком амбициозной в то время.

Микроводоросли обладают обширным биоразнообразием с предполагаемым числом видов от 200 000 до 800 000, из которых примерно 35 000 были классифицированы [9]. Существует очень мало видов микроводорослей, которые имеют коммерческое значение, и еще меньше подходят для потребления человеком. Среди них *Chlorella sp.* и *Spirulina plantensis* доминируют на рынке микроводорослей, так как они содержат ценные компоненты, которые имеют множество применений. Среди продуктов на основе микроводорослей: биологически активные добавки, красители, фармацевтические препараты, антиоксиданты, косметика и сухая биомасса для пищевых продуктов, кормов и аквакультуры [10].

Статистические данные показывают, что количество научных публикаций в мире по микроводорослям значительно возросло с 1970 года, что согласуется с ростом глобального интереса и рыночного спроса на продукты, полученные из микроводорослей [11]. Наблюдается четкая тенденция для потенциальных видов биотоплива на основе микроводорослей, поскольку некоторые виды, такие как хлорелла, способны накапливать большое количество липидов и углеводов, которые являются

большим биоэнергетическим ресурсом [12]. Кроме того, микроводоросли обладают рядом преимуществ перед традиционными культурами для производства биотоплива и других продуктов. Микроводоросли требуют меньше воды, чем зерновые культуры, и их можно выращивать на непахотных землях, что немаловажно для минимизации воздействия на окружающую среду [13]. Тем не менее, исследования показывают, что прежде, чем продукты, полученные из микроводорослей, станут действительно устойчивыми и экономически эффективными альтернативами, необходимы значительные прорывы в технологии культивирования, сбора и биопереработки микроводорослей [14]. В исследовании Ruiz J. и др. 2016 было доказано, что метод каскадного производства гораздо более выгоден, чем другие существующие схемы производства. Это подразумевает извлечение и использование как можно большего количества ценных соединений и их продажу в различных отраслях промышленности [15]. Несмотря на то, что сухая биомасса микроводорослей может потребляться в целом, исследования рекомендуемых суточных доз, усвояемости, токсичности и биодоступности питательных веществ проводятся очень мало [47]. Кроме того, вкус и другие органолептические характеристики биомассы микроводорослей должны быть приняты во внимание для ее успешного и длительного введения в рацион человека [17]. Предлагается использовать липидные экстракты микроводорослей, богатые ПНЖК, в качестве альтернативы рыбным продуктам, чтобы компенсировать недостаток Омега-3 в рационе современного человека и избавить окружающую среду от разрушительного воздействия чрезмерного рыболовства [18]. В данном случае возможна модель производства замкнутой экономики, когда остаточная биомасса после экстракции может быть переработана для нескольких целей. Например, для производства сорбирующих материалов для очистки сточных вод [19], а также для производства биогаза анаэробной брожение [20]. Этот биогаз может быть использован в качестве биотоплива (CH_4) и для интенсификации фотосинтеза в процессе культивирования

микроводорослей (CO₂) [21]. В ходе этой работы микроводоросли *Chlorella sorokiniana* были выбраны в качестве объекта исследования для получения биологически активного продукта, содержащего ПНЖК.

1.1.1. Биология и свойства микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

- *Таксономия.* *Chlorella sorokiniana* - эукариотическая зелёная микроводоросль. Название *Chlorella* происходит от греческого слова *Chlorus*, что означает зеленый. Впервые она была выделена Сорокиным (в честь которого она была названа) и Мейерсом в начале 1950-х годов и первоначально считалась термостойким мутантом *C. pyrenoidosa* [22]. Более поздние таксономические исследования хлоропластной 16S рДНК и 18S рРНК идентифицировали *C. sorokiniana* как отдельный вид (Таблица 1.1) [23]. Эта микроводоросль представляет коммерческий интерес, поскольку она обладает способностью быстро размножаться, накапливать большое количество липидов и других ценных соединений и признана достаточно устойчивой для крупномасштабного культивирования [76,25].

Таблица 1.1 – Биологическая систематика микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Империя	Eucaryota
Царство	Plantae
Парафилия	Viridiplantae
Отдел	Chlorophyta
Тип	Chlorophyta
Класс	Trebouxiophyceae
Порядок	Chlorellales
Семейство	Chlorellaceae
Род	Chlorella
Вид	sorokiniana

- *Цитология. C. sorokiniana* - это одноклеточная неподвижная пресноводная микроводоросль сферической формы, которая также обнаружена в сточных водах (Рисунок 1.1) [26,27]. В среднем размер *C. sorokiniana* в фотоавтотрофных условиях составляет от 2 до 4 мкм в диаметре, но может увеличиваться до 8 мкм в миксотрофных условиях [28]. Она содержит парietальный хлоропласт, состоящий из каротиноидов, хлорофилла а и в, пиреноида, тилакоидов, генетического материала и крахмальных зерен. Крахмал является основной формой хранения углеводов клетки. Цитоплазма также содержит другие органеллы, такие как ядро и ядрышко, митохондрии, рибосомы, тело Гольджи, липидные капли и вакуоли. Клеточная стенка состоит из трехслойных мембран, толщина которых варьируется в зависимости от цикла роста клеток и условий окружающей среды. Во время процесса созревания формируется микрофибриллярный слой, представляющий собой хитозаноподобный слой, состоящий из глюкозамина, придающего клетке жесткость и защиту [28-30].

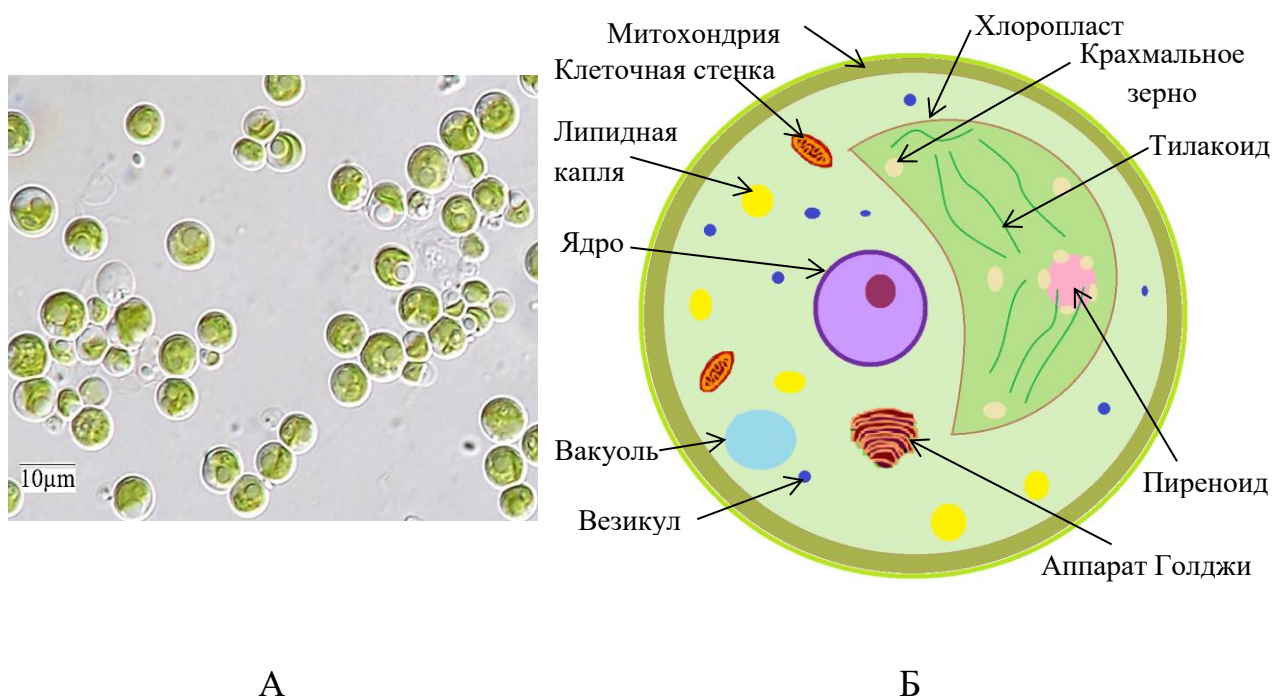


Рисунок 1.1 – Цитология микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

А- Изображение оптического микроскопа клеток *C. sorokiniana* - Коллекция

культур водорослей Карлова университета в Праге; Б- Схематическая
ультраструктура микроводорослей *Chlorella*

- *Размножение.* *C. sorokiniana* имеет бесполой режим размножения и высокую скорость деления (одно деление каждые 4-6 часов в фототрофных условиях) [31]. Маточная клетка делится на четыре споры, которые выходят и прорастают, давая 4 независимых организма, идентичных тем, которые их произвели [3230]. Этот процесс аутоспоруляции является наиболее распространенным бесполом размножением водорослей [30]. Однако недавние геномные исследования показали возможность полового размножения и структуры, происходящей из жгутиков, которые могут быть вовлечены в процесс мейоза [33-34]. Эта характеристика, обнаруженная у разных штаммов *C. sorokiniana*, представляет большой интерес для генной инженерии, поскольку её можно использовать для изменения и улучшения выходов биомассы и биопродуктов [33].

- *Режим питания.* Штаммы хлореллы являются фотосинтезирующими микроорганизмами, то есть обладают способностью использовать энергию света, CO₂ и воды для производства органических соединений. Этот режим питания называется фототрофным или фотоавтотрофным, в котором как растворенный CO₂, так и бикарбонат (HCO₃⁻) могут использоваться в качестве источников неорганического углерода для фотосинтеза [35].

Тем не менее, микроводоросли хлореллы не ограничиваются этим способом питания, поскольку они также могут расти в гететрофных и миксотрофных условиях [36]. Гетеротрофный (также называемый хемотротрофный) рост подразумевает, что микроводоросли могут расти в темноте с добавлением простых органических молекул, таких как глюкоза или ацетат, в качестве источника углерода и энергии [35]. Миксотрофные условия - чередование фототрофных и гетеротрофных режимов питания [37]. Таким образом, микроводоросли хлореллы по определению являются миксотрофными организмами, поскольку они могут использовать смесь

различных источников углерода и энергии. Различные способы питания микроводорослей активно изучаются, поскольку они оказывают значительное влияние на состав клеток [37-39]. Исследования на различных штаммах *Chlorella sorokiniana* показывают, что гетеротрофное культивирование увеличивает выход биомассы и общих липидов при уменьшении содержания белка и пигмента. При более высоких концентрациях глюкозы в среде клетки, как правило, накапливают избыток углеводов, превращая их в липиды. Это включает процессы гликолиза и липогенеза, в которых жирные кислоты синтезируются из ацетил-КоА, а затем этерифицируются с образованием триглицеридов [38-40]. Однако полученные жирные кислоты имеют тенденцию быть в основном насыщенными, что менее интересно для пищевой промышленности, но лучше с биоэнергетической точки зрения, поскольку окисление отрицательно влияет на стабильность топлива [38].

- *Пищевая ценность.* Биохимический состав микроводорослей сильно варьируется в зависимости от возраста культуры и условий культивирования [41]. Эти характеристики в настоящее время изучаются и используются для производства биомассы микроводорослей, содержащей более или менее определенные компоненты [42-43]. Одной из наиболее примечательных питательных характеристик хлореллы является высокое содержание белка, который включает в себя большинство незаменимых аминокислот [44]. Он также является значительным источником ПНЖК (олеиновой, пальмитиновой и линоленовой кислот), витаминов и антиоксидантов, таких как каротиноиды, витамины В1, В2, В3, В5, В6, Е и витамин К. Кроме того, исследование состава углеводов выявило присутствие иммуностимулирующих полисахаридов, включая β -1,3-глюкан, галактозу, маннозу, рамнозу, N-ацетилглюкозамид и N-ацетилгалактозамин [45]. Это также один из самых богатых источников хлорофилла, который, как известно, обладает несколькими преимуществами для здоровья, такими как

хелатирование тяжелых металлов, противовоспалительная и антиоксидантная активность [45-46].

В исследовании Velkoua и др. 1997 было установлено, что биомасса *C. sorokiniana*, выращенная при температуре 35 °С, освещенности 7560 люкс (140 мкЕ м⁻² с⁻¹), содержит 40% белка, 30% углеводов и 18% липидов по сухой массе (в фазе экспоненциального роста) [41]. В другом исследовании показано, что различные штаммы *C. sorokiniana* значительно различаются по своему биохимическому составу [47].

Доступность компонентов для пищевых продуктов напрямую связана с их усвояемостью. Прочная клеточная стенка микроводоросли хлореллы ограничивает доступ пищеварительных ферментов к клеточным компонентам. В исследовании Niccolai и др. 2019 было обнаружено, что *C. sorokiniana* имеет более высокое содержание сырого белка и усвояемость *in vitro*. Однако его высокое содержание золы коррелировало с меньшей усвояемостью сухого вещества [47].

Исследования *in vivo* показывают, что жвачные животные имеют в пищеварительном тракте бактерии, продуцирующие целлюлазу, которые дают им способность переваривать клетчатку зеленых стенок микроводорослей [48]. Животные с однокамерным желудком (включая человека) не способны переваривать клеточную стенку микроводорослей, и может потребоваться предварительная обработка биомассы (химический, электрический, термический шок, ферментативная обработка) [49-50]. Также важно выбрать адаптированный метод предварительной обработки, так как некоторые компоненты, такие как белок и жирные кислоты, чувствительны к температуре [51].

- *Использование.* Микроводоросли применяют в различных отраслях; для приготовления пищи, кормов, косметики, нутрицевтиков и удобрений, а также для очистки сточных вод и производства биотоплива [52]. Среди видов, представляющих интерес, микроводоросли хлореллы являются наиболее широко коммерциализированными [53]. Это связано с их высоким

содержанием ценных компонентов, быстрым ростом и устойчивостью в широком диапазоне температур и условий культивирования, что делает возможным их крупномасштабное производство [54]. Тем не менее, по-прежнему существует потребность в значительных технологических усовершенствованиях для более экономически эффективного производства, которое приведет к увеличению производительности биомассы и снижению эксплуатационных расходов [55].

C. sorokiniana содержит большое количество белков, липидов, углеводов, витаминов, что делает его интересным для пищевой и кормовой промышленности [56]. Липиды микроводорослей включают здоровые семейства жирных кислот (омега-3-6-9), такие как олеиновая кислота, линолевая кислота, линоленовая кислота, арахидоновая кислота, эйкозапентаеновая кислота и докозагексаеновая кислота [57]. Несколько исследований показали, что использование микроводорослей в качестве рыбной муки для аквакультуры и кормов для животных положительно влияет на физиологию животных, улучшая их иммунный ответ, устойчивость к болезням и функцию кишечника [57-58].

Кроме того, многочисленные исследования показывают, что микроводоросли обладают огромными преимуществами при их использовании для здоровья, включая пробиотические, антиоксидантные и противовоспалительные эффекты, стимуляцию роста здоровой скелетной кости, хелатирование цитотоксических, иммуностимулирующих и противоопухолевых эффектов [59-61]. Биомасса микроводорослей обычно продается для питания человека в виде таблеток или порошка, которые можно найти в магазинах здоровой пищи. Возможности питания человека микроводорослями очень широки, и хлореллу уже можно найти в конфетах, напитках, закусках и пасте [59]. Одним из наиболее ценных производных продуктов *C. sorokiniana* являются каротиноиды. Эти антиоксиданты обладают множеством преимуществ для здоровья, включая улучшение зрения (лютеин, α -/ β -каротин, зеаксантин) и профилактику

нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний (α -/ β -токоферол, астаксантин и др.) [62]. Также такие пигменты используются для производства биологически активных добавок и косметики [63].

Высокое содержание липидов в клетках хлореллы может быть использовано для питания, а также для производства биодизеля и биопластика [64]. Тем не менее, получение биодизеля из микроводорослей все еще считается неприбыльным на современном этапе развития биотехнологии [65]. Исследования показывают, что использование микроводорослей в качестве источника биотоплива может решить несколько климатических задач. Действительно, зеленые микроводоросли обладают способностью хранить большое количество CO_2 (от 1-5%), что может помочь уменьшить парниковый эффект [66]. Кроме того, можно использовать сточные воды для выращивания микроводорослей, поскольку исследования показали, что микроводоросли естественным образом поглощают загрязняющие вещества, такие как N, P и тяжелые металлы [67].

Хлорелла содержит углеводы в основном в форме крахмала, который можно использовать для производства биоэтанола и биогаза, такого как метан, который можно рециркулировать для выработки тепла или электричества [68]. Кроме того, такие виды, как *C. sorokiniana*, способны производить водород (H_2) в анаэробных условиях, что считается чистым источником энергии [69].

- *Системы для культивирования.* Крупномасштабное культивирование микроводорослей достигается в двух системах культивирования - открытой и закрытой:

- **Открытые системы:** этот тип системы культивирования наиболее широко используется для фототрофного производства биомассы микроводорослей [70]. Впервые он был использован в Японии в форме круглых прудов и до сих пор используется для массового выращивания хлореллы в Азии, а их диаметр может достигать 50 м. Эти пруды имеют ряд недостатков, таких как высокий риск загрязнения культуры, высокое

потребление энергии, низкая продуктивность биомассы и высокая стоимость [71].

Другим типом открытой системы является пруд с принудительным движением (ППД) (рисунок 1.2). Он сделан из залитого бетона или просто закопан в землю и покрыт пластиковым вкладышем, чтобы земля не впитала жидкость [72]. Вращающиеся лопасти используются для создания турбулентности в суспензиях водорослей, обеспечивающих лучший массообмен и аэрацию [55]. ППД относительно экономичны и их легко чистить после выращивания, но они все же имеют ряд недостатков, таких как: недостаточный контроль условий культивирования (дождь, испарение, температура и т. Д.), низкая продуктивность биомассы (из-за ограниченного проникновения световых лучей), загрязнение другими организмами, а также большая занятость земель [73].

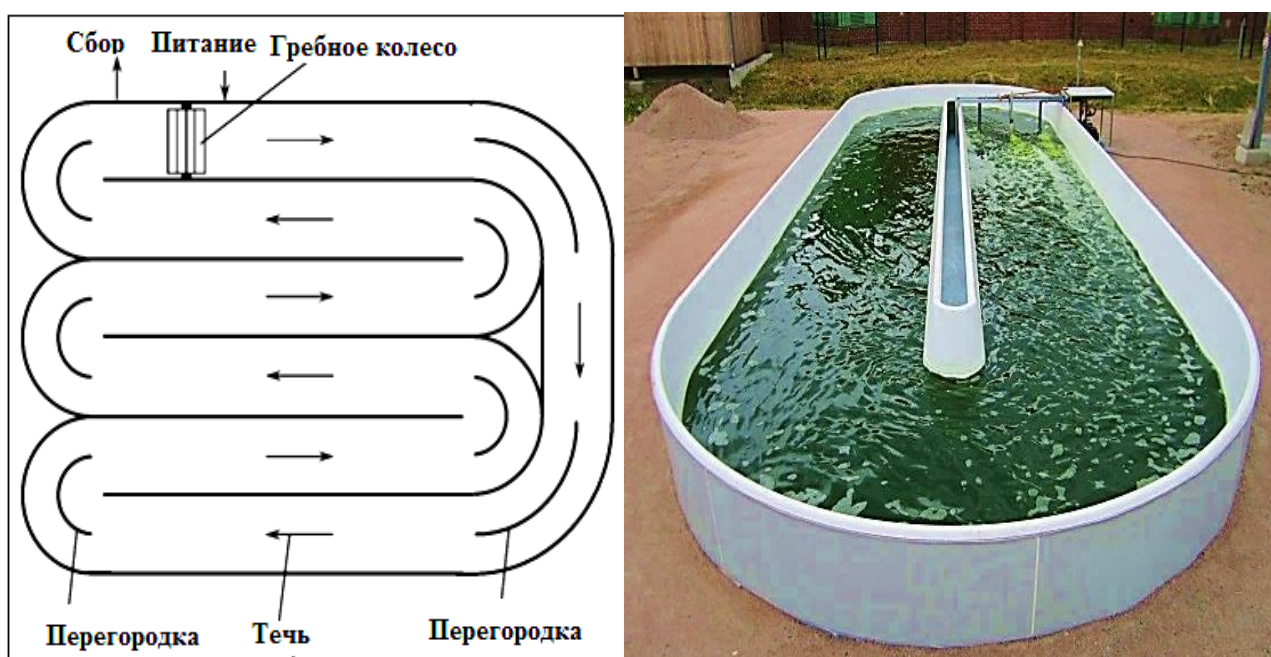


Рисунок 1.2 – Пруд с принудительным движением [72].

Гетеротрофное культивирование в открытых системах невозможно и реализуется только в закрытых ферментерах. Добавление источников органического углерода в форме сахара увеличит рост других микроорганизмов, делая миксотрофный рост в этой системе также

ограниченным, если не будут добавлены другие источники органического углерода, например ацетат [71].

- **Закрытые системы:** Существует несколько типов закрытых биореакторов (рисунок 1.3), таких как: горизонтальный трубчатый фотобиореактор; горизонтальный трубчатый фотобиореактор в вертикальном положении (вертикально уложенный); фотобиореактор с плоскими панелями.

Эти структуры представляют большой потенциал для улучшения по сравнению с открытыми системами, поскольку существует множество степеней свободы дизайна. Согласно опубликованным данным, плоские панели являются наиболее продуктивным и экономичным вариантом для культивирования микроводорослей [14]. Закрытые системы снижают вероятность загрязнения и их легче контролировать, но они экономически целесообразны только для производства ценных компонентов [71-74].

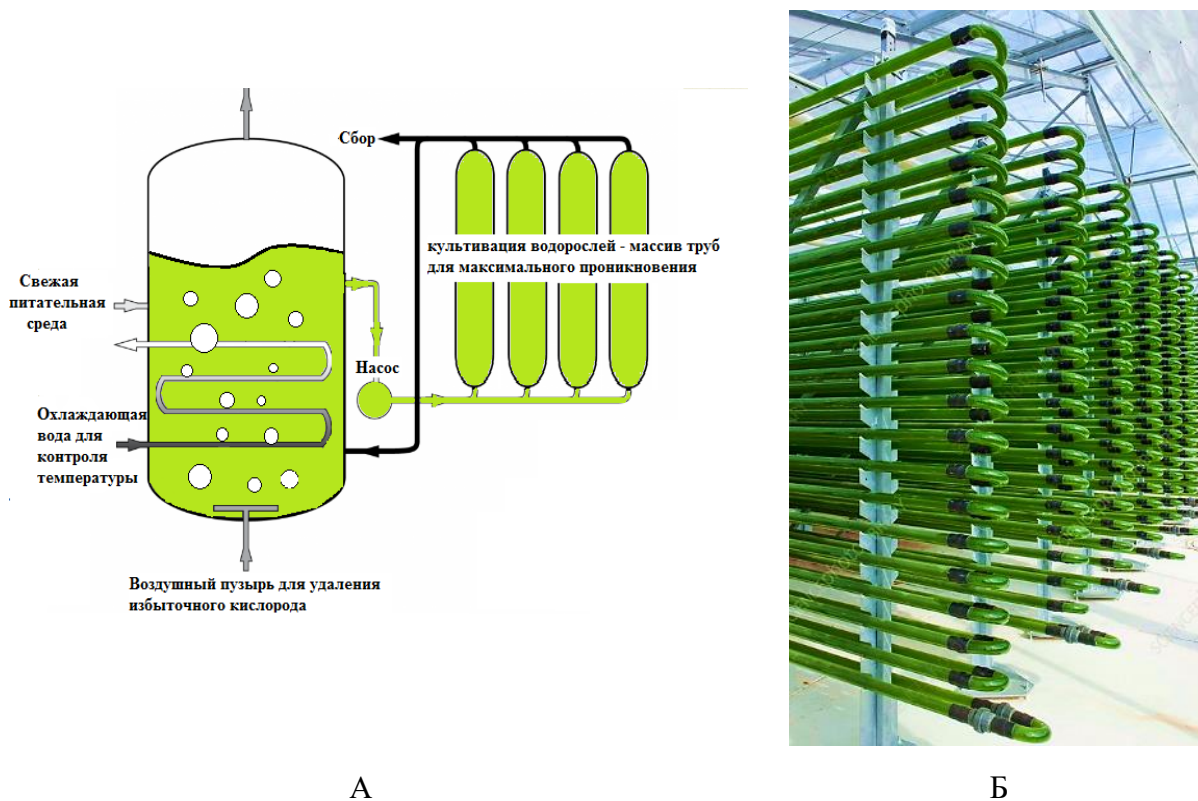


Рисунок 1.3 – Закрытая система культивирования:

А- Схема биореакторов с трубчатыми коллекторами [75]; Б- Трубчатые фотобиореакторы компании Roquette Klötze & Co. KG (Германия)
(Фотография©: Паскаля Гетгелюка)

Биомассе зеленых микроводорослей обычно требуется вода, свет, углекислый газ, органические соли и соответствующая температура [76].

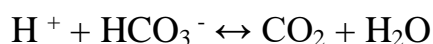
Условия культивирования.

Температура. Многие научные работы посвящены определению оптимальной температуры для высокоскоростного культивирования *C. sorokiniana*. Для этих целей рост микроводорослей оценивали в диапазоне температур 20-45 °С. Результаты показывают, что оптимальный рост достигается при 30 °С, и почти такой же профиль роста получается в диапазоне 30-40 °С [77-78] с фототрофным удвоением один раз в 4-6 часов [79]. Однако выше 40 °С рост микроводорослей резко снижается [78]. Эти результаты были похожи в нескольких исследованиях, где температурный интервал 28–32 °С был признан подходящим для роста *C. sorokiniana* [43].

Низкая температура снижает многие клеточные активности, такие как способность использовать световую энергию и цепь переноса электронов [80]. Экспериментально показано, что низкие температуры (ниже + 20 °С) увеличивают чувствительность клеток к более высокой интенсивности света [81-82]. Кроме того, температура может влиять на цитозольный pH и другие физические процессы [83].

pH. Согласно исследованиям по культивированию микроводорослей, pH является одним из наиболее критических условий окружающей среды, поскольку он определяет растворимость и биодоступность CO₂ и питательных веществ, оказывает значительное влияние на рост, метаболизм и состав микроводорослей [84]. Клетки микроводорослей поддерживают нейтральный или слегка щелочной цитозольный pH, поскольку многие ферменты сильно зависят от pH и становятся неактивными при кислотном значении pH [85]. Величина pH играет ключевую роль, поскольку клеточный гомеостаз сохраняется за счёт процессов диффузии между микроводорослью и её средой через клеточную мембрану [86]. Колебания pH также влияют на устойчивость культур микроводорослей к тяжелым металлам [87], что является важным фактором, который следует учитывать при использовании

микроводорослей для очистки сточных вод. Высокие значения pH уменьшают доступность CO₂, подавляя рост клеток [88]. С другой стороны, высокий уровень pH может подавлять нежелательные биологические загрязнения [89]. pH культур микроводорослей естественным образом повышается в течение дня из-за поглощения неорганического углерода микроводорослями. Преобразуя растворенный HCO₃⁻ в CO₂, H⁺ расходуется внутри элемента в соответствии с равновесием:



Чтобы поддерживать нейтральную среду клетка поглощает H⁺ из окружающей среды, следовательно, понижая pH среды [90]. Для контроля pH в раствор вводят CO₂, добавляют буферные растворы и регулируют содержание кислоты / основания [91].

Оптимальное значение pH для роста микроводорослей зависит от штамма. В исследовании Qui и др. 2017 было установлено, что оптимальное значение pH для роста штамма *C. sorokiniana* UTEX В 3016 является слегка кислым (pH 6,5) с использованием CO₂ для поддержания стабильного значения pH среды во время культивирования. Однако авторы пришли к выводу, что наиболее экономически целесообразно поддерживать уровень pH на уровне 8,5, поскольку для этого потребуется меньше углекислого газа [91]. При этом значении рост биомассы снижался при сохранении аналогичного содержания липидов. Другое исследование показало, что начальный pH 7,5 был оптимальным для роста *C. sorokiniana* (без указания штамма). Это также подтвердило, что как кислый, так и щелочной pH ингибировали рост этих микроводорослей [92].

Освещение. Зеленые микроводоросли производят свои собственные питательные вещества, используя свет, воду и углекислый газ в процессе фотосинтеза в фотоавтотрофных условиях [93]. Поскольку свет является источником энергии, которая направляет фотосинтез, интенсивность, длина волны света, ослабление света и фотопериод играют важную роль в повышении эффективности биомассы микроводорослей [94].

- Фотосинтез у микроводорослей. Процесс фотосинтеза происходит в мембранах тилакоидов, расположенных внутри хлоропластов. Он включает в себя два основных этапа: светозависимые и темные реакции [95]. Во время светозависимых реакций фотоны света собирают первичные пигменты, называемые хлорофиллами - замещенное тетрапиррольное кольцо с центром на ионе магния, образующее структуру, очень похожую на структуру гемовой группы, обнаруженной в гемоглобине [46]. Их роль заключается в поглощении световой энергии, которая впоследствии преобразуется в химическую энергию. Каротиноиды, также называемые вспомогательными пигментами, участвуют в захвате энергии фотонов. Кроме того, они играют очень важную роль в защите фотосинтетической системы, удаляя токсичные соединения, образующиеся, когда микроводоросли подвергаются воздействию слишком высокой интенсивности света, и рассеивая избыточную энергию в виде тепла [111].

Электроны, пожертвованные водой, передаются двум типам фотосинтетических единиц: PS II и PS I. Наряду с комплексом цитохрома; они преобразуют воду и фотоны в аденозинтрифосфат (АТФ) и носитель электронов никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) и генерируют кислород. Затем АТФ и НАДФН используются для фиксации CO₂ в цикле Кальвина в последующих темных реакциях, продуцирующих глюкозу [96-97-98].

Свет является наиболее важным фактором, влияющим на автотрофный рост и фотосинтетическую активность микроводорослей [99]. Поскольку свет является источником энергии, которая направляет фотосинтез, интенсивность, длина волны света, ослабление света и фотопериод играют важную роль в повышении эффективности биомассы микроводорослей.

- Влияние интенсивности света: Чтобы упростить наблюдаемое влияние интенсивности света на фотосинтезирующие организмы, ученые предложили схему, которая объясняет, что происходит на молекулярном уровне. Системы захвата фотонов (PSII и PSI) и связанные с ними

реакционные центры фотосинтеза все вместе называют «Photosynthetic Factories» (PSF). У большинства микроводорослей PSF имеет три состояния: состояние покоя; активированное (или возбужденное) состояние и подавленное состояние (рисунок 1.4). Если блок света попадает в PSF, он вызывает переход из состояния покоя в активированное состояние. PSF преобразует поглощенную энергию под действием внутриклеточных ферментов для запуска фотосинтетических реакций и возвращается в исходное состояние покоя. Однако, если фотон попадает в PSF в возбужденном состоянии, он вызывает его переход в инактивированное состояние из-за фотоокисления и избыточной энергии возбуждения [100]. Этот эффект, также известный как фотоингибирование, вызывает снижение роста фотосинтезирующих организмов при воздействии слишком интенсивного освещения. PSF в конечном итоге возвращается к своему первоначальному состоянию покоя через некоторое время [99-100].



Рисунок 1.4 – Схема переходных состояний PSF

Система разумно объясняет взаимосвязь между скоростью роста микроводорослей и интенсивностью света. Подходящие условия освещения могут стимулировать ускоренный рост микроводорослей. Однако слишком сильная или слишком слабая световая энергия может сделать клетки микроводорослей неспособными нормально выполнять фотосинтез, что не выгодно для микроводорослей [101,102].

Исследования влияния интенсивности света на количество и качество биомассы показывают, что она контролирует не только скорость роста [103], но и клеточный состав [104]. Из литературных данных известно, что *C. sorokiniana* особенно устойчива к воздействию света высокой интенсивности, что является значительным преимуществом для крупномасштабного выращивания на открытом воздухе, где интенсивность солнечного света может превышать $2000 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ [82]. Газоразрядные, светодиодные и люминесцентные лампы используются в качестве источников света для роста микроводорослей. Известно, что оптимальная интенсивность освещения для роста этой микроводоросли находится в диапазоне 8100–10800 Лк (дневное освещение интенсивностью 150-200 $\text{мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) [105]. Авторы [105] исследовали влияние различных физико-химических параметров на рост *C. sorokiniana* с последующим определением питательной ценности его биомассы. В этой работе было установлено, что интенсивность света 7400 люкс ($100 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) с помощью люминесцентной лампы наиболее подходит для роста *C. sorokiniana*. В литературе можно найти разные результаты о влиянии интенсивности света на рост микроводорослей, что можно объяснить различием в конструкции биореакторов, затенении клеток и типе источника света.

Влияние фотопериода на микроводоросли. Было установлено, что продолжительность фотопериода влияет на рост и питательный обмен микроводорослей. Следовательно, продуктивность и качество биомассы могут быть улучшены или ухудшены в зависимости от воздействия света [107]. Данные показывают, что продолжительность фотопериода и циркадного (суточного) ритма фотосинтеза микроводорослей варьируется от вида к другому. Установлено, что микроводоросли *Chlamydomonas incerta* обладают высокой продуктивностью и эффективностью удаления загрязняющих веществ в дневном и ночном режиме в 12:12 часов [108]. Другое исследование показало, что световой режим 8:16 часов (день/ночь) и интенсивность света 3375 Лк дали лучшие результаты с точки зрения

скорости роста *Chlorella vulgaris*. Кроме того, состав жирных кислот значительно изменился при различных режимах освещения. Более низкие интенсивности света с фотопериодом 8:16 дали более высокие концентрации ПНЖК [109]. Более раннее исследование показало, что штамм *C. sorokiniana* имел более высокую скорость роста при воздействии непрерывного освещения [110].

- *Влияние цикла свет-темнота и затенения.* Чтобы получить более высокую продуктивность биомассы, ученые искали методы для оптимизации использования света микроводорослями. Проникновение света через суспензию микроводорослей зависит от различных параметров, включая плотность культуры, интенсивность света и тип используемого биореактора. Цикл «свет-темнота» относится к фазам, когда микроводоросль подвергается воздействию высокой интенсивности света (когда ячейка ближе к источнику света) и меньшей интенсивности света из-за ограниченного проникновения света, как показано на рисунке 1.5. Кроме того, высокая плотность клеток приведет к эффекту затенения. Продолжительность цикла будет зависеть от эффективности процесса перемешивания. Было доказано, что очень быстрое чередование между высокой интенсивностью света и темнотой может значительно повысить эффективность фотосинтеза, что приводит к так называемому эффекту мигающего света. Считается, что это максимизирует фотонакцептивную способность PSII [111].

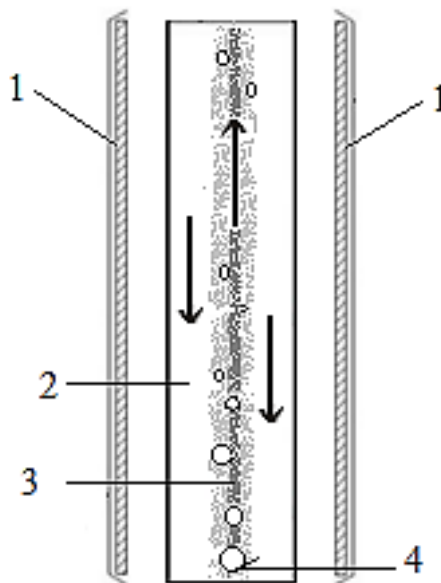


Рисунок 1.5 – Схема прозрачного цилиндрического фотобиореактора:

1-источник света; 2 - фотонная зона; 3 – темная зона; 4- аэрация воздухом.

- *Влияние спектра света.* Для фотосинтеза микроводоросли используют длины волн света от 400 до 700 нм [111]. Поскольку внешний солнечный свет не может контролироваться из-за географических и климатических особенностей, искусственные источники света широко используются для культивирования микроводорослей для повышения продуктивности биомассы и удовлетворения потребностей в энергии в контролируемых условиях. Исследования показывают, что длина волны света играет важную роль в метаболизме водорослей [112], и этот эффект является видоспецифичным из-за различий в метаболических путях [113], пигментации и фоторецепторах [114]. По этим причинам определение оптимальной длины волны света для роста микроводорослей является одним из основных исследуемых параметров [115].

Было установлено, что красный свет является оптимальным для роста *Chlorella vulgaris* [115, 116], а красные светодиоды дают наибольшее количество клеток и наибольшую сухую массу биомассы [117]. Кроме того, Ким и соавторы. сообщили, что плотность клеток *C. vulgaris*, выращенных

при красном свете, была в 1,5 раза выше, чем при синем свете после первого дня инокуляции [118].

Chlorella pyrenoidosa проявляет более высокие темпы роста при выращивании при воздействии синего света (450–495 нм) по сравнению с тем, когда он подвергался воздействию зеленого, красного и белого света [119]. В исследовании [114], рост микроводорослей *Porphyra umbilicalis* был лучше при красном свете, чем при голубом. Кроме того, что касается содержания пигмента, то *Haematococcus pluvialis*, культивируемый при синим светодиоде (СИД), показал более высокие уровни астаксантина, чем при красном [120]. Также было установлено, что деление клеток *Chlamydomonas reinhardtii* регулируется качеством света. Размер клеток, выращенных при синим свете, был больше, чем при красном, из-за задержки в процессах деления клеток [121].

Большое количество ферментов, участвующих в метаболизме фотосинтетического углерода и синтезе хлорофилла, подвержены воздействию синего света [122]. Руйтерс [122] заявил, что синий свет усиливает регуляцию активации ферментов и транскрипции генов. Когда клетка повреждена красным светом, синий свет позволяет клетке восстанавливаться под воздействием низкой интенсивности синего света. Кроме того, Атта [123] отметил, что синий светодиод позволяет интенсивности света проникать глубоко в культуру, тем самым увеличивая удвоение микроводорослей и быстрее увеличивая плотность клеток. В недавнем российском исследовании было показано, что наилучшие результаты для роста *Chlorella vulgaris* были получены при имитации натуральных изменений спектра дневного света, которые происходят в природе: синий утром, белый в полдень и красный вечером [124].

Микро и макроэлементы. Рост и выживание микроводорослей требуют благоприятных условий окружающей среды, среди которых наличие определенных количеств питательных веществ и витаминов. Макронутриенты являются элементами, которые необходимы клетке в

относительно больших количествах (10^{-4} - 10^{-2} М) и используются в качестве строительного материала для клетки. К ним относятся углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, калий и магний. Микронутриенты обычно представляют собой металлические составляющие ферментов, которые вступают в биологические реакции. Они необходимы для правильного функционирования обмена веществ и требуются в небольших концентрациях (10^{-5} М и менее). Среди них можно выделить железо, марганец, медь, цинк, молибден, хлор, бром и т. Д. Исследования показали, что микроводоросли требуют значительно меньшего количества микроэлементов во время гетеротрофного роста, чем автотрофный рост, что является показателем того, что для фотосинтеза эти элементы необходимы для правильного функционирования систем сбора и преобразования энергии фотонов [125].

Азот считается одним из наиболее ограничивающих факторов роста микроводорослей и растений. Он является основным компонентом белка и хлорофилла, от которого зависят основные жизненные процессы в растительных клетках [126]. Было показано, что ограничение азота снижает рост биомассы микроводорослей *C. sorokiniana*, а также содержание хлорофилла и белка при одновременном увеличении содержания каротиноидов и общего содержания липидов. С другой стороны, исследование профиля жирных кислот показывает, что культивирование микроводорослей в условиях истощения азота увеличивает количество насыщенных жирных кислот и снижает количество ПНЖК [127]. Таким образом, концентрация азота в питательной среде может быть использована в качестве модулирующего фактора для производства биомассы, содержащей больше или меньше определенных ценных соединений. Для производства биотоплива высокое содержание насыщенных / ненасыщенных жирных кислот было бы предпочтительным для процесса переэтерификации [127-128]. Фосфор является еще одним ключевым фактором для роста водорослей. Известно, что он является составной частью нуклеиновых кислот, АТФ, и играет значительную роль в клеточных метаболических процессах,

связанных с передачей энергии, передачей сигнала, фотосинтезом и дыханием [129]. Было показано, что истощение фосфора оказывает такое же влияние, что и азотное голодание на рост, и содержание микроводорослей [130].

Считается, что железо является наиболее важным микроэлементом для клеток зелёных микроводорослей, поскольку оно входит в процесс синтеза хлорофилла. Он является неотъемлемой частью цитохромов и ферредоксина, носителей электронов в цепи фотосинтетического транспорта электронов. Дефицит железа в среде вызывает замедление роста, низкую фотосинтетическую активность и снижение содержания хлорофилла, что делает клетки желтоватыми [131]. Магний (Mg) занимает центральное место в структуре хлорофилла; следовательно, клетки теряют хлорофилл в культуре с дефицитом Mg. Дефицит Mg также нарушает деление клеток [131]. Цинк (Zn) необходим для нормального функционирования ферментных систем внутри водорослей, особенно тех, которые катализируют фотосинтез и метаболизм, например, кислой фосфатазы и щелочной фосфатазы [132]. Низкая концентрация цинка может способствовать росту водорослей, однако более высокая концентрация Zn^{2+} может вызывать деградацию нуклеиновой кислоты и ингибирование как образования NADPH в хлоропласте, так и клеточного уровня АТФ [133].

1.2. Классификация липидов

1.2.1. Общая классификация липидов

Определение липидов остается сложной задачей, поскольку они представляют собой очень разнородный класс соединений. В большинстве учебников липиды описываются как органические соединения, которые являются важными составляющими клеток животных, растений и микроорганизмов, растворимы в органических растворителях и не растворимы в воде [135]. Однако это определение оказалось устаревшим, поскольку некоторые соединения, широко известные сегодня как липиды, могут быть более растворимы в воде, чем в органических растворителях.

В.В. Кристи - всемирно уважаемый ученый, специалист в области химии липидов, предложил следующее определение: «липиды - это жирные кислоты и их производные (сложные эфиры или амиды), а также вещества, связанные биосинтетически (например, простаноиды, алифатические простые эфиры или спирты) или функционально с ними. Эти соединения (например, холестерин, токоферолы)» [135].

Классификация липидов микроводорослей.

- Липиды - это соединения с широким спектром химических структур, которые обычно делятся на «**простые**» и «**сложные**» липиды. Простые липиды включают молекулы, не содержащие атомов азота, фосфора или серы. Их также можно определить как липиды, которые образуют не более двух типов первичных продуктов гидролиза. Например, триглицериды представляют собой простые липиды, поскольку при их гидролизе образуются глицерин и жирные кислоты. С другой стороны, при гидролизе сложных липидов образуются три или более первичных продукта [135-136].

- В зависимости от полярности липиды могут быть **нейтральными** (НЛ) и **полярными** (ПЛ), хотя между ними нет четкой границы. Обычно сложные липиды более полярны, а простые липиды менее полярны (нейтральны). Однако свободные (неэтерифицированные) жирные кислоты представляют собой простые липиды, обычно классифицируемые как нейтральные липиды, но не полностью аполярные [135].

- Другие авторы делят липиды на **омыляемые** и **неомыляемые**. Омыление липидов - это гидролиз сложных эфиров жирных кислот в присутствии водной щелочи, который приводит к образованию солей жирных кислот (или мыла) и спирта (глицерина в случае глицеролипидов). Он широко используется в аналитических и промышленных целях, например, для производства мыла; хроматографический анализ некоторых соединений (например, каротиноидов) и фракционирование липидов. Омыляемые липиды (ОЛ) содержат жирные кислоты и, таким образом, могут быть:

- Нейтральные омыляемые липиды: это глицериды (ацилглицерины) и свободные жирные кислоты;

- Полярные омыляемые липиды как фосфолипиды и гликолипиды.

- Липиды, не содержащие в своей структуре жирных кислот, такие как углеводороды, стерины, являются неомыляемыми липидами. [135,137].

Общие липиды относятся к комбинации как омыляемых, так и неомыляемых липидов и являются результатом экстракции липидов с использованием смеси органических растворителей различной полярности [135]. На рис. 1.6 показаны основные липидные группы микроводорослей.



Рисунок 1.6 – Различные классы липидов в микроводорослях.

1.2.1.1. Нейтральные липиды:

а) **Свободные жирные кислоты:** жирные кислоты — это соединения, обычно содержащие четное количество атомов углерода, которые образуются в результате конденсации нескольких молекул малонил-кофермента А, образующих длинную алифатическую цепь, которая может содержать двойные связи и заканчивается карбоксильной группой. Жирные

кислоты без двойных связей называются насыщенными, а те, которые действительно содержат двойные связи, называются ненасыщенными. Последние могут быть мононенасыщенными (если они содержат только одну двойную связь) или полиненасыщенными (с более чем одной двойной связью в своей структуре) [135]. Двойные связи могут иметь цис- или транс-конфигурацию по отношению к плоскости. Номенклатура жирных кислот следует определенному соглашению, а формула жирной кислоты записывается следующим образом:



где: x - количество атомов углерода;

y - количество двойных связей в цепи;

z - углерод, у которого появляется первая двойная связь, начиная с некарбоксильного (COOH) конца;

n - часто заменяемый на ω (омега) - локант метильного конца ЖК.

Следуя этому соглашению, стеариновая кислота будет C18:0 (насыщенная ЖК); а омега-3 ПНЖК докозагексаеновая кислота (ДГК) и эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) записываются как C22: 6 (n-3) и C20: 3 (n-3) соответственно.

Липиды микроводорослей содержат от 4 до 70% свободных жирных кислот (СЖК) в зависимости от вида [138]. Масла, полученные из микроводорослей, должны быть проверены на содержание СЖК перед их использованием в пищевой или биотопливной промышленности, поскольку эти компоненты отрицательно влияют на процесс переэтерификации и устойчивость масла к окислению [139].

б) Глицериды: Ацилглицерины представляют собой эфиры глицерина и одного (моноглицериды), двух (диглицериды) или трех (триглицериды) жирных кислот. Триглицериды (Триацилглицериды: ТАГ) являются наиболее распространенными нейтральными липидами в клетках микроводорослей и служат формой хранения энергии [140]. Когда поступление энергии за счет ассимиляции углерода превышает

непосредственные метаболические потребности, микроводоросли имеют тенденцию накапливать больше ТАГ [141]. Эти ТАГ обычно состоят из насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот. Однако некоторые виды, такие как *Nannochloropsis sp.* и *Diacronema lutheri*, частично аккумулируют длинноцепочечные ПНЖК в форме ТАГ [140, 142]. При определенных условиях культивирования, таких как присутствие света и неорганического углерода, клетки микроводорослей активно синтезируют ТАГ, которые хранятся в цитозольных липидных телах. В темноте и / или при неблагоприятных условиях культивирования, таких как дефицит питательных веществ, ТАГ служат в качестве пула жирных кислот (включая ПНЖК) для синтеза полярных структурных липидов [140, 141].

в) Углеводороды: Это соединения с общей формулой $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$. Они образуются в результате расщепления ЖК во время процессов разложения гидропероксида или с помощью определенных метаболических путей (таких как синтез изопрена) и обнаруживаются в свободной форме, а также интегрируются с другими липидами [143]. Некоторые виды, такие как зеленая микроводоросль *Botryococcus braunii*, обладают большой способностью к синтезу и накоплению углеводородов и, таким образом, могут быть отличным источником биодизельного топлива [144]. Более того, геохимический анализ углеводородов, естественно присутствующих в бензине, по-видимому, указывает на то, что эти соединения могут быть результатом перекисного окисления липидов [145]. Присутствие необычных углеводородов могло указывать на то, что они были синтезированы предковыми микроводорослями [141].

г) Стерины: Эти амфипатические соединения с полярной гидроксильной группой и аполярной группой гонана образуются в результате биосинтеза испопреноидов. Стерины - важные структурные липиды, которые присутствуют во всех эукариотических организмах и отвечают за текучесть и проницаемость мембранных клеток. Эти липиды чрезвычайно разнообразны в микроводорослях. Некоторые из основных стеринов, обнаруженных в этих

микроорганизмах: холестерин, фукостерин, изофукостерин, клиностерин, дигидроксистерин и другие [140]. Стеролам микроводорослей приписывается ряд полезных для здоровья эффектов, таких как антибактериальная и антиоксидантная активность, антигиперхолестеринемический, антигипертензивный, противоопухолевый, антидиабетический, противовоспалительный ответ [146].

д) Воски: Воск - это простой эфир длинноцепочечного спирта и жирной кислоты. Это разнообразные гидрофобные соединения, обнаруженные в высших растениях, а также в клеточной стенке микроводорослей, защищающие клетку от чрезмерной потери воды и потенциального воздействия окружающей среды [147]. Более того, они также могут представлять собой форму накопления энергии, особенно у организмов из среды обитания в холодной воде [148]. Восковые эфиры микроводорослей вызвали интерес в качестве прекурсоров для производства биодизельного топлива. Лучшее понимание метаболических путей биосинтеза воска может быть ключом к достижению экономически жизнеспособного крупномасштабного производства этого сырья из микроводорослей [149]. В недавней статье обсуждается возможная польза для здоровья масел из морских животных, богатых восковыми эфирами, а также указывается на важность их потребления в умеренных количествах, чтобы избежать возможных побочных эффектов, таких как кериорея [150]. Сложные эфиры воска ПНЖК, по-видимому, обладают более сильным противовоспалительным и противодействующим ожирению мышей, чем этиловые эфиры ЭПК и ДГК, что указывает на то, что воск сам по себе может принести пользу для здоровья [151]. Однако для получения данных о соотношении доза-эффект необходимы дополнительные клинические испытания.

ж) Эйкозаноиды : К ним относятся различные важные молекулы, которые играют роль в передаче сигналов клеток и воспалительной реакции, такие как простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и липоксины. ПНЖК

с длинной цепью арахидоновой кислоты (АК), по-видимому, являются основными продуцентами эйкозаноидов в организме человека [152]. Очень мало исследований посвящено изучению эйкозаноидов в микроводорослях, однако исследования показали, что у морских диатомовых микроводорослей *Skeletonema marinoi* путь простагландина подобен животным [153].

1.2.1.2. Полярные липиды:

а) Фосфолипиды: Их структура состоит из группы фосфатидной кислоты, связанной с одним или двумя гидрофобными хвостами, полученными из жирных кислот в положениях *sn-1*, *sn-2* и с гидрофильной головной группой в *sn-3*. Химическая природа гидрофильной группы используется в качестве критерия классификации фосфолипидов (ФЛ). Основными ФЛ, обнаруженными в водорослях, являются фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозит (ФИ) и фосфатидная кислота (ФК) [140, 141]. Эти липиды составляют 10–20% общих липидов у большинства видов водорослей, причем ФГ является доминирующим фосфолипидом в зеленых водорослях (20–47% фосфолипидов) [140]. ФЛ расположены во внехлоропластных мембранах, за исключением ФГ, которые в значительных количествах встречаются в мембранах тилакоидов [154]. Амфифильная природа ФЛ важна для поддержания целостности и проницаемости клеточных мембран. ФЛ характеризуются более высоким содержанием жирных кислот омега-6 по сравнению с галактолипидами, за исключением ФГ, которые содержат значительные количества жирных кислот омега-3, особенно α -линоленовой кислоты. Основными ЖК, присутствующими в ФЛ, являются олеиновая, пальмитиновая, стеариновая кислота, арахидоновая кислота (C20: 4 n-6, АА) и длинноцепочечные омега-3 ПНЖК, эйкозапентаеновая кислота (C20: 5 n-3, ЭПК). Кроме того, Δ 3-транс-гексадеценовая кислота (16: 1, 3t) - необычная ЖК, этерифицированная по *sn-2* положению ФГ, присутствует во всех эукариотических фотосинтезирующих организмах. Считается, что этот ФГ играет решающую

роль в фотосинтетическом процессе [154]. Было обнаружено, что высокая соленость и низкие температуры изменяют состав липидов мембран микроводорослей, в основном за счет увеличения ненасыщенности их фосфолипидных ЖК [155-156]. Интенсивность света часто влияет на степень ненасыщенности и концентрацию мембранных липидов и нейтральных липидов, однако эти изменения сильно различаются от одного вида водоросли к другому [141].

б) Гликолипиды: Структура гликолипидов состоит из глицериновой основной цепи, содержащей один или два сложных эфира жирных кислот в sn-1, sn-2 и моно- или олигосахаридную группу, присоединенную в sn-3 положении. Типичные гликолипиды водорослей включают моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ), дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ) и сульфохинозилдиацилглицерин (СХДГ) [140]. Гликолипиды преимущественно расположены в фотосинтетических мембранах: МГДГ и СХДГ обнаруживаются только в тилакоидных мембранах, в то время как ДГДГ также обнаруживается в экстрапластидных мембранах [157]. Эти липиды играют важную роль в сборке и функциональной регуляции PSII. Гликолипиды водорослей содержат большое количество омега-3 ПНЖК, как и у высших растений, а МГДГ - самый ненасыщенный гликолипид в зеленых и красных водорослях. Гликолипиды пресноводных зеленых микроводорослей в основном состоят из АЛК, однако некоторые виды содержат более высокие концентрации длинноцепочечных ПНЖК (ДГК и ЭПК) [140]. Несколько исследований показывают, что истощение питательных веществ, то есть недостаток азота, углерода и фосфора в среде культивирования, отрицательно сказывается на общем содержании полярных липидов в микроводорослях [158-159]. Эти результаты демонстрируют, что присутствие значительных количеств питательных веществ необходимо для производства ПНЖК из микроводорослей, поскольку эти жирные кислоты в основном содержатся в полярных липидах. Этот фактор важно учитывать при оценке стоимости производства биоактивных полярных липидов [158].

в) Бетаиновые липиды: Бетаиновые липиды содержат полярный бетаиновый фрагмент, связанный простой эфирной связью в sn-3 положении глицерина и сложных эфиров жирных кислот в sn-1 и sn-2 положениях. Они являются обычными компонентами водорослей, но не высших растений. Три типа бетаиновых липидов, присутствующих в водорослях, - это 1,2-диацилглицерил-3-О-4'- (N, N, N-триметил) гомосерин (ДГТС), 1,2-диацилглицерил-3-О-2'- (гидроксиметил) - (N, N, N-триметил) - β -аланин (ДГТА) и 1,2-диацилглицерил-3-О-карбоксо- (гидроксиметил) холин (ДГКХ) [160]. Бетаиновые липиды являются цвиттерионными при нейтральном pH из-за их положительно заряженной триметиламмониевой группы и отрицательно заряженной карбоксильной группы [141]. Согласно данным, морские водоросли ДГТС содержат более высокие концентрации длинноцепочечных ПНЖК в положениях sn-1 и sn-2. С другой стороны, пресноводные водоросли ДГТС в основном состоят из насыщенных жирных кислот (C14: 0 и C16: 0) в sn-1 положении глицеринового остова и кислот C18 (преимущественно C18: 2n-6 и C18: 3n-3) в положении sn-2 [141,161, 162].

1.2.1.3. Прочие липиды.

Другие липидные соединения были обнаружены у ряда видов водорослей, среди которых мы можем указать:

а) Оксипирины: оксигенированные производные, полученные в результате ферментативного (липоксигеназами и диоксигеназами) или химического (авто) окисления ПНЖК. Эти липиды придают водорослям врожденный иммунитет в ответ на биотический и абиотический стресс, такой как патогенные бактерии, травоядные животные, токсичность для ран и металлов [140, 163].

б) Сфинголипиды: некоторые красные водоросли также содержат небольшое количество сфинголипидов, таких как цереброзиды и церамиды. Эти липиды участвуют в восприятии стресса и служат важными сигнальными соединениями [140].

в) **Новые липиды:** в водорослях обнаружен ряд необычных липидов, таких как серосодержащие ФЛ, хлорсульфолипиды, длинноцепочечные алкены (С 35 - С 40), алкеноны, алкеноаты и другие [140].

1.3. Направленное культивирование микроводорослей *Chlorella* для получения биомассы с максимальным содержанием липидов

1.3.1. Накопление липидов в клетках водорослей

Фотосинтезирующие микроводоросли используют солнечную энергию, воду и CO₂, которые ассимилируются в липиды, углеводы и белки [164]. Из этих трех биохимических форм липиды имеют самое высокое содержание энергии [165], что делает их подходящими молекулами с высокой ценностью, особенно для индустрии биотоплива. Глицериды являются важными запасными соединениями для поддержания клеточной активности. При определенных условиях культивирования микроводоросли накапливают связанный углерод в форме триглицеридов, образуя, таким образом, запас углерода и энергии. Некоторые виды микроводорослей могут хранить до 85% своего сухого вещества в виде липидов [166]. В таблице 1.2 представлены сравнительные данные по продуктивности биомассы, содержанию липидов и липидной продуктивности некоторых микроводорослей. Эти числа могут сильно различаться в зависимости от вида, штамма и условий выращивания микроводоросли.

Таблица 1.2 - Продуктивность биомассы, содержание липидов и липидная продуктивность некоторых видов микроводорослей [93,131, 167-169].

Микроводоросль	Производительность биомассы (г/л/день)	Содержание липидов (% сухого веса)	Липидная продуктивность (мг/л/день)
<i>Botryococcus braunii</i>	0.25	25–75	112.43 ± 11.52
<i>Chlorella sp.</i>	0.73	28–32	204.91 ± 6.37
<i>Nannochloropsis sp.</i>	0.17	12-53	91 ± 1.08
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.16	12-14	26.77 ± 2.53

Таблица 1.2 демонстрирует, что продуктивность липидов коррелирует не только с содержанием липидов в биомассе, но также и с продуктивностью биомассы. Эти параметры важно учитывать при выборе штаммов микроводорослей для производства липидов. Согласно приведенным выше данным, *Chlorella sp.* не имеет самого высокого содержания липидов, но его липидная продуктивность самая высокая среди исследуемой группы, что объясняется высокой скоростью роста биомассы.

При благоприятных условиях культивирования микроводоросли продуцируют жирные кислоты, в основном для этерификации, в виде полярных липидов на основе глицерина (5–20% по сухой массе). Эти структурные липиды включают в основном среднецепочечные (C10 - C14), длинноцепочечные (C16–18) очень длинные (\geq C20) ЖК и их производные [170-171]. Мембранные глицеролипиды часто включают длинноцепочечные ПНЖК, которые образуются в результате аэробной десатурации и удлинения цепи «предшественников» ЖК - пальмитиновой (16: 0) и олеиновой (18: 1 ω 9) кислот. В неблагоприятных условиях окружающей среды или стрессе многие микроводоросли изменяют свой липидный обмен в сторону образования и накопления нейтральных липидов (20–50% от сухой массы), в основном в форме ТАГ [170]. В этих типах микроводорослей ТАГ в основном хранятся в виде специальных органелл, называемых масляными тельцами (липидными каплями или олеосомами) [172-174]. Эти органеллы взаимодействуют с другими органеллами, включая хлоропласты, эндоплазматический ретикулум и митохондрии [172].

1.3.2. Механизм липогенеза у микроводорослей

Биосинтез липидов обеспечивает клетки необходимыми ЖК для синтеза структурных липидов и для хранения энергии в форме ТАГ. На рисунке 1.7 представлена общая схема механизма липогенеза в клетках микроводорослей.

Биосинтез ЖК происходит в пластиде, а их расщепление путем β -окисления происходит внутри митохондрий [175]. Для синтеза липидов необходимы:

энергия (обеспечивается АТФ); восстановительная способность (поставляется в форме НАДФН, H^+ , генерируемого, по существу, пентозофосфатным путем); и прекурсор [176].

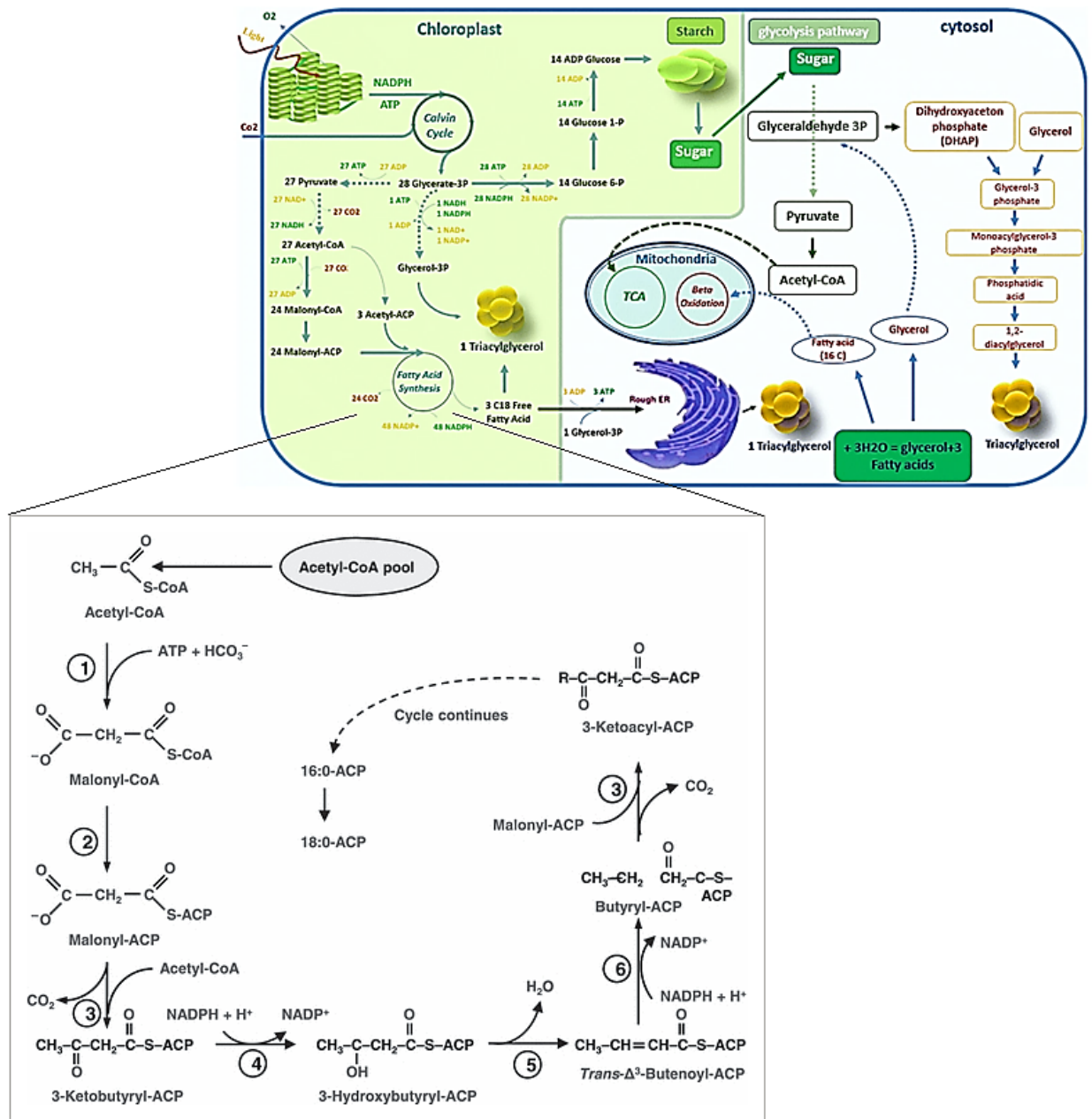


Рисунок 1.7 – Общая схема метаболизма липидов в клетках микроводорослей (адаптировано из [175], [170])

Единственным предшественником синтеза ЖК является ацетил-КоА, который сам является результатом β -окисления жирных кислот (внутри митохондриального), окисления пирувата и окислительной деградации так называемых кетогенных аминокислот [177].

Было высказано предположение, что производный гликолиза пируват является основным источником ацетил-КоА для синтеза *de novo* ЖК в клетках водорослей [170]. Независимо от своего источника, ацетил-КоА должен перемещаться в пластиде для синтеза ЖК [178]. Ацетил-КоА входит в путь синтеза ЖК в качестве субстрата для ацетил-КоА-карбоксилазы, что приводит к образованию малонил-КоА.

Фермент трансфераза малонил-КоА АСР (АСР из английского: acyl carrier protein - Ацилпереносящие белки) переносит малонил от КоА с образованием малонил-АСР. Малонил-АСР является донором углерода для последующих реакций удлинения. После последующих конденсаций образующийся 3-кетоацил-АСР восстанавливается, дегидратируется и снова восстанавливается 3-кетоацил-АСР-редуктазой, 3-гидроксиацил-АСР-дегидразой и еноил-АСР-редуктазой соответственно.

Эти реакции приводят к удлинению жирной кислоты-предшественника на два атома углерода, и цикл продолжается с образованием насыщенных 16:0-АСР и 18:0-АСР [170]. ПНЖК с длинной цепью продуцируются сериями десатурации (растворимым ферментом стеарил АПФ-десатураза) и удлинением (элонгазами) [179]. Удлинение жирных кислот прекращается либо тогда, когда ацильная группа удаляется из АСР тиоэстеразой ацил-АСР, которая гидролизует ацил АСР и высвобождает свободные ЖК, либо ацилтрансферазами в хлоропласте переносят ЖК непосредственно от АСР к глицерин-3- фосфат или моноацилглицерин-3-фосфат [170].

Синтез ТАГ включает три стадии: образование фосфатидной кислоты, дефосфорилирование последней с образованием диглицерида фосфатидилхолина и этерификация спиртовых функций глицерина (см. рисунок 1.8).

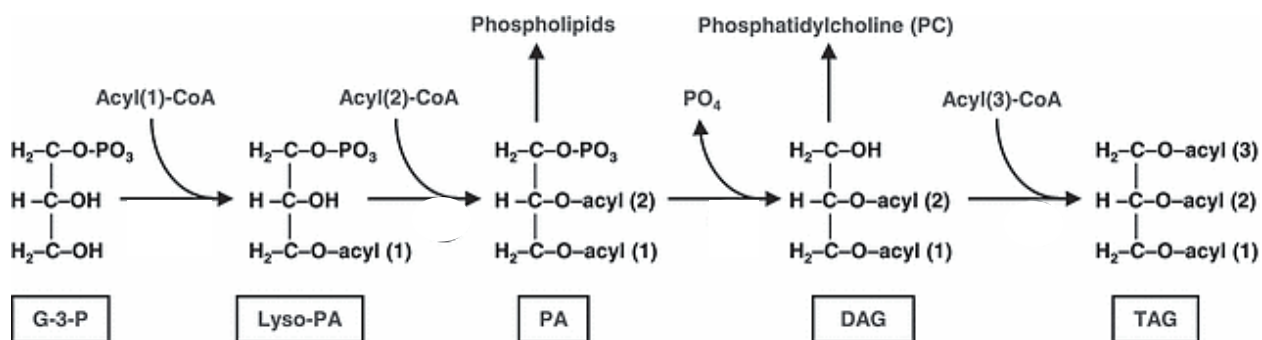


Рисунок 1.8 – Схема пути биосинтеза триацилглицерина у водорослей:

G-3-P: глицерин-3-фосфат, *Lyso-PA*: лизофосфатидная кислота, *PA*: фосфатидная кислота, *DAG*: диацилглицерин, *TAG*: триацилглицерин [170].

1- Образование фосфатидной кислоты: два ацил-КоА реагируют с 3-Р глицерином с образованием фосфатидной кислоты. 3-фосфоглицерин образуется в результате восстановления 3-фосфодигидроксиацетон, образующегося во время гликолиза. Эта реакция катализируется 3-фосфоглицериндегидрогеназой. Первичные и вторичные спиртовые функции глицерина-фосфата этерифицируются действием ацилтрансферазы.

2- Образование диацилглицерина: это результат удаления фосфатной группы из фосфатидной кислоты. Реакция катализируется гидролазой, называемой фосфатидатфосфатазой.

3- Образование триацилглицерина: третья жирная кислота переносится в свободное положение 3 диацилглицерина. Эта реакция катализируется диацилглицерин ацилтрансферазой, ферментативной реакцией, уникальной для биосинтеза ТАГ. Триацилглицерины выделяются в цитозоль в виде липидных капель. Фосфатидная кислота и диацилглицерин также могут использоваться непосредственно в качестве субстрата для синтеза полярных липидов, таких как фосфатидилхолин и галактолипиды [170].

1.3.3. Факторы, стимулирующие накопление липидов

У некоторых штаммов микроводорослей липидная продуктивность намного выше, чем у растительных масличных культур, достигая выхода липидов более чем на 50% от их сухой биомассы [93,180]. Более того, с точки зрения пищевой ценности липиды микроводорослей имеют более

разнообразный состав ЖК, чем растительные масла [181]. К ним относятся ЖК с длиной цепи 12, 16, 18 атомов углерода и даже до 24 атомов углерода [182,183]. Более того, некоторые виды микроводорослей включают ПНЖК, которые редко встречаются в растительных маслах, такие как С16: 2 (гексадекадиеновая кислота), С16: 3 (гексадекатриеновая кислота), С16: 4 (гексадекатетраеновая кислота) и длинноцепочечные ПНЖК с питательными свойствами (С20: 5 ЭПК и С22: 6 ДГК), для которых не существует растительных альтернатив [184]. Тем не менее, промышленное производство липидов микроводорослей требует разработки технологий для снижения затрат на их производство и снижения воздействия на окружающую среду [185]. Максимальное увеличение роста биомассы и производительности - одна из реализованных стратегий для производства рентабельной продукции с высокой добавленной стоимостью. В связи с этим исследования в области генетической и метаболической инженерии сосредоточены на выборе высокопродуктивных видов и выявлении ключевых генов, биохимических процессов и факторов окружающей среды, участвующих в накоплении ценных соединений, таких как липиды, в микроводорослях. Один из традиционных подходов к увеличению продуктивности липидов предполагает изменение питательных факторов и факторов окружающей среды [186].

Накопление липидов запускается из-за энергетического дисбаланса, когда клетки микроводорослей подвергаются воздействию внешних стрессовых факторов, способных нарушить анаболические процессы. Эти неблагоприятные условия можно разделить на **физические** (вариации интенсивности света и длины волны, температуры) и **химические** (рН, истощение питательных веществ, концентрация CO₂, соленость, воздействие тяжелых металлов) [187-191]. В таких средах запас энергии световой фазой фотосинтеза выше, чем потребность в энергии для анаболизма (в частности, для цикла Кальвина). Это приводит к чрезмерному сокращению фотосинтетического аппарата, вызывая образование повреждающих

активных форм кислорода [193]. Исследования показывают, что ТАГ играют роль в защите микроводорослей от этих стрессоров, поддерживая внутриклеточный липидный гомеостаз, клеточную функцию и снабжение энергией [192]. ТАГ, будучи сильно восстановленным соединением, будет захватывать электроны из фотосинтетической цепи переноса электронов, выступая в качестве поглотителя электронов в окислительных условиях [193]. Более того, ТАГ будет служить предпочтительной формой хранения энергии, позволяя клетке продолжать собирать фотонную энергию [193]. Липиды также позволяют клетке, находящейся в состоянии стресса, поддерживать целостность и текучесть своих мембран [194]. Однако, если стресс продолжается, фотосинтетический аппарат разрушается, как и хлорофилл, что приводит к замедлению деления и скорости роста клеток, и снижению продуктивности ТАГ [191].

1.3.3.1. Влияние химических факторов на накопление липидов в биомассе микроводорослей

Оценка влияния стрессоров на состав микроводорослей может быть сложной задачей. Состав биомассы может варьироваться в зависимости от фазы роста, ранее использованных условий культивирования и аналитических методов. Сообщалось о вариабельности профилей ЖК даже у одного и того же штамма из-за различного физиологического состояния [184-195]. Микроводоросли содержат больше белка во время экспоненциальной фазы роста, тогда как в более поздних фазах культивирования они накапливают больше липидов. Более того, концентрация насыщенных ЖК увеличивается в течение ранней стационарной фазы, а затем несколько снижается во время более поздней стационарной фазы [196]. Таким образом, микроводоросли следует собирать до или точно тогда, когда будет достигнуто максимальное содержание липидов в клетках [184].

а) Недостаток питательных веществ. Накопление липидов в клетках микроводорослей при недостатке питательных веществ является результатом временного дисбаланса между потоком углерода от фотосинтеза и потоком

других элементов, необходимых для роста (фосфора или азота). Клетка, которой не хватает одного из этих элементов, не сразу же прерывает захват CO₂, который необходим для фотосинтеза, тогда как она не может использовать его для создания белков, так как, например, нет азота. Следовательно, он должен хранить углерод в молекулах другого типа, таких как липиды [197].

- *Азот (N)*. Доступность азота сильно влияет на липидный обмен микроводорослей. В благоприятных условиях микроводоросли содержат больше полярных липидов (составляющих мембраны), чем нейтральных липидов [198]. Было показано, что недостаток азота увеличивает содержание углеводов, каротиноидов и ТАГ, снижая при этом содержание белка у многих видов микроводорослей [184]. Таким образом, азотный стресс может быть интересной стратегией для увеличения выхода липидов биомассы. Однако недостаток азота также вызывает значительное снижение роста, фотосинтетической активности и содержания пигментов у многих видов [199]. Последнее можно объяснить ремобилизацией клеткой альтернативных источников азота, таких как соединения, связанные с процессами сбора света (включая хлорофиллы) и белка [200]. Двухэтапные стратегии выращивания были разработаны как попытка решить эту проблему. Первая фаза направлена на повышение урожайности биомассы с использованием оптимальных питательных условий, а вторая стимулирует накопление липидов путем введения ограничений по азоту [201, 202]. Тем не менее, исследования профилей ЖК показывают, что условия обеднения азота увеличивают процент насыщенных ЖК и уменьшают ПНЖК [127]. Таким образом, концентрация N в питательной среде может использоваться в качестве модулирующего фактора для производства биомассы, содержащей больше или меньше определенных ценных соединений (рисунок 1.9).



Рисунок 1.9 – Влияние концентрации азота и фазы роста на тип накапливаемых компонентов [203]

Для производства биотоплива для процесса переэтерификации предпочтительно высокое содержание насыщенных / ненасыщенных жирных кислот [127-128]. Kumar и др. изучили влияние источника азота на рост и характер накопления липидов *C. vulgaris*. Результаты пришли к выводу, что нитраты (NO_3^-) были предпочтительной формой азота для роста и накопления липидов по сравнению с диоксидом азота (NO_2), аммонием (NH_4), глицином и мочевиной [204].

- **Фосфор (P)**. Фосфор участвует в механизмах передачи энергии и росте клеток живых систем, что делает его незаменимым макроэлементом [205]. Единицы P-P представляют собой высокоэнергетические связи, которые используются в качестве накопителя энергии в таких ко-факторах, как АТФ и НАДФ (H). P также входит в состав фосфолипидов мембран и P-содержащих белков [206]. Было показано, что KH_2PO_4 является предпочтительной формой фосфора для роста и производства липидов у *C. sorokiniana* [207].

Микроводоросли, растущие в условиях обеднения фосфора, имеют пониженный уровень фотосинтетического фосфорилирования, низкую эффективность цикла Кальвина, что влияет на синтез хлорофилла и деление клеток [208]. При длительном Р-стрессе; в течение цикла Кальвина фиксируется больше CO₂, чем потребляется. В результате увеличивается синтез ТАГ для хранения углерода и энергии, одновременно защищая клетку от фотоокислительного повреждения. Р-голодание также вызывает замену фосфолипидов на сульфо- и бетаиновые липиды [209]. Наконец, отсутствие Р-содержащих ко-факторов в конечном итоге приведет к прекращению синтеза липидов, а затем и к их катаболизму [210]. Влияние Р на состав ЖК является видоспецифичным, что приводит к повышению уровня ПНЖК (гликолипидов) или НЖК [184].

б) Солесодержание. Солесодержание влияет на микроводоросли через осмотический стресс, ионный стресс и изменение проницаемости мембран [93]. Оптимальная соленость варьируется от одного вида микроводоросли к другому [184]. Исследования показывают, что NaCl вызывает накопление ТАГ за счет увеличения синтеза ЖК. Высокая соленость также представляет собой преимущество уменьшения микробного загрязнения культур микроводорослей [211]. Однако высокие концентрации соли снижают эффективность фотосинтеза и рост биомассы и выхода липидов [212]. Изменения профилей ЖК видоспецифичны, однако, механизмы этих изменений еще не выяснены [184].

в) CO₂ и pH. Высокие концентрации CO₂ увеличивают содержание липидов в биомассе микроводорослей, снижая при этом pH среды. pH не имеет прямой корреляции с изменениями метаболизма липидов. Однако оптимальный pH для роста микроводорослей варьируется от одного вида к другому [184]. Инъекция CO₂ — это метод, используемый для контроля pH среды путем компенсации CO₂, потребляемого микроводорослями [184]. Углерод, зафиксированный в течение светового периода фотосинтеза, будет храниться в таких соединениях, как ТАГ. Было также показано, что

концентрация CO₂ влияет на профили ЖК. При высоких концентрациях CO₂ микроводоросли, как правило, содержат большее количество ненасыщенных ЖК, в то время как более низкие концентрации стимулируют накопление насыщенных ЖК [213]. С другой стороны, когда углерод фиксируется в условиях гетеротрофного роста из глюкозы, микроводоросли, такие как *S. sorokiniana*, имеют тенденцию содержать более насыщенные ЖК [38].

г) Металлы. Микроэлементы, такие как железо, цинк, медь, магний и кальций, важны для роста микроводорослей. Однако высокие концентрации этих металлов имеют тенденцию к снижению роста и содержания липидов в биомассе микроводорослей [184]. Было показано, что ионы кобальта и меди очень токсичны для роста микроводорослей. Сообщалось, что пониженная концентрация кобальта в среде увеличивает содержание липидов в клетках [214]. Соответствующие концентрации большинства этих элементов способствуют росту и качеству липидов в микроводорослях [184]. Тяжелые металлы, такие как мышьяк (As (V)) и ванадий (VO₃⁻), могут быть полезны для роста некоторых видов микроводорослей при определенных концентрациях ионов [215]. Более того, некоторые элементы, такие как лантан (La), церий (Ce), неодимий (Nd), европий (Eu) и гадолиний (Gd), были хорошими заменителями кальция в *Desmodium quadricauda* при дефиците кальция [216]. Исследования показывают, что на ЖК профили также влияет воздействие различных концентраций металлов. As (III) увеличивал содержание липидов у *Nannochloropsis sp.* увеличение насыщенных ЖК при уменьшении ПНЖК [217]. Наночастицы нульвалентного железа оказывали противоположное влияние на профили ЖК *Nannochloropsis* и *Trachydiscus* биомассу [218].

1.3.3.2. Влияние физических факторов на накопление липидов в биомассе микроводорослей

а) Интенсивность света. Интенсивность света оказывает значительное влияние на фотосинтетическую активность, содержание липидов и липидную насыщенность. Интенсивность и качество излучаемых фотонов - две важные

характеристики источника света, которые четко регулируют рост микроводорослей [219]. Чрезмерное облучение светом приведет к фотоокислению и фотоингибированию, тогда как низкая интенсивность вызовет снижение скорости роста из-за ограничения света [98]. Исследования влияния интенсивности света показывают, что она не только контролирует скорость роста [99], но также хранение и структурное распределение липидов [100, 101], клеточный состав (белок и незаменимые жирные кислоты) [102] и синтез пигментов [103]. Однако в литературе встречаются противоречивые результаты о влиянии интенсивности света на состав липидов [184]. В обзоре Ни и др. 2008 говорится, что высокая интенсивность света вызывает синтез нейтральных липидов (поглотителей электронов в случае фотоокислительного стресса), а также увеличивает долю насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот [170]. В других исследованиях было показано, что увеличение интенсивности света увеличивает степень ненасыщенности ЖК [220]. Насыщенным жирным кислотам требуется большое количество фотосинтетически продуцируемых АТФ и НАДФН, которые помогают рассеивать избыток световой энергии, защищая клетку от повреждений. ПНЖК являются важным компонентом липидов мембран и, таким образом, поддерживают функцию фотосинтетических мембран. Они также играют роль в адаптации клеток микроводорослей к низкой интенсивности света [220]. Фотопериод и длина световой волны изменяют состав клеток микроводорослей. Голубой свет при фотопериоде от светлого к темному в 12:12 часов потенциально способствовал накоплению липидов у *C. vulgaris* [123].

б) Температура. Температура играет важную роль в регулировании роста и метаболизма микроводорослей [200]. Оптимальная температура для ускоренного роста зависит от вида, однако аналогичные закономерности можно наблюдать у большинства видов. При превышении оптимальной температуры рост микроводорослей снижается. Температура может использоваться как фактор стресса для получения липидов с определенным

составом ЖК. Исследования показывают, что как низкие, так и высокие температуры увеличивают содержание липидов в клетках. Как правило, микроводоросли реагируют на более низкие температуры увеличением соотношения ненасыщенных и насыщенных ЖК [170]. Вероятно, это и есть адаптивный ответ клеток на изменение температуры путем изменения состава мембран, модифицируя их текучесть [200].

1.4. Получение липидов из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Липиды микроводорослей чаще всего получают экстракцией из сухой биомассы. Поскольку микроводоросли в культивируемой среде имеют низкую концентрацию биомассы (0.1-1% m/m), перед сушкой биомассы микроводорослей часто требуются методы сгущения [221]. Процессы сгущения и сушки также можно объединить в один этап сбора [222]. С целью увеличения выхода экстракции сухую биомассу подвергают способу дезинтеграции для разрушения клеточной стенки микроводорослей [223].

1.4.1. Сгущение биомассы

Существует несколько методов разделения твердой и жидкой фаз, применимых для сгущения биомассы микроводорослей. Однако, несмотря на обширные исследования по этой теме, сбор биомассы микроводорослей остается сложной задачей из-за высоких капитальных и эксплуатационных затрат. Более того, некоторые методы могут ухудшить качество биомассы или не применимы ко всем видам микроводорослей [141]. В таблице 1.3. представлены несколько методов сгущения биомасс микроводорослей.

Таблица 1.3 – Различные методы сгущения биомассы и их характеристики [141, 224, 225].

Метод сгущения	Принцип работы	Преимущества	Недостатки
Естественное осаждение	Гравитационное осаждение взвешенных клеток	<ul style="list-style-type: none"> • Низкие капитальные и эксплуатационные расходы. 	<ul style="list-style-type: none"> • Требования к пространству часто бывают высокими. • Медленный метод,

			<p>который может вызвать деградацию биомассы.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Неприменимо для мелких одноклеточных видов (например, <i>Nannochloropsis sp.</i>).
<p>Осаждение биофлокулянта (Микроводоросли + бактерияльные хлопья - MaB-flocs)</p>	<p>Осаждение флокул под действием гравитации.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Низкие капитальные и эксплуатационные расходы (бак-отстойник). • Отсутствие химических флокулянтов → уменьшение стоимости и загрязнения биомассы. • Требования к площади меньше чем к естественному осаждению, так как время гидравлического удерживания составляет в среднем один час. 	<ul style="list-style-type: none"> • Биомасса микроводорослей также содержит бактерии.
<p>Флокуляция с последующим гравитационным осаждением</p>	<p>Индукцированная коагуляция клеток различными способами (химическая, автофлокуляция, физическая и физико-химическая).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Простота в использовании и сравнительно недорогой метод. 	<ul style="list-style-type: none"> • Нежелательные примеси в биомассе (флокулянт). • Высокая изменчивость, приводящая к неэффективности и ненадежности. • Повторное использование воды после флокуляции может быть проблематичным из-за наличия остатков флокулянта.

Центрифугирование	Использует центробежные силы для увеличения скорости осаждения.	<ul style="list-style-type: none"> • Может применяться повсеместно для всех видов микроводорослей. • Быстрое время обработки. • Хорошая воспроизводимость. • Получение биомассы с низким содержанием воды. 	<ul style="list-style-type: none"> • Специализированное оборудование → увеличения капитальных и эксплуатационных расходов. • Генерирует высокие силы гравитации и сдвига, которые могут повредить собранные клетки. • Сложность центрифугирования клеток с высоким содержанием липидов. • Высокая энергоемкость.
Флотация в пресной воде	Индукция флотации клеток с использованием очень мелких пузырьков газа с осциллирующим и инжекторами.	<ul style="list-style-type: none"> • Полезно, когда клетки микроводорослей обладают естественными характеристиками плавучести. 	<ul style="list-style-type: none"> • Клетки должны быть гидрофобными - часто требуется добавление поверхностно-активных веществ или коагулянтов. • Относительно энергоемкий метод.
Флотация в солоноватых и морских системах	Использование инжектора Вентури или диспергаторов воздуха / озона.	<ul style="list-style-type: none"> • Формирование пены усиливается при низких уровнях озона. • Низкие затраты энергии 	<ul style="list-style-type: none"> • Применимые только к морским видам.
Фильтрация	Разделение твердой и жидкой фаз с полупроницаемым фильтром, действующим в качестве барьера.	<ul style="list-style-type: none"> • Эффективный. • Большой диапазон фильтрации, адаптированный к разным размерам клеток. • Умеренные или низкие энергетические потребности, в зависимости от размера пор. 	<ul style="list-style-type: none"> • Требуется специализированные аппараты и фильтры → увеличение капитальных и эксплуатационных расходов.

1.4.2. Сушка биомассы

Сушка — это метод консервирования, используемый для уменьшения содержания влаги в продуктах с целью увеличения их срока хранения и снижения затрат на упаковку и транспортировку [226]. Vagchi и др. 2015 наблюдали, что присутствие влаги в биомассе микроводорослей препятствует восстановлению липидов [227]. Концентрация биомассы 90% сухого твердого вещества предназначена для большинства применений [228-230]. С другой стороны, процесс сушки часто требует больших затрат энергии, что увеличивает общие производственные затраты [231]. Следовательно, метод сушки должен быть экономически целесообразным, а также подходящим для получения продуктов из микроводорослей.

Сушка на открытом воздухе - это традиционный и дешевый метод сушки пищевых продуктов под прямыми солнечными лучами. Однако этот метод сушки зависит от погодных условий, требует много времени и подвергает материалы неизбежному загрязнению микроорганизмами, насекомыми и возможными загрязнителями [232].

Солнечная сушка аналогично использует солнечное излучение для сушки материалов, но имеет преимущество использования закрытых камер, защищающих материалы от загрязнения (как показано на рисунке 1.10) [232].

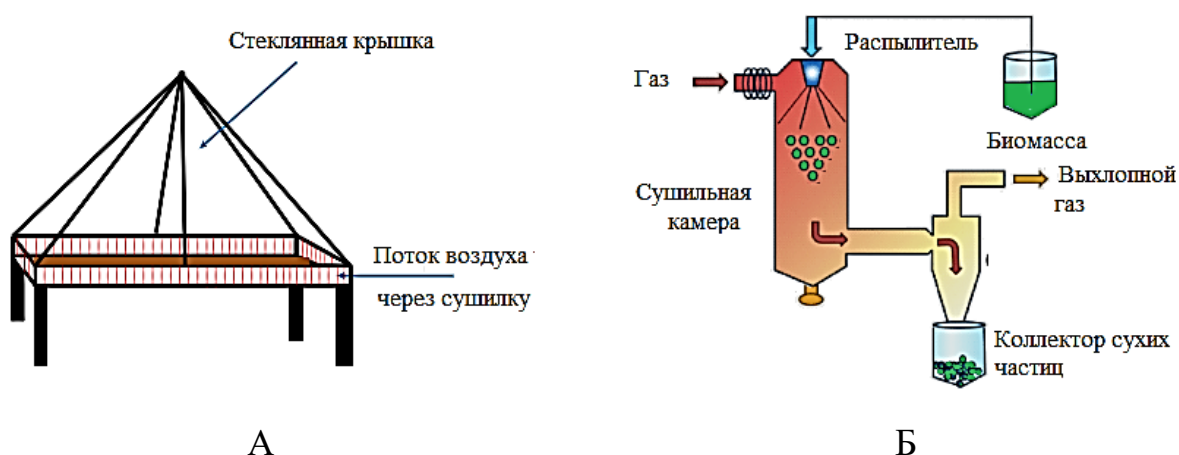


Рисунок 1.10 – Схема двух методов сушки биомассы: А- Солнечная сушилка, В- Распылительная сушилка (адаптировано из [232, 233])

Биомассу микроводорослей часто сушат в один слой, что называется **тонкослойной сушкой**. Толщина и влажность этого слоя влияют на продолжительность сушки [234].

Сушка горячим воздухом или **конвективная сушка в печи** использует механическое оборудование, которое подает горячий воздух определенной температуры и скорости, обеспечивая большой контроль над параметрами сушки [235]. Это обеспечивает однородную сушку продукта [236].

Микроволновая сушка - это метод, в котором используются электромагнитные микроволны, которые обеспечивают более быстрое испарение воды за счет увеличения внутреннего тепла содержащих воду материалов [232].

Распылительная сушка - это метод, который включает распыление жидкости, смешивание с горячим газом и сушку капель (как показано на рисунке 1.9). Это быстрый процесс, который был описан как подходящий для микроводорослей, предназначенных для употребления в пищу. Однако этот метод является одним из самых дорогих методов дегидратации [236].

Лиофильная сушка - это процесс обезвоживания при низких температурах, при котором полностью замороженные образцы помещаются под вакуум для удаления воды. Это позволяет происходить процессу сублимации: лед переходит непосредственно из твердого состояния в пар, не переходя в жидкое состояние [237]. В процессе замораживания биомассы образуются крупные внутриклеточные кристаллы льда, которые частично разрушают клеточную стенку микроводорослей [222]. Хотя лиофилизация оказалась наиболее подходящей для сохранения качества биомассы микроводорослей по питательным и биологически активным соединениям [239, 240], она также является наиболее дорогостоящим методом сушки [236, 237].

Барабанная сушка, также называемая **вращающейся сушкой**, включает использование наклонного вращающегося цилиндра для

перемещения высушиваемых микроводорослей от одного конца к другому под действием силы тяжести. Клетки микроводорослей, распыленные горячим воздухом по поверхности барабана, будут частично разрушены [236].

1.4.3. Дезинтеграция клеток

Дезинтеграция клеточной оболочки является ключевым этапом для увеличения выхода экстракции ценных компонентов из биомассы микроводорослей. Этот процесс частично или полностью разрушает клетку, делая её внутриклеточные биомолекулы доступными для экстракционных растворителей. Современные методы дезинтеграции принято делить на механические и немеханические [240, 241].

а) Механические методы: Разрушение клеточной стенки может быть достигнуто с помощью механических сил, таких как силы сплошного сдвига (Бисерная мельница (рисунок 1.11), высокоскоростная гомогенизация), силы сдвига жидкости (гомогенизатор высокого давления, микрофлюидизация).

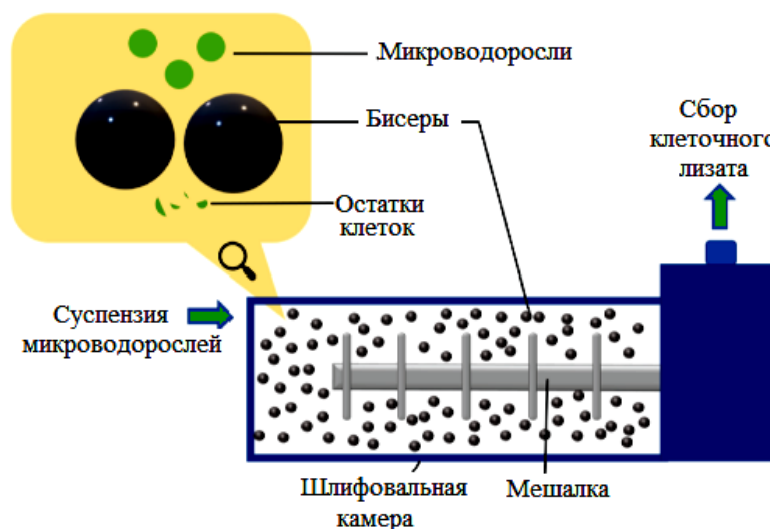


Рисунок 1.11 – Схема дезинтеграции клеток микроводорослей методом бисерной мельницы [242]

б) Немеханические методы: Немеханические методы часто включают лизис клеток с применением химическим агенты, ферменты, антибиотики или осмотический шок [243- 248]. Эти методы воспринимаются как более мягкие и более селективные, чем механические методы, поскольку клетки

часто только перфорированы или проницаемы, а не полностью разрушены. Например, химические и ферментативные методы основаны на селективном взаимодействии с клеточной стенкой или мембранных компонентов, которые модифицируют клеточный пограничный слой и позволяет выпускать продукты [247, 249].

Существуют другие методы разрушения клеток такие как электромагнитные волны (ультразвуки, сверхвысокие частоты (СВЧ)), электрические (импульсные электрические поле) и термические (термолиз, автоклавирование) [240, 250] (Таблица 1.4).

Таблица 1.4 – Методы разрушения клеток [241, 250]

Методы разрушения

Механические		Немеханические	
Твёрдый сдвиг		Химические	
- Бисерная мельница		- Экстракция растворителем	
- Высокоскоростная гомогенизация		- Кислоты/ щелочные	
- Шлифование (с / без криогенов)		- Ионные жидкости	
- Гомогенизаторы (высокая скорость)		- Хелатирующие агенты	
- Механический клеточный пресс		- Детергенты	
		- Окисление	
		- Наночастицы (наночастицы серебра)	
		- Сверхкритическое выделение жидкости	
		- осмотический шок	
		Биологические	
		- Ферменты	
Жидкий сдвиг		- Антибиотики	
- Гомогенизатор высокого давления (Микрофлюидизация)		- Фаги	

Электромагнитные волны

- СВЧ (с или без растворителей)

- Ультразвуки

Электрические

- Импульсное электрическое поле

- Электрические разряды высокого напряжения

Термические и термохимические

- Автоклавирование

- Паровой взрыв

- Гидротермальное сжижение

- Лиофильная сушка

1.4.4. Экстракция липидов

Экстракция в системе твердое тело-жидкость относится к классической технологии экстрагирования компонента (или нескольких компонентов) из твердого тела, достигаемой при использовании соответствующего селективного жидкого растворителя (экстрагента) [251].

Извлечение липидов из микроводорослей можно проводить из влажной или сухой биомассы [252]. Для биологических материалов можно использовать несколько методов экстракции липидов, наиболее распространенным является метод встряхивания: он включает добавление к образцу органического растворителя (для органических соединений) или разбавленной кислоты или основания (для неорганических соединений) с последующим встряхиванием, а затем фильтрацией или центрифугирование нерастворимых материалов [253]. Среди этих методов мы можем указать: метод **Фолча** (Folch), разработанный в 1957 году, который представляет собой простой и эффективный метод экстракции липидов из биологических материалов. Помимо основного неполярного экстракционного растворителя (хлороформа) добавляется полярный соразтворитель (метанол) в равных

объемах для увеличения выхода экстракции. Затем хлороформ отделяют и промывают водой для удаления нелипидных веществ [254, 255]. В настоящее время предпочтительным методом экстракции липидов является метод, разработанный **Блайем и Дайером** (Bligh and Dyer) в 1959 году. Это более эффективный и безопасный метод, который заменяет токсичные растворители (хлороформ и метанол) гексаном / изопропанолом 3: 2 (об. / об.) [256, 257]. Иногда для ускорения процесса экстракции используются механическое перемешивание и нагрев.

Для некоторых образцов экстракт может быть введен в хроматограф для дальнейшего разделения. Чаще всего требуется дополнительная пробоподготовка, необходимая для выделения критических аналитов из других экстрагируемых веществ, которые могут помешать стадии хроматографии [260].

Современная экстракция жидкость-твердое вещество берет свое начало в методе встряхивания-фильтра. Большинство из них используют повышенную температуру или давление для увеличения скорости извлечения [260]. В таблице 1.5 показано влияние температуры и давления на процесс экстракции.

Таблица 1.5 – Влияние температуры и давления на процесс экстрагирования в системах твердое тело — жидкость [260]:

Физический параметр	Влияние
Высокая температура	<ul style="list-style-type: none"> - Увеличивает растворимость, скорость диффузии и массообмена. - Понижает вязкость растворителя и поверхностное натяжение. - Кинетика десорбции и солюбилизации более благоприятна.
Высокое давление	<ul style="list-style-type: none"> - Заставляет жидкость проникать в поры пористого материала. - Содержит растворитель жидкости при рабочей температуре.
Совместное использование температуры и давления	- При извлечении сверхкритической жидкости в критической точке давление и температура вызывают образование сверхкритической жидкости (часто CO ₂).

Основными методами экстракции в системах твердое тело-жидкость являются пять методов: современное извлечение Сокслета, улучшение Сокслета Рэндаллом, извлечение сверхкритической жидкости, извлечение жидкости под давлением - ускоренное извлечение растворителя, извлечение растворителя с помощью микроволнового излучения. Комплексный обзор Vostrikova и др. 2018, представляет сравнение нескольких методов экстракции [258]. Масла микроводорослей чаще всего извлекаются методами Фолча, Рэндалла и Сокслета [259]. Однако биомасса микроводорослей содержит большое количество пигментов, которые экстрагируются теми же органическими растворителями, что и липиды. Следовательно, было бы целесообразно проводить экстракцию «каскадного» типа, которая включала бы предварительную стадию экстракции пигментов с последующей экстракцией липидов [263].

А) Метод Сокслет: Этот метод был изобретен немецким агрохимиком Францем Сокслетом в 1878 году для определения молочного жира [261]. С тех пор он является наиболее широко используемым для извлечения твердой жидкости [262]. Хотя классический метод извлечения Сокслета может занимать часы, а иногда и дни, после запуска процесса он требует очень незначительных требований пользователя. Это простой, эффективный и относительно недорогой метод [260].

Аппарат Сокслета состоит из трех частей: дистилляционного флакона, экстракционной камеры и конденсатора (рисунок 1.12).

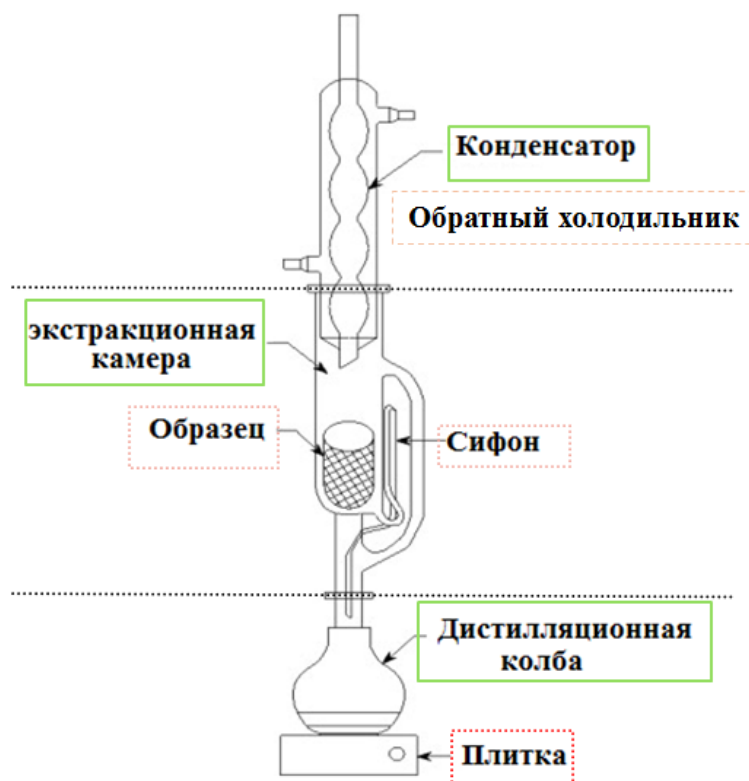


Рисунок 1.12 – Классический экстрактор Сокслета

При нагревании растворитель, расположенный в дистилляционном флаконе, начинает испаряться. Горячий пар попадает в конденсатор, где он охлаждается и стекает на твердый материал в наперстке. Экстракционная камера постепенно заполняется теплым растворителем до тех пор, пока она не будет почти заполнена; он опорожняется при помощи сифонного действия обратно в колбу с растворителем (или автоматически опорожняется в более современном аппарате, позволяющем использовать меньше растворителя при использовании достаточного количества растворителя в зависимости от количества пробы). Этот цикл может повторяться много раз. Во время каждого цикла часть аналита (возможно, часть матрицы) растворяется в растворителе. Однако, как только экстрагированный аналит попадает в колбу для нагревания растворителя, он остается там и больше не участвует в цикле экстракции. Только чистый, теплый растворитель используется для извлечения твердого вещества в наперстке, что является ключевым преимуществом классической экстракции Сокслета. Эта процедура предотвращает возможность насыщения растворителя экстрагируемым

материалом и повышает эффективность экстракции по сравнению с простым методом встряхивания-фильтра [260].

Б) Метод Рэндалла: в 1974 году Эдвард Рэндалл усовершенствовал метод экстракции Сокслета, что значительно сократило время экстракции [264]. В его методе образец полностью погружается в кипящий растворитель. По сравнению с конденсированным растворителем в классическом методе Сокслета, где температура растворителя ниже точки кипения, метод Рэндалла оказался более быстрым, так как аналиты более растворимы в горячем, чем в холодном или теплом растворителе [260]. Однако низкая температура в классическом методе Сокслета позволяет сохранить образец для дальнейшего использования.

Устройство Сокслета, усовершенствованное с помощью Рэндалла, показано на рисунке 1.13.

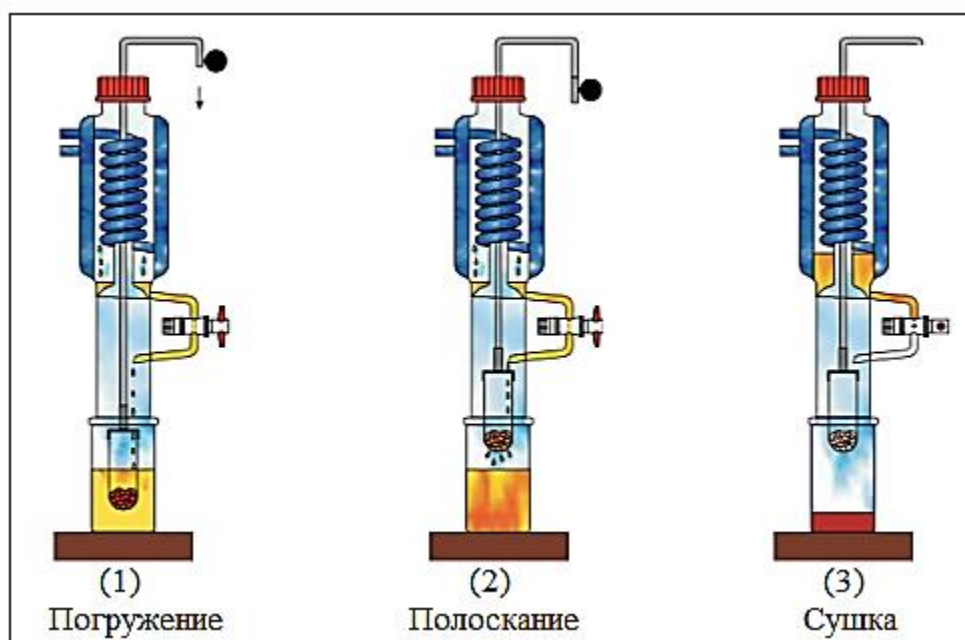


Рисунок 1.13 – Аппарат Сокслета, улучшенный Рэндаллом [265].

В) Сверхкритическая экстракция CO₂: Сверхкритическая жидкость - это любое вещество при температуре и давлении выше его критической точки, где не существует отдельных жидких и газовых фаз. Она может истекать сквозь твердые частицы, как газ, и растворять материалы, как

жидкость. CO_2 - наиболее часто используемый экстрагент в сверхкритической флюидной экстракции (рисунок 1.14). Сверхкритические жидкости являются селективными экстрагентами, поскольку их свойства можно изменять, изменяя давление и температуру [266]. Кроме того, диффузия в сверхкритических жидкостях намного быстрее, чем в жидкостях, что ускоряет процесс экстракции. Кроме того, отсутствие поверхностного натяжения и незначительная вязкость сверхкритических жидкостей по сравнению с жидкостями позволяют проникать экстрагенту в матрицы, недоступные для жидкостей [267].

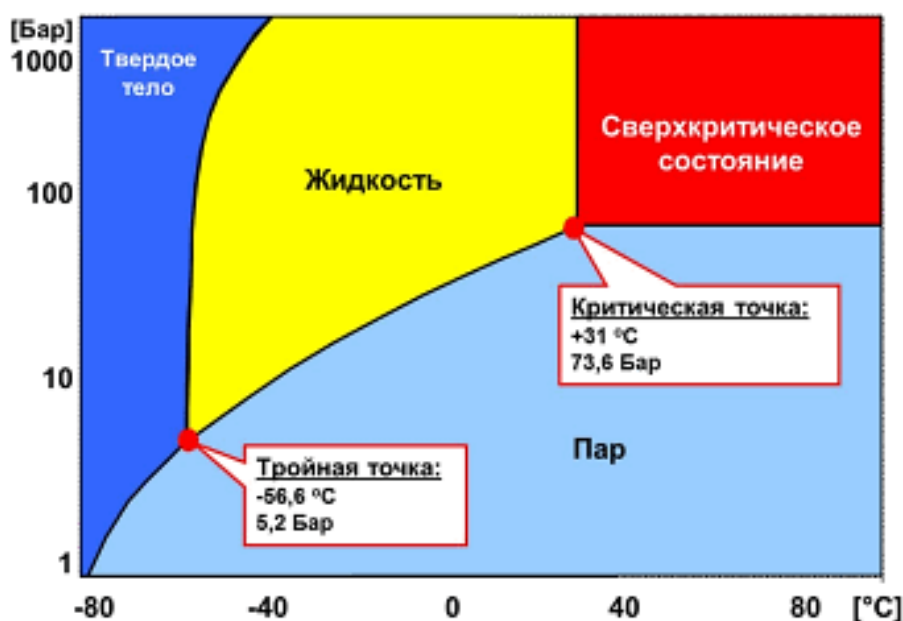


Рисунок 1.14 – Фазовая диаграмма CO_2 [268]

Этот метод был изобретен в начале 1990-х годов и считался идеальным решением для всех твердо-жидкостных экстракций. Он был представлен как безопасный, не содержащий растворителей, легко удаляемый экстрагент (диоксид углерода) с перестраиваемой мощностью растворителя, которая диффундирует как газ и обладает способностью сольватации жидкости. Тем не менее, SFE не добился успеха, который первоначально предполагалось получить. Вот некоторые из причин его ограниченного успеха:

- CO₂ является неполярным растворителем и требует использования жидких полярных растворителей, таких как этанол, для экстракции полярных растворенных веществ.

- Химики, пытавшиеся использовать новую технику, обнаружили, что она незнакома, и что она сложнее, и заставила их пройти дополнительные курсы [260].

- Требуется высокие эксплуатационные расходы.

Г) Извлечение жидкости под давлением

Извлечение жидкости под давлением является признанной альтернативной процедурой извлечения нерастворимых в воде или слабо растворимых в воде соединений из почв, глин, отложений, осадка и выбросов отходов. Этот метод использует повышенные температуры (100–180 °C) и давления (1500–2000 фунтов на квадратный дюйм). В таких условиях растворитель обладает свойствами, способствующими диффузии, такими как высокие коэффициенты диффузии, низкая вязкость и высокая прочность растворителя. Это помогает достичь хороших процессов растворения и улучшения анализов из клеточного матрикса. Это позволяет достичь извлечения аналитики, эквивалентности извлечения сокслета, но при этом меньше растворителей и занимать значительно меньше времени. Образец помещен в экстракционную камеру. Насос передает растворитель из одного или нескольких резервуаров в экстракционную камеру, расположенную в печи. Как правило, определяемым в процессе разработки параметром является нагревание в течение определенного периода времени (10–20 минут). Извлечения могут быть выполнены в статическом или динамическом режиме. После завершения экстракции в статическом режиме используется азотная продукция для переноса экстракта во флаконы для сбора [269, 260].

Д) Микроволновая экстракция растворителем:

Основное различие между этим методом и SFE состоит в том, что тепло экстракционного растворителя напрямую достигается путем

микроволнового нагрева, а не нагревом в конвекционной печи. Это позволяет ускорить процесс нагрева, и когда температура растворителя в закрытом контейнере возрастает, давление внутри поднимается выше атмосферного давления. Диэлектрическая проницаемость воды намного выше, чем у органических растворителей, таких как углеводороды, и они не поглощают микроволновую энергию и поэтому не нагреваются. По этой причине внутри экстракционного сосуда должно быть размещено устройство, поглощающее микроволновое излучение, чтобы косвенно нагревать эти органические растворители [260].

1.4.5. Методы анализа липидов

Образцы липидов, полученные из природных источников, таких как микроводоросли, представляют собой сложные смеси различных классов липидов. На сегодняшний день ни один аналитический метод не может разделить, проанализировать и количественно оценить все эти компоненты одновременно. Для этого следует использовать комбинацию нескольких методов [135].

Точный количественный анализ липидных фракций может предоставить важную информацию о физиологии и микроструктуре микроводорослей. Анализ конкретных классов липидов часто требует использования химических методов разделения. Существуют относительно простые методы выделения классов липидов, такие как хроматография на открытой колонке (при низком давлении) [270]. Christie [135] описал метод отделения классов неполярных липидов (углеводороды, сложные эфиры холестерина, ТАГ, холестерин, диацилглицерины и моноацилглицерины) от липидного экстракта с использованием открытой колонки с кремниевой кислотой и элюирования 0% -100% диэтилового эфира в гексане. . Можно использовать твердофазную колонку (ТФК), предварительно заполненную различными сорбентами.

А) Тонкослойная хроматография:

Тонкослойная хроматография (ТСХ) долгое время была популярным методом предварительного фракционирования или разделения липидных классов. Несмотря на то, что были изобретены более продвинутые хроматографические методы, такие как ВЭЖХ, ТСХ все еще используется по сей день, поскольку она предлагает различные преимущества. Это простой, выборочный и недорогой метод, который может предоставить очень ценную структурную информацию. Для некоторых приложений может оказаться возможным разделить как неполярные, так и полярные липиды на планшете с образцом, используя технику двухмерной ТСХ с двумя различными смесями растворителей [270]. Кроме того, можно количественно определить различные фракции с помощью денситометрии [271].

Б) Высокоэффективная жидкостная хроматография:

Методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием УФ-детектора (при 205–210 нм) чувствительны только к ненасыщенным липидам. Это можно объяснить пропорциональным откликом УФ-детектора к общему количеству двойных связей углерод-углерод в липиде. Это ограничивающий фактор, поскольку насыщенные липиды не будут обнаружены с помощью этого детектора [270]. С 1980-х годов было изобретено несколько детекторов массового производства, в том числе: детектор ионизации пламени (ДИП) и детектор испарительного рассеяния света (ДИРС), детектор заряженного аэрозоля (ДЗА). Методы ВЭЖХ-ДИРС применялись для количественного анализа неполярных и полярных липидов. Чувствительные методы нормально-фазовой и обратно-фазовой ВЭЖХ -ДЗА успешно использовались для анализа неполярных липидов с минимальным пределом обнаружения 1 нг [135, 272].

В) Газовая хроматография (ГХ):

ГХ в основном используется для анализа глицеридов и свободных жирных кислот методом метиловых эфиров. Поскольку для ГХ требуются очень высокие температуры, необходимо следить за тем, чтобы липиды не

разлагались во время хроматографии [273]. По этой причине этот метод обычно занимает много времени и включает гидролиз и дериватизацию образцов (триметилсилирование) для понижения точки кипения липидов [274].

D) Методы окрашивания: для быстрого определения липидов водорослей используются два основных метода окрашивания. Обычно требуется дополнительное использование флуороспектрофотометра.

1) *Nile Red* и *BODIPY* окрашивания: они включают использование флуоресцентных красителей с селективным сродством к каплям нейтральных липидов, таких как Nile Red и BODIPY (буровой дипиррометен), используемые для количественного определения липидов в клетках микроводорослей. Однако неравномерное окрашивание клеток водорослей из-за различий в составе их клеточной стенки снижает точность этого метода количественной оценки [275].

2) *Модифицированное окрашивание Nile Red*: в литературе можно найти несколько модификаций метода окрашивания нильским красным для преодоления трудностей, связанных с клеточной стенкой и составом органелл. Включено использование лиофилизированных микроводорослей, микроволнового излучения и других методов предварительной обработки и калибровки [276, 277].

За исключением методов, описанных выше, в литературе можно найти другие методы анализа классов липидов, например: сверхкритическая жидкостная хроматография, масс-спектрометрия (газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС), жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ-МС)), колориметрический сульфофосфованилиновый (СФВ) метод, ближняя инфракрасная спектроскопия (БИК-спектроскопия), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Однако отсутствие аналитических стандартов для всех классов липидов и молекулярных видов затрудняет количественную оценку сложных липидов [278].

1.5. Сорбционные свойства сухой биомассы микроводорослей *Chlorella*

Микроводоросли исследуются на предмет их потенциального использования в нескольких отраслях промышленности, таких как пищевая и кормовая промышленность и биоэнергетика [65]. Несколько исследований показали биосорбционную способность микроводорослей по отношению к тяжелым металлам [300,301]. Коммерческие компании, продающие добавки с микроводорослями, утверждают, что микроводоросли обладают способностью очищать организм от тяжелых металлов и других токсинов [302,303]. Однако эти утверждения никогда не были основаны на научных доказательствах. Микроводоросли использовались в качестве источника пищи на протяжении нескольких веков [304]. Однако данных о необходимой дозе, потенциальных побочных эффектах микроводорослей и реальном терапевтическом воздействии на организм человека очень мало. Использование микроводорослей в качестве альтернативного лечения некоторых видов рака, таких как лимфома [305] и рак легких [306], дало значительные результаты. Однако использование микроводорослей в качестве потенциального энтеросорбента в случае острого или хронического воздействия тяжелых металлов изучено недостаточно. Клеточные стенки водорослей богаты функциональными группами, такими как карбоксил, амин, гидроксил, фосфат, имидазол и сульфат [307]. Эти группы отрицательно заряжены и притягивают положительные ионы металлов. Однако при низком pH они частично протонированы, что снижает их сорбционную способность по отношению к положительно заряженным ионам. Микроводоросли активно изучаются на предмет их использования в качестве сорбентов для очистки сточных вод от ионов тяжелых металлов [308-310]. Кроме того, исследование орального сорбционного потенциала микроводорослей хлореллы является актуальным, так как это хорошая альтернатива существующим хелаторам из-за высокого содержания хлорофилла. Они также являются источниками ценных компонентов, таких как белки, липиды (Омега-3) и антиоксиданты [311].

В исследовании Wilke и др. 30 штаммов водорослей, в том числе несколько штаммов хлореллы, были изучены на предмет их способности адсорбировать четыре тяжелых металла: Pb, Cd, Ni и Zn. В данном исследовании предлагается использовать мертвые клетки биомассы (лиофилизированную биомассу) в качестве адсорбента, поскольку это дает ряд преимуществ, таких как: отсутствие особых требований к выращиванию микроводорослей, возможность повторного использования биомассы после десорбции тяжелых металлов и способность фиксировать биомассу к матрице, в данном случае - целлюлозно-полимерный сульфат целлюлозы натрия (SCS) и катионный агент полиэтиленимин (PEI). Результаты исследования (рисунок 1.15) демонстрируют, что *Chlorella salina* имеет наивысшую сорбционную способность по отношению к Pb, Cd и Zn, тогда как *Lyngbya taylorii* дает лучшие результаты по сорбции Ni [312].

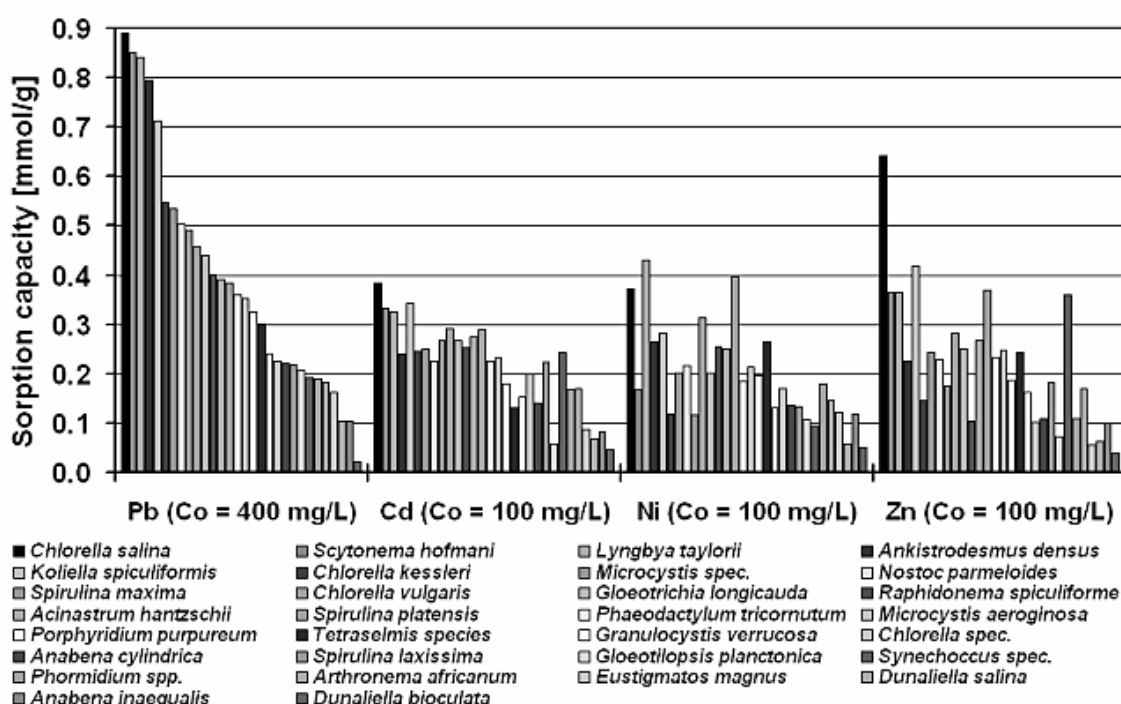


Рисунок 1.15 – Результаты исследования сорбционной способности сорбентов на основе 30 водорослей [312].

Mehta и Gaur сравнили различные адсорбционные свойства живой и мертвой биомассы клеток *Chlorella vulgaris* [313]. Fang и др. Описаны функциональные группы, которые могут играть роль в поверхностной

адсорбции меди и кадмия клетками спирулины с использованием FTIR и рентгеновского анализа. Al-Rub изучал влияние конкурентных катионов на адсорбцию меди клетками хлореллы [314]. Однако в литературе нет сравнений с широко используемыми адсорбентами, такими как активированный уголь [315].

1.6. Оценка рынка производства ценных компонентов из микроводорослей

Для разработки экономически жизнеспособной схемы необходимо оценить промышленный потенциал производства липидов из микроводорослей.

Первоначальный интерес ученых к липидам из микроводорослей полвека назад был инициирован активным поиском источников биотоплива. Тем не менее, тенденция последнего десятилетия заключается в рассмотрении микроводорослей как источника пищи, корма, фармацевтических препаратов и пищевых добавок. Одной из причин данного изменения является низкая экономическая выгода от биотоплива полученного из микроводорослей по сравнению с другими источниками биотоплива [15-316]. Также, один из главных приоритетов для мирового сообщества стал поиск новых видов продуктов питания и БАДов, которые отличались бы высокой питательностью и экологичностью. Однако, исследования показывают, что прежде, чем продукты, полученные из микроводорослей, станут действительно устойчивыми и экономически эффективными альтернативами для существующих продуктов питания, необходимы значительные прорывы в технологии культивирования, сбора и биопереработки микроводорослей [317].

На сегодняшний день, в современных литературных источниках не достаточно представлена конкретная информация о затратах на выращивание и переработку микроводорослей в промышленных масштабах.

J. Ruiz и др. провели подробный анализ рынка в сочетании с использованием симуляционной модели производства микроводорослей и

биопереработки. Несколько производственных цепей были специально разработаны для различных рыночных сценариев: биотопливо, химикаты, продукты питания, корма, пищевые добавки, косметика и различные сочетания предыдущих. Полученные данные позволили сравнить влияние переменных, таких как географическое местоположение объекта (было исследовано 6 мест: Нидерланды, Канарские острова, Турция, Кюрасао, Саудовская Аравия и юг Испании), тип системы культивирования и эксплуатационные параметры. Это исследование продемонстрировало, что возможно будет снизить цену выращивания и сбора микроводорослей (на юге Испании) с нынешних 3,4 евро/кг до 0,5 евро/кг в следующем десятилетии благодаря достижимым и реалистичным технологическим улучшениям. Также было упомянуто, что высокая стоимость продуктов на основе микроводорослей обусловлена главным образом отсутствием конкуренции в этой нише [15].

1.6.1. Основные ограничивающие факторы, влияющие на стоимость культивирования и сбора биомассы микроводорослей:

- *Выбор видов и штаммов микроводорослей:* Микроводоросли представляют собой чрезвычайно разнообразную группу, состоящую из нескольких сотен тысяч различных видов. Это биоразнообразие объясняет различия в их составе. По этим причинам выбор подходящих видов микроводорослей для получения того или иного компонента в более высоких количествах является первичным до начала процесса культивирования.

Все еще обсуждается вопрос о том, должна ли генная инженерия играть роль в выборе лучшего штамма микроводорослей для повышения их устойчивости к экстремальным факторам окружающей среды и увеличения выхода ценных компонентов. Кроме того, существует очень мало данных, касающихся государственного регулирования выращивания ГМО-микроводорослей, за исключением США [318].

- *Место культивирования и время года:* Выбор места и времени культивирования являются первостепенными, поскольку они определяют

температуру и эффективность фотосинтеза. Эти факторы очень влияют на рост и продуктивность ценных компонентов фотоавтотрофными микроводорослями.

Местоположение также влияет на стоимость электроэнергии, воды и рабочей силы. Также важно учитывать различия в законодательстве в каждой стране, которые могут привести к дополнительным расходам, например, таким как обязательство по очистке сточных вод [15].

- *Площадь культивирования:* на масштаб культивирования влияют затраты на рабочую силу, спрос, а также эксплуатационные и капитальные затраты (количество и размеры реакторов, системы очистки, охлаждения, потребление электроэнергии и т. д.). Проектное исследование показало, что уменьшение масштабов возделывания со 100 гектаров до 1 гектара приведет к увеличению стоимости выращивания и сбора биомассы микроводорослей в 10 раз. Однако увеличение масштабов выше 100 гектаров незначительно снижает стоимость биопереработки [15].

- *Системы культивирования:* Существует два типа систем культивирования для биомассы микроводорослей: открытые и закрытые системы. Определение наилучшей системы выращивания - это постоянная дискуссия, поскольку обе системы имеют свои преимущества и недостатки. Тем не менее, микроводоросли имеют преимущество выращивания на непахотных землях и без конкуренции с сельскохозяйственными угодьями.

• *Открытые системы:* этот тип систем выращивания в основном представлен открытыми прудами. Эти культиваторы просты и требуют явно меньших начальных вложений, чем закрытые системы. Они также имеют преимущество за счет использования испарения в качестве естественной системы охлаждения. Было показано, что температура в открытых прудах не будет превышать 32°C независимо от окружающей температуры. Однако, открытые системы более подвержены заражению другими организмами. Кроме того, производительность прудов значительно ниже, чем в закрытых системах (например, из-за ограниченного проникновения световых лучей),

что увеличивает общую стоимость сбора урожая, поскольку для обработки требуются большие объёмы питательной среды.

Состав питательной среды в данной системе не достаточно хорошо контролируется, так как дождь и испарение влияют на процесс роста.

- *Закрытые системы:* существует несколько типов закрытых биореакторов, таких как: горизонтальный трубчатый фотобиореактор; горизонтальный трубчатый фотобиореактор в вертикальном положении (вертикально уложенный); фотобиореактор с плоскими панелями. Эти структуры представляют большой потенциал для улучшения, поскольку существует множество степеней свободы дизайна. Согласно литературным данным, плоские панели являются наиболее продуктивным и экономичным вариантом для выращивания микроводорослей [15].

Существует несколько дорогостоящих и ограничивающих факторов при выращивании в закрытых системах:

- *Охлаждение:* перегрев в закрытых фотореакторах смертелен для микроводорослей, так как температура среды может достигать 60 ° C. Эта проблема связана с очень низкой скоростью испарения воды, которой недостаточно для естественного охлаждения системы. Вот почему контроль температуры в закрытых реакторах является обязательным. Эта проблема обычно решается путем распыления воды на поверхность фотобиореакторов или погружением системы в водоемы, а также с помощью теплообменников [319].

- *Дегазаторы:* необходимо контролировать накопленный кислород, поскольку его избыточное содержание может препятствовать росту микроводорослей. Ограничение длины трубки и установка эффективных дегазаторов являются предлагаемыми решениями этой проблемы.

- *Очистка:* Очистка требуется как для открытых, так и для закрытых систем, однако для закрытых фотобиореакторов требуются

химические вещества для удаления биообрастания с внутренней поверхности стенок фотобиореактора, поскольку это может сдерживать рост.

➤ *Замена запасных частей:* Также важно упомянуть, что для замены деталей фотобиореакторов, особенно трубок в трубчатых фотобиореакторах, требуются дополнительные затраты [15].

- *Перемешивание:* этот процесс требуется во всех типах систем культивирования, и его нельзя игнорировать, поскольку он может значительно увеличить потребление энергии.

- *Сбор биомассы:* стоимость сбора биомассы культивированной в открытых прудах составляет около 23% от стоимости культивирования, тогда как в закрытых системах стоимость этого процесса составляет всего 5-7% от общей (начиная со 100 гектаров) [15-320-321].

1.6.2. Затраты, связанные с биопереработкой биомассы:

Согласно литературным данным, большинство реализуемых готовых продуктов из микроводорослей состоит из высушенной биомассы. Рынок продуктов на основе микроводорослей находится на ранней стадии развития. В настоящее время производители сосредоточены на выпуске одного типа продукта на основе микроводорослей, такого как: омега-3 или пигменты, (астаксантин) [322]. Это связано с тем, что каскадные методы извлечения недостаточно разработаны на текущий момент.

Наиболее дорогостоящие этапы процесса биопереработки включают: **дезинтеграцию клеток** (наиболее популярным методом является бисерная мельница) и **энергия** в виде тепла, необходимая для сушки биомассы, а также во время процесса **экстракции** и **восстановления растворителя**. Несколько компаний запатентовали новых методов разрушения клеток, таких как гидродинамическая кавитация, использование электрических полей и акустическая кавитация [323]. Ожидается, что прогресс в этих операциях теоретически может снизить потребление энергии до 90% [15].

Затраты, связанные с сушкой биомассы, могут быть решены путем улучшения технологии извлечения ценных компонентов, таких как липиды,

из влажной биомассы микроводорослей, например, с использованием **сверхкритических жидкостей** [324].

Очистка ценных компонентов, таких как омега-3 жирные кислоты, пигменты и водорастворимые белки, приводит к стоимости около 3 евро / кг (Испания). Каскадный подход мог бы чрезвычайно увеличить прибыль биорафинирования микроводорослей, уменьшая при этом остаточные отходы биомассы. В Европейском союзе наименьший доход на единицу биомассы приходится на биотопливо (0,3 евро / кг), а применение микроводорослей в пищу более привлекательно с потенциальной стоимостью в три раза выше. Тем не менее, наибольший спрос и доход связаны с продажей пигментов в качестве сильных антиоксидантов (рисунок 1.16) [15].

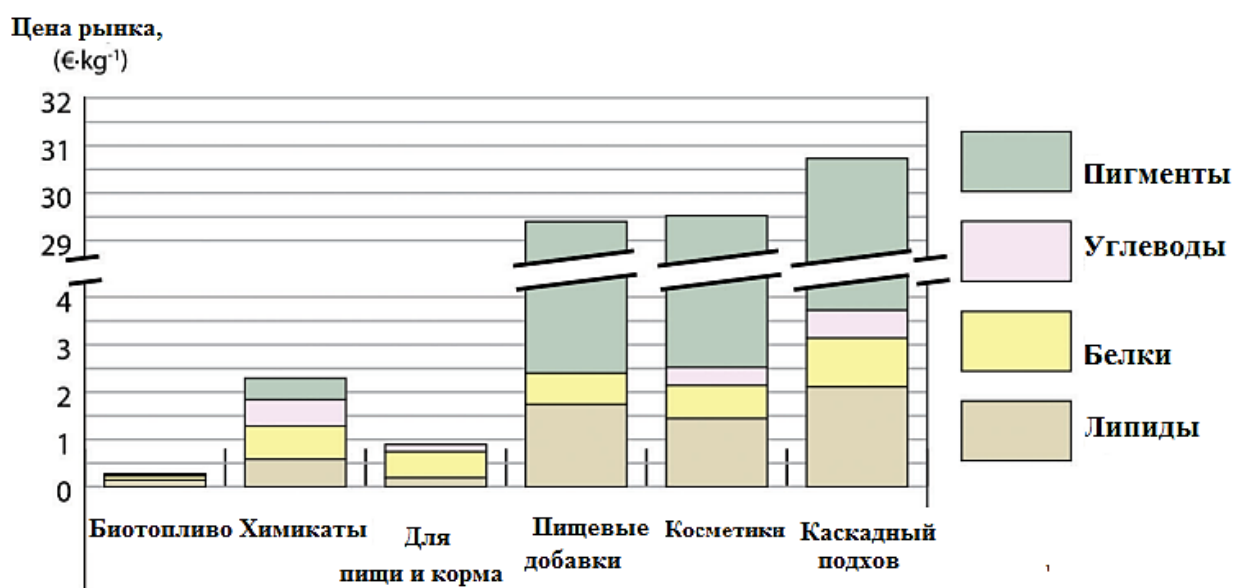


Рисунок 1.16- Рыночная стоимость компонентов микроводорослей и общая цена продажи биомассы для различных рыночных сценариев на юге Испании. Полный рыночный сценарий стремится к максимизации доходов на разных рынках [15].

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

На основании анализа литературных данных можно сделать вывод, что биомасса микроводорослей *Chlorella sorokiniana* является интересным сырьем для получения ПНЖК. Существует множество факторов, влияющих на рост и состав биомассы микроводорослей. Более того, эти изменения часто специфичны для штамма и должны оцениваться в каждом конкретном случае. Мониторинг и контроль условий выращивания в лабораторных условиях осуществляется в закрытых системах выращивания. Биопереработка биомассы микроводорослей включает операции сгущения и сушки.

Для извлечения липидов из микроводорослей для пищевых целей, необходимо выбирать методы, которые являются безопасными и сохраняют качество биомассы. Для увеличения выхода экстракции желательно использовать методы разрушения клеточной стенки.

На сегодняшний день не существует четкой разработанной биотехнологической цепочки от направленного культивирования до получения липидов. В Российской и зарубежной литературе представлено множество разработок, где подробно изучены либо условия культивирования, либо способы получения сухой биомассы, либо способы получения липидов. Нет комплексного подхода, который бы позволил использовать биотехнологию получения липидов в промышленном масштабе.

В результате проделанного литературного обзора были установлены цели и задачи диссертационного исследования, достижение которых позволит создать комплексную биотехнологию направленного культивирования с дальнейшего получением липидов из сухой биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Global Report on Food Crises Sciences, World Food programme – 2019. – №3– 194 с.
2. Loladze, I. Hidden shift of the ionome of plants exposed to elevated CO₂ depletes minerals at the base of human nutrition / I. Loladze // eLife Sciences – 2014. – Т.3– е. 02245.
3. Davis, D. R. Changes in USDA Food Composition Data for 43 Garden Crops, 1950 to 1999 / D. R. Davis, M. D. Epp, H. D Riordan // Journal of the American College of Nutrition – 2004. – Т. 23. – №6. – С. 669-682.
4. Imamura, F. Dietary quality among men and women in 187 countries in 1990 and 2010: a systematic assessment / F. Imamura, R. Micha, S. Khatibzadeh, S. Fahimi, P. Shi, J. Powles, D. Mozaffarian// Lancet Global Health – 2015. – Т. 3. – №3. – е. 192-142.
5. Spencer, S. J. Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion / S. J. Spencer, A. Korosi, S. Layé, B. Shukitt-Hale, R. M. Barrientos // npj Science Food – 2017. – Т. 1. – №7. – С. 669-682.
6. Spolaore, P. Commercial applications of microalgae / P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isamberta // Journal of Bioscience and Bioengineering – 2006. – Т. 101. – №2. – С. 87-96.
7. Crabb, A. R., The Hybrid-Corn Makers: Prophets of Plenty / A. R. Crabb // Rutgers University Press – 1947. – 331 с.
8. El-Haggar, S. M. Sustainability and Innovation: The Next Global Industrial Revolution / S. M. El-Haggar // Oxford University Press– 2015. – 354 с.
9. Ebenezer, V. Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae / V. Ebenezer, L. K. Medlin, J. S. Ki // Marine Biotechnoloy – 2012. – Т. 14. – С. 129-142.
10. Sathasivam, R. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine / R. Sathasivam, R. Radhakrishnan, A. Hashem, E. F. Abd_Allah // Saudi Journal of Biological Sciences – 2017. – Т. 26. – №4. – С. 709-722.

11. Garrido-Cardenas, J. A. Microalgae research worldwide / J. A. Garrido-Cardenas, F. Manzano-Agugliaro, F. G. Acien-Fernandez, E. Molina-Grima // Microalgae research worldwide. – 2018. – T. 35. – C. 50-60.

12. Forján, E. Microalgae: fast-growth sustainable green factories / E. Forján, F. Navarro, M. Cuaresma, I. Vaquero, M.C. Ruíz-Domínguez, Ž. Gojkovic, M. Vázquez, M. Márquez, B. Mogedas, E. Bermejo, S. Girlich, M.J. Domínguez, C. Vílchez, J.M. Vega, I. Garbayo // Critical Reviews in Environmental Science and Technology – 2014. – T. 45. – №4. – C. 1705-1755.

13. Alama, F. Biofuel from Algae- Is It a Viable Alternative? / F. Alam, A. Date, R. Rasjidina, S. Mobin, H. Moria, A. Baquic // Procedia Engineering – 2012. – T. 49. – C. 221-227.

14. Gifuni, I. Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery / I. Gifuni, A. Pollio, C. Safi, A. Marzocchella, G. Olivieri // Trends in Biotechnology – 2018. – T. 37. – №3. – C. 242-252.

15. Ruiz, J. Towards industrial products from microalgae / J. Ruiz, G. Olivieri, J. de Vree, R. Bosma, P. Willems, J. H. Reith, M. H. M. Eppink, D. M. M. Kleinegris, R. H. Wijffels, M. J. Barbosa // Energy and Environmental Science – 2016. – T. 9. – №10. – C. 3036-3034.

16. Niccolai, A. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility / A. Niccolai, G. C. Zittelli, L. Rodolfi, N. Biondi, M. R. Tredici // Algal Research – 2019. – T. 42. – 101617.

17. Caporgno, M. P. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits / M. P. Caporgno, A. Mathys // Frontiers in Nutrition – 2018. – T. 5. – №58. – doi: 10.3389/fnut.2018.00058.

18. Adarme-Vega, T. C. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production / T. C. Adarme-Vega, D. K. Y. Lim, M. Timmins, F. Vernen, Y. Li, P. M. Schenk // Microbial Cell Factories – 2012. – T. 11. – №96. – doi: 10.1186/1475-2859-11-96

19. Politaeva, N. A. К вопросу безотходной технологии использования биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* для получения липидов и

сорбентов / N. A. Politaeva, I. V. Atamanyuk, Y. A. Smyatskaya, T. A. Kuznetsova, A. Toumi, P. B. Razgovorov // Экологические проблемы химии и химической технологии– 2018. – Т. 61.– №12. – С. 137-143.

20. Pandey, A. Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels from Algae, Edition 2 / A. Pandey, D. J. Lee, J. Chang, Y. Chisti, C. R. Soccol // Elsevier – 2018. – 603 с.

21. Politaeva, N. Effect of laser radiation on the cultivation rate of the microalga *Chlorella sorokiniana* as a source of biofuel / N. Politaeva, Y. Smyatskaya, V. Slugin, A. Toumi, M. Bouabdelli // IOP Conference Series Earth and Environmental Science – 2018. – Т. 115.– №1. – 012001.

22. Sorokin, C. A high-temperature strain of *Chlorella* / C. Sorokin, J. Myers // Science – 1953. – Т. 117.– С. 330-331.

23. Wu, H. L. Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences / H. L. Wu, R. S. Hseu, L. P. Lin // Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei – 2001. – Т. 42.– С. 115-121.

24. Mondal, M. Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiniana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes / M. Mondal, A. Ghosh, O. N. Tiwari, K. Gayen, P. Das, M. K. Mandal, G. Halder // Energy Conversion and Management – 2017. – Т. 145.– С. 247-254.

25. Béchet, Q. Outdoor cultivation of temperature-tolerant *Chlorella sorokiniana* in a column photobioreactor under low power-input / Q. Béchet, R. Muñoz, A. Shilton, B. Guieysse // Biotechnology Bioengineering – 2013. – Т. 110.– №1. – С. 118-126.

26. Jiang, L. Lipid productivity in limnetic *Chlorella* is doubled by seawater added with anaerobically digested effluent from kitchen waste / L. Jiang, L. Zhang, C. Nie, H. Pei // Biotechnology for Biofuels – 2018. – Т. 11.– №68. – doi: 10.1186/s13068-018-1064-5.

27. Kim, B. *Chlorella sorokiniana* HS1, a novel freshwater green algal strain, grows and hyperaccumulates lipid droplets in seawater salinity / B. Kim, R.

Ramanan, Z. Kang, D. Cho, H. Oh, H. Kim // Biomass and Bioenergy Bioengineering – 2016. – Т. 85.– С. 300-305.

28. Azaman, S. N. A. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions / S. N. A. Azaman, N. Nagao, F. M. Yusoff, S. W. Tan, S. K. Yeap // Peer-Reviewed Scientific Mega Journal – 2017. – Т. 5.– e3473.

29. Clement-Larosière, B. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂ : дисс. ... PhD: Sciences pour l'ingénieur / Barbara Clement-Larosière – Paris, 2014. – 211 с.

30. Safi, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review / C. Safi, B. Zebi, O. Merah, Pierre-Yves Pontalier, Carlos Vaca-Garcia // Renewable and Sustainable Energy Reviews – 2014. – Т. 35.– С. 265-278.

31. Janssen, M. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light/dark cycles: 13–87 s / M. Janssen, T. C. Kuijpers, B. Veldhoen, M. B. Ternbach, J. Tramper, L. R. Mur, R. H. Wijffels // Journal of Biotechnology – 1999. – Т. 70.– С. 323-333.

32. Richmond, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology / A. Richmond // Oxford – 2004. – 566 с.

33. Hovde, B. T. Genomic characterization reveals significant divergence within *Chlorella sorokiniana* (Chlorellales, Trebouxiophyceae) / B. T. Hovde, E. R. Hanschen, C. R. Steadman Tyler, C. Lo, Y. Kunde, K. Davenport, H. Daligault, J. Msanne, S. Canny, S. Eyun, J. M. Riethoven, J. Polle, S. R. Starckenburg // Algal Research – 2018. – Т. 35.– С. 449-461.

34. Blanc, G. The *Chlorella variabilis* NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex / G. Blanc, G. Duncan, I. Agarkova, M. Borodovsky, J. Gurnon, A. Kuo, E. Lindquist, S. Lucas, J. Pangilinan, J. Polle, A. Salamov, A. Terry, T. Yamada, D. D. Dunigan, I. V.

Grigoriev, J. Claverie, J. L. Van Etten // *The Plant Cell* – 2010. – T. 22.– C. 2943-2955.

35. Levine, I. A. *Microalgae in Health and Disease Prevention* / I. A. Levine, J. Fleurence // Elsevier – 2018. – 354 c.

36. Jorgensen, S. E. *Encyclopedia of Ecology* / S. E. Jorgensen, B. Fath // Elsevier – 2008. – 3120 c.

37. M. Cecchin, Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana* / M. Cecchin, S. Benfatto, F. Griggio, A. Mori, S. Cazzaniga, N. Vitulo, M. Delledonne, M. Ballottari // *Scientific reports* – 2018. – T. 8.– 6465 | doi:10.1038/s41598-018-24979-8.

38. Rosenberg, J. N. Comparative Analyses of three *Chlorella* Species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *C. sorokiniana* / J. N. Rosenberg, N. Kobayashi, A. Barnes, E. A. Noel, M. J. Betenbaugh, G. A. Oyler // *PloS one* – 2014. – T. 9.– e92460. doi:10.1371/journal.pone.0092460.

39. Liang, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions / Y. Liang, N. Sarkany, Y. Cui // *Biotechnology Letters* – 2009. – T. 31.– №7.– C. 1043-1049.

40. Chai, S. Characterization of *Chlorella sorokiniana* growth properties in monosaccharide- supplemented batch culture / Chai S, Shi J, Huang T, Guo Y, Wei J, Guo M, et al // *PloS one* – 2018. – T. 13.– №7.– e0199873. doi: 10.1371/journal.pone.0199873.

41. Belkoura, M. Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss / M. Belkoura, A. Benider, A. Dauta // *Annales de Limnologie* – 1997. – T. 33.– №1. – C. 3-11.

42. Zhang, Y. M. Nitrogen starvation induced oxidative stress in an oil-producing green alga *Chlorella sorokiniana* C3 / Y. M. Zhang, H. Chen, C. L. He, Q. Wang // *PloS one, Limnologie* – 2013. – T. 8.– №7. – e69225. doi : 10.1371/journal.pone.0069225

43. Cordero, B. F. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis / B. F. Cordero, I. Obratsova, I. Couso, R. Leon, M. A. Vargas, H. Rodriguez // Marine drugs– 2011. – T. 9.– №9. – C. 1607-1624.
44. Lordan, S. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases / S. Lordan, R.P. Ross, C. Stanton // Mar Drugs– 2011. – T. 9.– №6. – C. 1056-1100.
45. Rani, K. A comprehensive review on chlorella- its composition, health benefits, market and regulatory scenario / K. Rani, N. Sandal, P.K. Sahoo // The Pharma Innovation Journal– 2018. – T. 7.– №7. – C. 584-589.
46. İnanç, A. L. Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils / A. L. İnanç // Akademik Gıda – 2011. – T. 9.– №2. – C. 26-32.
47. Niccolai, A. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility / A. Niccolai, G. C. Zittelli., L. Rodolfia, N. Biondia, M. R. Tredici// Algal Research – 2019. – T. 42.– 101617.
48. Becker, E. Micro-algae as a source of protein / E. Becker // Biotechnology Advances – 2007. – T. 25.–№2. – C. 207-210.
49. Moheimani, N. R. Nutritional profile and in vitro digestibility of microalgae grown in anaerobically digested piggery effluent / N. R. Moheimani, A. Vadiveloo, J. M. Ayre, John R. Pluske //Algal Research – 2018. – T. 35.– C. 362-369.
50. Doucha, J. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers / J. Doucha, K. Lívanský // Applied Microbiology and Biotechnology – 2008. – T. 81.–№3. – C. 431-440.
51. Janczyk, P. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats / P. Janczyk, H. Franke, W.B. Souffrant // Animal Feed Science and Technology – 2007. – T. 132.– C. 163-169.

52. Singh, L. K. Liquid Biofuel Production / L. K. Singh, G. Chaudhary // John Wiley & Sons – 2019. – 408 c.

53. García, J. L. Microalgae, old sustainable food and fashion nutraceuticals / J. L. García, M. de Vicente, B. Galán // Microbial Biotechnology – 2017. – T. 10.–№5. – C. 1017-1024.

54. de-Bashan, L. E. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater / L. E. de-Bashan, A. Trejo, V. A. R. Huss, J. P. Hernandez, Y. Bashan // Bioresource Technology – 2008. – T. 99.–№11. – C. 4980–4989.

55. Qiao, H. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01 / H. Qiao, G. Wang, // Chinese Journal of Oceanology and Limnology – 2009. – T. 27.–№ 762. – doi: 10.1007/s00343-009-9216-x.

56. Kobayashi, N. Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure / N. Kobayashi, E. A. Noel, A. Barnes, A. Watson, J. N. Rosenberg, G. Erickson, G. A. Oyler // Bioresource Technology – 2013. – T. 150.– C. 377-386.

57. Jacob-Lopes, E. Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries / E. Jacob-Lopes, M. M. Maroneze, M. C. Deprá, R. B. Sartori, R. R. Dias, L. Q. Zepka // Current Opinion in Food Science – 2019. – T. 25.– C. 1-7.

58. Madeira, M. S. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. / M. S. Madeira, C. Cardoso, P. A. Lopes, D. Coelho, C. Afonso, N. M. Bandarra, J. A. M. Prates // Livestock Science – 2017. – T. 205.– C. 111-121.

59. Camacho, F. Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review / F. Camacho, A. Macedo, F. Malcata // Marine Drugs – 2019. – T. 17.–№ 6. – 312.

60. Akbari Moghaddam Kakhki, R. Impact of feeding microalgae (*Aurantiochytrium limacinum*) and co-extruded mixture of full-fat flaxseed as

sources of n-3 fatty acids to ISA brown and Shaver white breeders and progeny on pullet skeletal attributes at hatch through to 18 weeks of age / R. Akbari Moghaddam Kakhki, K.R. Price, J. Moats, G. Bédécarrats, N.A. Karrow, E.G. Kiarie // Poultry Science – 2020. – T. 99.– № 4. – C. 2087-2099.

61. Doelle, H. W. Biotechnology - Volume VII: Fundamentals in Biotechnology / H. W. Doelle, J. S. Rokem, M. Berovic // EOLSS Publications– 2009. – 500 c.

62. Sathasivam, R. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries / R. Sathasivam, J. S. Ki. // Marine Drugs– 2018. – T. 16.–№ 1. – 26 – doi: 10.3390/md16010026.

63. Singh, D. P. Microalgae: a source of natural colours / D. P. Singh, G. Kaur // I. K. International Pvt Ltd – 2009. – 278 c.

64. Das, S. K. Production of biofuel and bioplastic from *Chlorella pyrenoidosa* / S. K. Das, A. Sathish, J. Stanley // Materials Today: Proceedings – 2018. – T. 5.– № 8. – C. 16774-16781.

65. Khan, M. I. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products / M. I. Khan, J. H. Shin, J. D. Kim // Microbial Cell Factories – 2018. – T. 17.– № 1. – 36 – doi: 10.1186/s12934-018-0879-x

66. Bholá, V. Overview of the potential of microalgae for CO₂ sequestration / V. Bholá, F. Swalaha, R. R. Kumar, M. Singh, F. Bux // International Journal of Environmental Science and Technology – 2014. – T. 11 – C. 2103-2118.

67. Tao, R. Nutrient and organic matter removal from wastewaters with microalgae. дисс. ... PhD: Materials – Paris, 2019. – 153 c.

68. Bušić, A. Recent Trends in Biodiesel and Biogas Production / A. Bušić, S. Kundas, G. Morzak, H. Belskaya, N. Marđetko, M. I. Šantek, D. Komes, S. Novak, B. Šantek // Food Technology and Biotechnology – 2018. – T. 56.–№2. – C. 152-173.

69. Pongpadung, P. Stimulation of hydrogen photoproduction in *Chlorella sorokiniana* subjected to simultaneous nitrogen limitation and sulfur- and/or phosphorus-deprivation / P. Pongpadung, L. Zhang, R. Sathasivam, K. Yokthongwattana, N. Juntawong, J. Liu // *Journal of Pure Applied Microbiology* – 2018. – Т. 12.–№4. – С. 1719-1727.
70. Duailibe, A. K. Combustíveis no Brasil, Desafios e Perspectivas. / A. K. Duailibe // *Synergia*, Rio de Janeiro – 2012. – 298 с.
71. Posten, C. Microalgae Biotechnology/ C. Posten, S. F. Chen // *Switzerland* – 2016. – 188 с.
72. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // *Biotechnological Advances* – 2007. – Т. 25.– С. 294-306.
73. Ugwu, C.U. Photobioreactors for mass cultivation of algae / C.U. Ugwu, H. Aoyagi, H. Uchiyama // *Bioresource Technology* – 2008. – Т. 99.– С. 4021-4028.
74. Campo, J. A. D. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoids production: current state and perspectives / J. A. D. Campo, M. García-González, M. G. Guerrero // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2007. – Т. 74.– С. 1163-1174.
75. Algal Fuels [Электронный ресурс] / My Florida Home Energy – Электрон. дан. – Florida, 2020. – Режим доступа: <http://www.myfloridahomeenergy.com/help/library/energy-services/algal-fuels/#sthash.LzcZpXDL.eULwzDH2.dpbs> [Дата обращения: 29 сентября 2017].
76. Mondal, M. Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review / M. Mondal, S. Goswami, A. Ghosh, G. Oinam, O. N. Tiwari, P. Das, K. Gayen, M. K. Mandal, G. N. Halder // *3 Biotech* – 2017. – Т. 7.– 99.
77. de-Bashan, L. E., Bashan, Y. Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant–bacterium interactions / de-Bashan, L. E., Bashan, Y. // *Applied and Environmental Microbiology* – 2008. – Т. 74.– С. 6797-6802.

78. Ugwu, C. U. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana* / C. U. Ugwu, H. Aoyagi, H. Uchiyama // *Photosynthetica* – 2007. – T. 45.– C. 309-311.

79. Janssen, M. J. F. W. Transbilayer movement of phosphatidylcholine in the mitochondrial outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is rapid and bidirectional / M. J. F. W. Janssen, M. C. Koorengevel, B. de Kruijff, A. I. P. M. de Kroon // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes Proceedings* – 1999. – T. 1421.– № 81 – C. 64-76.

80. Falk, S. Temperature-dependent photoinhibition and recovery of photosynthesis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* acclimated to 12 and 27°C / S. Falk, G. Samuelsson, G. Öquist // *Physiologia Plantarum* – 1990. – T. 78.– № 2 – C. 173-180.

81. Sorokin C, Krauss RW. Effects of Temperature & Illuminance on *Chlorella* Growth Uncoupled From Cell Division / C. Sorokin, R. W. Krauss // *Plant Physiology* – 1962. – T. 37.– № 1 – C. 37-42.

82. Franco, M. C. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions / M. C. Franco, M. F. Buffing, M. Janssen, C. V. Lobato, R. H. Wijffels // *Journal of applied phycology* – 2012. – T. 24.– C. 693-699.

83. Raven, J. A. Effect of Temperature and External pH on the Cytoplasmic pH of *Chara corallina* / J. A. Raven, F. A. Smith // *Journal of Experimental Botany* – 1978. – T. 29 – № 111 – C. 853-866.

84. Chen, C. Y. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton / C.Y. Chen, E.G. Durbin // *Marine Ecology Progress Series* – 1994. – T. 109 – C. 83-94.

85. Rai, L. C. Algal Adaptation to Environmental Stresses / L. C. Rai, J. P. Gaur // Springer, Berlin – 2001. – 421 c.

86. Marchand, J. Ion and metabolite transport in the chloroplast of algae: lessons from land plants / J. Marchand, P. Heydarizadeh, B. Schoefs, C. Spetea // *Cellular and molecular life sciences* – 2018. – T. 75 – № 12 – C. 2153-2176.

87. Cortés, A. A. Effects of pH on the growth rate exhibited of the wild-type and Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strains / A. A. Cortés, S. Sánchez-Fortún, M. García, M. C. Bartolomé // *Limnetica* – 2018. – T. 37 – № 2 – C. 229-238.

88. Wang, H. K. Bioaccumulation of nickel by algae/ H. K. Wang, J. M. Wood // *Environmental Science and Technology* – 1984. – T. 18 – № 2 – C. 106-109.

89. Bartley, M. L. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms / M.L. Bartley, W.J. Boeing, B.N. Dungan, F.O. Holguin, T. Schaub // *Journal of Applied Phycology* – 2014. – T. 26 – № 2 – C. 1431-1437.

90. Chi, Z. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture / Chi, Z., O'Fallon, J. V., & Chen, S. // *Trends in Biotechnology* – 2011. – T. 29 – № 11 – C. 537-541.

91. Qiu, R. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana* / R. Qiu, S. Gao, P. A. Lopez, K. L. Ogden// *Trends in Biotechnology* – 2017. – T. 28– C. 192-199.

92. Kumar, K. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass / K. Kumar, C. N. Dasgupta, D. Das // *Bioresource Technology* – 2014. – T. 167– C. 358-366.

93. Mata, T. M. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review / T. M. Mata, A. A. Martins, N. S. Caetano // *Renewable and sustainable energy reviews* – 2010. – T. 14 – C. 217-232.

94. Pirt, S. J. Maximum photosynthetic efficiency: A problem to be resolved / S. J. Pirt // *Biotechnology and Bioengineering* – 1983. – T. 25 – C. 1915-1922.

95. Wang, S. K. Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics / S. K. Wang, A. R. Stiles, C. Guo, C. Z. Liu // *Engineering in life science* – 2014. – T. 14 – № 6 – C. 550-559.

96. Pilon, L. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae / L. Pilon, H. Berberoğlu, R. Kandilian //

Journal of quantitative spectroscopy and radiative transfer – 2011. – T. 112 – C. 2639-2660.

97. Carvalho, A. P. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects / A. P. Carvalho, S. O. Silva, J. M. Baptista, F. X. Malcata // Applied microbiology and biotechnology – 2011. – T. 89 – C. 1275-1288.

98. Ke, B. Photosynthesis. Photobiochemistry and Photobiophysics / B. Ke // Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands – 2001. – 763 c.

99. Chuzhao, L. Research progress on light characteristics of microalgae culture / L. Chuzhao, L. Rui, W. Feng // Chinese Journal of Bioprocess Engineering – 2011. – T. 9 – № 6 – C. 70-74.

100. Eilers, P.H.C. A model for the relationship between light. intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton / P.H.C. Eilers, J.C.H. Peeters // Ecological Modelling – 1988. – T. 42 – C. 199-215.

101. S. L. Choi, Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter / S. L. Choi, I.S. Suh, C. G. Lee // Enzyme and microbial technology – 2003. – T. 33 – C. 403-409.

102. Imaizumi, Y. Lumostatic operation controlled by the optimum light intensity per dry weight for the effective production of *Chlorella zofingiensis* in the high cell density continuous culture / Y. Imaizumi, N. Nagao, F.M. Yusoff, N. Kurosawa, N. Kawasaki, T. Toda // Algal Research – 2016. – T. 20 – C. 110-117.

103. Sorokin, C. The effects of light intensity on the growth rates of green algae / C. Sorokin, R.W. Krauss // Plant Physiology – 1958. – T. 33 – № 2 – C. 109-113.

104. Fábregas, J. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture / J. Fábregas, A. Maseda, A. Domínguez, A. Otero //, World journal of microbiology and biotechnology – 2004. – T. 20 – C. 31-35.

105. Lee, T. Optimal Temperature and Light Intensity for Improved Mixotrophic Metabolism of *Chlorella sorokiniana* Treating Livestock Wastewater / T. Lee, J. K. Jang, H. Kim // Journal of Microbiology and Biotechnology – 2017. – T. 27 – № 11 – C. 2010-2018.

106. Kumar, K. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass / D. A. Kumar, C. Nag, D. D. Das // Bioresource Technology – 2014. – T. 167 – C. 358-366.

107. Kim, S.-K. Handbook of Marine Microalgae / S.-K. Kim// Boston: Academic Press – 2015. – 604 c.

108. Alqadi, M. Effect of photoperiod on the growth of *Chlamydomonas incerta* and pollutant removal / M. Alqadi, S. M. Taib, M. F. M. Din, H. Kamyab // Malaysian Journal of Civil Engineering – 2017. – T. 1 – № 69 – C. 69-78.

109. Khoeyi, Z. A. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris* / Z. A. Khoeyi, J. Seyfabadi, Z. Ramezanpour // Aquaculture International – 2017. – T. 20 – C. 41-49.

110. Belkoura, M. Interaction lumière-température et influence de la photopériode sur le taux de croissance de *Chlorella sorokiniana* Shih. et Kraus / M. Belkoura, A. Dauta // Annales de Limnologie – 1992. – T. 28 – № 2 – C. 101-107.

111. Janssen, M. Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield / дисс. ... PhD : Janssen Marcel – Wageningen, 2002. – 184 c.

112. Juneja, A. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review / A. Juneja, R. M. Ceballos, G. S. Murthy // Energies – 2013. – T. 6 – C. 4607-4638.

113. Kommareddy, A. Study of light requirements of a photobioreactor / A. Kommareddy, G. Anderson // ASAE/CSAE Conference Presentation– Winnipeg, USA, 2004. – MB04- C. MB04-111

114. Figueroa, F. L. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta) / F.L.

Figuroa, J. Aguilera, F.X. Niell // European journal of phycology – 1995. – T. 30 – C. 11-18.

115. Zhao, Y. Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process / Y. Zhao, J. Wang, H. Zhang, C. Yan, Y. Zhang // Bioresource Technology – 2013. – T. 136 – C. 461-468.

116. Yan, C. Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios / C. Yan, L. Zhang, X. Luo, Z. Zheng // Ecological engineering – 2013. – T. 51 – C. 24-32.

117. Koc, C. Use of red and blue light-emitting diodes (LED) and fluorescent lamps to grow microalgae in a photobioreactor / C. Koc, , G. A. Anderson, A. Kommareddy // Israeli journal of aquaculture-Bamidgeh – 2012. – T. 65 – C. 1-10.

118. Kim, D.G. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris* / D. G. Kim, C. Lee, , S. M. Park, Y. E. Choi // Bioresource Technology – 2014. – T. 159 – C. 240-248.

119. Asuthkar, M. Effect of different wavelengths of light on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* / M. Asuthkar, Y. Gunti, R. S. Rao, C. S. Rao, R. Yadavalli // International journal of pharmaceutical sciences and research – 2016. – T. 48 – C. 847-851.

120. Katsuda, T. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs / T. Katsuda, A. Lababpour, K. Shimahara, S. Katoh // Enzyme Microbiology Technology – 2004. – T. 35 – C. 81-86.

121. Oldenhof, H. Blue light delays commitment to cell division in *Chlamydomonas reinhardtii* / H. Oldenhof, V. Zachleder, H. Ende // Plant Biology – 2004. – T. 6 – C. 689-695.

122. H. Senger, Blue Light Effects in Biological Systems / Senger, H. // Springer, Berlin – 1984. – 538 c.

123. Atta, M. Intensity of Blue LED Light: A Potential Stimulus for Biomass and Lipid Content in Fresh Water Microalgae *Chlorella Vulgaris* / M. Atta, A. I. A. Bukhari, S. Wahidin // Bioresource Technology – 2013. – Т. 148 – С. 373-378.

124. Толеутаев, К. А. Оптические методы контроля процессов культивирования микроводоросли Хлореллы : дисс. ... маг.: 12.04.02/ Толеутаев Канат Амантаевич – Т., 2018. – 135 с.

125. Eyster, C. Micronutrient Requirements for Green Plants, Especially Algae / C. Eyster // Springer, Boston – 1964. – 434 с.

126. Leghari, S. J. Role of Nitrogen for Plant Growth and Development: A review / S. J. Leghari, N. A. Wahocho, G. M. Laghari, A. H. Laghari, G. M. Bhabhan, K. H. Talpur, T. Ahmed, S. A. Wahocho, A. A. Lashari // Advances in Environmental Biology – 2016. – Т. 10 – № 9 – С. 209-218.

127. Negi, S. Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* / S. Negi, A. N. Barry, N. Friedland, N. Sudasinghe, S. Subramanian, S. Pieris, F. O. Holguin, B. Dungan, T. Schaub, R. Sayre // Journal of Applied Phycology – 2015. – Т. 28 – № 2 – С. 803-812.

128. Luque, R. Handbook of Biofuels Production /R. Luque, J. Campelo, J. Clark // Woodhead Publishing, Cambridge – 2011. – 688 с.

129. Ben Moussa, I. D. Nitrogen or Phosphorus Repletion Strategies for Enhancing Lipid or Carotenoid Production From Tetraselmis Marina / I. D. Ben Moussa, H. Chtourou, F. Karray, S. Sayadi, A. Dhouib // Bioresource Technology – 2017. – Т. 238 – С. 325-332.

130. Bajwa, K. Evaluation of nutrient stress (nitrogen, phosphorus regimes) on physio-biochemical parameters of oleaginous micro algal strains and SEM study under nutrient stress / K. Bajwa, N. R. Bishnoi, A. Kirrolia, S. T. Selvan // International journal of environmental science and natural resources – 2018. – Т. 10 – № 1 – 555776.

131. Becker, E. W. Microalgae: Biotechnology and microbiology / E. W. Becker // Cambridge University Press, New York – 1994. – 293 с.

132. Anderson, D. M. Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms / D. M. Anderson, A. D. Cemballa, G. Hallegraeff // Springer Berlin Heidelberg – 1998. – 662 с.
133. Ghafari, M. Effects of macro and micronutrients on neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae / M. Ghafari, B. Rashidi, B. Z. Haznedaroglu // Biofuels – 2016. – Т. 9 – С. 147-156.
134. Скурихин, И. М. Все о пище с точки зрения химика / И. М. Скурихин, А. П. Нечаев / Высшая школа, Москва – 1991. – 288 с.
135. Christie, W. W. Lipid Analysis 4th Edition / W. W. Christie, X. Han // Oily Press Lipid Library– 2010. – 448 с.
136. Bloor, W. R. Outline of a classification of the lipoids / W. R. Bloor // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine – 1920. – Т. 17– № 6 – С. 138-140.
137. Callejón, M. J. J. Simultaneous extraction and fractionation of lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. for the production of EPA-rich polar lipid concentrates / M. J. J. Callejón, A. R. Medina, P. A. G. Moreno, L. E. Cerdán, S. O. Guillén, E. M. Grima // Journal of Applied Phycology – 2020. – Т. 32 – С. 1117-1128.
138. Chen, L. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion / L. Chen, T. Liu, W. Zhang, W. Chen, X. Chen, J. Wang // Bioresource Technology – 2012. – Т. 111 –С. 208-214.
139. Barcelos, T. T. Liquid–Liquid Extraction of Neutral Lipids and Free Fatty Acids from Microalgae Oil / T. T. Barcelos, M. Martins, R. Sousa, J. S. d. R. Coimbra // Journal of Chemical Engineering – 2018. – Т. 63 – № 9 – С. 3391-3399.
140. Kumari, P. Algal lipids, fatty acids and sterols / P. Kumari, M. Kumar, C.R.K. Reddy, B. Jha // Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals – 2013. – С. 87-134.
141. Borowitzka, M. A. Algae for Biofuels and Energy/ M. A. Borowitzka, N. R. Moheimani // Springer Netherlands – 2013. – 288 с.

142. Guihéneuf, F. LC-PUFA-Enriched Oil Production by Microalgae: Accumulation of Lipid and Triacylglycerols Containing n-3 LC-PUFA Is Triggered by Nitrogen Limitation and Inorganic Carbon Availability in the Marine Haptophyte *Pavlova lutheri* / F. Guihéneuf, D.B. Stengel // *Marine Drugs* – 2013. – T. 11 – № 11 – C. 4246-4266.
143. Rueda, C. R. Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases : дисс. ... Ph.D. Microbiology and Biotechnology / Cristian Ruiz Rueda – 2006. – 475 с.
144. Metzger, P. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids / P. Metzger, C. Largeau // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2005. – T. 66 – C. 486-496.
145. Donovan, D. H. Mechanisms of lipid peroxidation: Iron catalyzed decomposition of fatty acid hydroperoxides as the basis of hydrocarbon evolution in vivo / D. H. Donovan, D. B. Menzel // *Experientia* – 1978. – T. 34 – C. 775-776.
146. Kim, S.-K., Potential beneficial effects of marine algal sterols on human health / S.-K. Kim, Q. Van Ta // *Advances in Food and Nutrition Research* – 2011. – T. 64 – C. 191-198.
147. Fich, E. A. The plant polyester cutin: biosynthesis, structure, and biological role / E. A. Fich, N. A. Segerson, J. K. Rose // *Annual Review of Plant* – 2016. – T. 67 – C. 207-233.
148. Guschina, I. A. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry / I. A. Guschina, J. L. Harwood // *Lipids in aquatic ecosystems*. Springer, New York – 2009. – C. 1-24.
149. Iwasaki, K. Visualizing wax ester fermentation in single *Euglena gracilis* cells by Raman microspectroscopy and multivariate curve resolution analysis / K. Iwasaki, A. Kaneko, Y. Tanaka, T. Ishikawa, H. Noothalapati, T. Yamamoto // *Biotechnology for Biofuels* – 2019. – T. 12 – № 128 – doi: 10.1186/s13068-019-1471-2.

150. Schots, P. C. Possible health effects of a wax ester rich marine oil / P. C. Schots, A. M. Pedersen, K-E. Eilertsen, R. L. Olsen, T. St. Larsen // *Frontiers in pharmacology* – 2020. – T. 11 – № 961 – doi: 10.3389/fphar.2020.00961.

151. Höper, A. C. Wax esters from the marine copepod *Calanus finmarchicus* reduce diet-induced obesity and obesity-related metabolic disorders in mice / A. C. Höper, W. Salma, S. J. Sollie, A. D. Hafstad, J. Lund, A. M. Khalid J. Raa, E. Aasum, T. S. Larsen // *Journal of nutrition* – 2014. – T. 144 – № 2 – C. 164-169.

152. Sergeant, S. Gamma-linolenic acid, dihommo-gamma linolenic, eicosanoids and inflammatory processes / S. Sergeant, E. Rahbar, F.H. Chilton // *European journal of pharmacology* – 2016. – T. 785– C. 77-86.

153. Dato, V. D. Animal-like prostaglandins in marine microalgae / V. D. Dato, I. Orefice, A. Amato, C.a Fontanarosa, A. Amoresano, A. Cutignano, A. Ianora, G. Romano // *The ISME Journal* – 2017. – T. 11– C. 1722-1726.

154. Tremolieres, A. Role of acyl lipids in the function of photosynthetic membranes in higher plants / A. Tremolieres, P-A . Siegenthaler // In: *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht – 1998. – C. 145-173.

155. Lu, Y. Molecular cloning and stress-dependent expression of a gene encoding Δ 12- fatty acid desaturase in the Antarctic microalga *Chlorella vulgaris* NJ-7 / Y. Lu, X. Chi, Q. Yang, Z. Li, S. Liu, Q. Gan, S. Qin // *Extremophiles* – 2009. – T. 13– № 6 – C. 875-884.

156. Jiang, H. Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) / H. Jiang, K. Gao // *Journal of Phycology* – 2004. – T. 40 – C. 651-654.

157. Harwood, J. L. Membrane lipids in algae / J. L. Harwood // In: *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht – 1998. – C. 53-64.

158. White, D. A. Modulation of polar lipid profiles in *Chlorella sp.* In response to nutrient Limitation / D. A. White, P. A. Rooks, S. Kimmance, K. Tait, M. Jones, G. A. Tarran, C. Cook and C. A. Llewellyn // *Metabolites* – 2019. – T. 9 – № 39 – doi: 10.3390/metabo9030039.

159. Martin, G.J.O. Lipid profile remodeling in response to nitrogen deprivation in the microalgae *Chlorella sp.* (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis sp.* (Eustigmatophyceae) / G.J.O. Martin, D.R.A. Hill, I.L.D. Olmstead, A. Bergamin, M.J. Shears, D.A. Dias, S.E. Kentish, P.J. Scales, C.Y. Botte, D.L. Callahan // *PLoS ONE* – 2014. – T. 9, e103389.

160. Dembitsky, V.M. Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology / V.M. Dembitsky // *Progress in lipid research* – 1996. – T. 35 – C. 1-51.

161. Gladu, P. K. Sterol, fatty acids, and pigment characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae) / P. K. Gladu, G.W. Patterson, G. H. Wikfors, B. C. Smith // *Journal of phycology* – 1995. – T. 31 – C. 774-777.

162. Haigh, W. G. The characterization and cyclic production of highly unsaturated homoserine lipid in *Chlorella minutissima* / W. G. Haigh, T. F. Yoder, L. Ericson, T. Pratum, R. R. Winget // *Biochimica et Biophysica Acta* – 1996. – T. 1299 – C. 183-190.

163. Ntambi, J. M. *Lipid Signaling and Metabolism* / J. M. Ntambi // Academic Press, USA – 2020. – 545 c.

164. Tan, K.W. The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth / K.W. Tan, Y.K. Lee // *Biotechnology for Biofuels* – 2016. – T. 9 – № 255.

165. Quintana, N. Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering / N. Quintana, F. Van der Kooy, M.D. Van de Rhee, G.P. Voshol, R. Verpoorte // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2011. – T. 91 – C. 471-490

166. Borowitzka, M. A. Fats, oils and hydrocarbons. In *Micro-algal biotechnology* / M. A. Borowitzka, L. J. Borowitzka // Cambridge University Press, New York – 1988 – C. 200–234.

167. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // *Biotechnology Advances* – 2007. – T. 25 – № 3 – C. 294-306.

168. Nascimento, I. A. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria / I. A. Nascimento, S. S. I. Marques, I. T. D. Cabanelas, S. A. Pereira, J. I. Druzian, C. O. de Souza D. V. Vich, G. C. de Carvalho, M. A. Nascimento // *BioEnergy Research* – 2013. – T. 6 – № 1 – C. 1-13.

169. Rodolfi, L. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor / L. Rodolfi, G.C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici // *Biotechnology and Bioengineering* – 2009. – T. 102 – № 1 – C. 100-112.

170. Hu, Q. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances / Q. Hu, M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins // *the plant journal* – 2008. – T. 54 – № 4 – C. 621-639.

171. Erwin, J.A. Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. In *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms* / J.A. Erwin // Academic Press, New York – 1973 – C. 141-143.

172. Maeda, Y. Structure and properties of oil bodies in diatoms / Y. Maeda, D. Nojima, T. Yoshino, T. Tanaka // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* – 2017. – T. 372 – № 1728 – doi: 10.1098/rstb.2016.0408.

173. Zienkiewicz, K. Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae: molecular, cellular and physiological insights / K. Zienkiewicz, Z.Y. Du, W. Ma, K. Vollheyde, C. Benning // *Biochimica et Biophysica Acta* – 2016. – T. 1861 – C. 1269-1281.

174. Nikiforidis, C.V. Structure and functions of oleosomes (oil bodies) / C.V. Nikiforidis // *Advances in Colloid and Interface Science* – 2019. – Т. 274–102039 – doi: 10.1016/j.cis.2019.102039.

175. Aratboni, H. A. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications / H. A. Aratboni, N. Rafiei, R. Garcia-Granados, A. Alemzadeh, J. R. Morones-Ramírez // *Microbial Cell Factories* – 2019. – Т. 18–178 – doi: 10.1186/s12934-019-1228-4.

176. Degournay, A. Compréhension du métabolisme central et lipidique chez les plantes et les levures oléagineuses : approche fluxomique CO₂ : дисс. ... PhD: Biotechnologies / Anthony Degournay – Compiègne, 2018. – 211 с.

177. Bhagavan, N.V. Essentials of Medical Biochemistry: With Clinical Cases (second edition) / N.V. Bhagavan, C-E Ha // Academic Press, New York – 2015 –. 752 с.

178. Baud, S. Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana* / S. Baud, S. Wuillème, B. Dubreucq, A. De Almeida, C. Vuagnat, L. Lepiniec, M. Miquel, C. Rochat // *the plant journal* – 2007. – Т. 52 – № 4 – С. 405-419.

179. Zhang, J.Y. Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis / J.Y. Zhang, K.S. Kothapalli, J.T. Brenna // *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* – 2016. – Т. 19 – № 2 – С. 103-110.

180. Griffiths, M. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production / M. Griffiths, S. Harrison // *Journal of Applied Phycology* – 2009. – Т. 21 – № 5 – С. 493-507.

181. Sawangkeaw, R. A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production / R. Sawangkeaw, S. Ngamprasertsith // *Renewable and Sustainable Energy Review* – 2013. – Т. 25 – С. 97-108.

182. Breuer, G. Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in

Scenedesmus obliquus / G. Breuer, P. Lamers, D. Martens, R. Draaisma, R. Wijffels // *Bioresource Technology* – 2013. – T. 143 – C. 1-9.

183. Shen, P.-L. Identification of characteristic fatty acids to quantify triacylglycerols in microalgae / P.-L. Shen, H.-T. Wang, Y.-F. Pan, Y.-Y. Meng, P.-C. Wu and S. Xue // *Frontiers in Plant Science* – 2016. – T. 7 – № 162 – doi: 10.3389/fpls.2016.00162.

184. Morales, M. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species / M. Morales, C. Aflalo, O. Bernard // *Biomass and Energy* – 2021. – T. 150 – 106108.

185. Doshi, A. Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels: A review / A. Doshi, S. Pascoe, L. Coglean, T. J. Rainey // *Renewable and Sustainable Energy Reviews* – 2016. – T. 64 – C. 329-337.

186. Chu, W-L. Strategies to enhance production of microalgal biomass and lipids for biofuel feedstock / W-L. Chu // *European Journal of Phycology* – 2017. – T. 52 – № 4 – C. 419-437.

187. Arora, N. A hybrid approach integrating arsenic detoxification with biodiesel production using oleaginous microalgae / N. Arora, K. Gulati, A. Patel, P.A. Pruthi, K.M. Poluri, V. Pruthi // *Algal Research* – 2017. – T. 24 – C. 29-39.

188. Arora, N. Insights into the enhanced lipid production characteristics of a fresh water microalga under high salinity conditions / N. Arora, A. Patel, M. Sharma, J. Mehtani, P.A. Pruthi, V. Pruthi, K.M. Poluri // *Industrial and Engineering Chemistry Research* – 2017. – T. 25 – C. 7413-7421.

189. Singh, P. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae / P. Singh, S. Kumari, A. Guldhe, R. Misra, I. Rawat, F. Bux, // *Renewable and Sustainable Energy Reviews* – 2016. – T. 55 – C. 1-16.

190. Ho, S.-H. Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy / S.-H. Ho, A. Nakanishi X.Ye, J.-S. Chang, K. Hara, T. Hasunuma, A. Kondo // *Biotechnology for Biofuels* – 2014. – T. 7 – № 97.

191. Arora, N. Leveraging algal omics to reveal potential targets for augmenting TAG accumulation / N. Arora, P. T. Pienkos, V. Pruthi, K. M. Poluri, M. T. Guarnieri // *Biotechnology Advances* – 2018. – T. 36 – № 4 – C. 1274-1292.
192. Lenka, S.K. Current advances in molecular, biochemical, and computational modeling analysis of microalgal triacylglycerol biosynthesis / S.K. Lenka, N. Carbonaro, R. Park, S.M. Miller, I. Thorpe, Y. Li // *Biotechnology Advances* – 2016. – T. 34 – C. 1046-1063.
193. Klok, A. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae / A. Klok, D. Martens, R. Wijffels, P. Lamers // *Bioresource Technology* – 2013. – T. 134 – C. 233-243.
194. Fang, S.-C. Metabolic engineering and molecular biotechnology of microalgae for fuel production / S.-C. Fang // *Biomass, Biofuels and Biochemicals Biofuels from Algae* – 2019. – C. 89-100.
195. Collyer, D. Studies on fat accumulation by algae / D. Collyer, G. Fogg // *Journal of Experimental Botany* – 1955. – T. 6 – № 2 – C. 256-275.
196. Fernández-Reiriz, M. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae / M. Fernández-Reiriz, A. Perez-Camacho, M. Ferreiro, J. Blanco, M. Planas, M. Campos and U. Labarta // *Aquaculture* – 1989. – T. 83 – № 1-2 – C. 17-37.
197. Dejoye, C. Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant: дисс. ... PhD: Chimie / Céline Dejoye – Avignon, 2013. – 176 с.
198. Lv, J.-M. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions / J.-M. Lv, L.-H. Cheng, X.-H. Xu, L. Zhang, H.-L. Chen // *Bioresource Technology* – 2010. – T. 101 – № 17 – C. 6797-6804.
199. Panyakampol, J. Different effects of the combined stress of Nitrogen depletion and high temperature than an individual stress on the synthesis of biochemical compounds in *Arthrospira platensis* C1 (PCC 9438) / J. Panyakampol, S. Cheevadhanarak, J. Senachak, S. Dulsawat, W. Siangdung, M. Tanticharoen, K.

Paithoonrangarid // Journal of applied phycology – 2016. – T. 28 – № 4 – C. 2177-2186.

200. Ördög, V. Effect of temperature and Nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition in three *Chlorella* strains / V. Ördög, W. Stirk, P. Bálint, A. Aremu, A. Okem, C. Lovász, Z. Molnár, J. van Staden // Algal Research – 2016. – T. 16 – C. 141-149.

201. Ho, S-H. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production / S-H. Ho, W-M. Chen, J-S. Chang // Bioresource Technology – 2010. – T. 101 – № 22 – C. 8725-8730.

202. Sun, X. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process / X. Sun, Y. Cao, H. Xu, Y. Liu, J. Sun, D. Qiao, Y. Cao // Bioresource Technology – 2014. – T. 155– C. 204-212.

203. Gifuni, I. Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery / I. Gifuni, A. Pollio, C. Safi, A. Marzocchella, G. Olivieri // Trends in Biotechnology – 2019. – T. 37 – № 3 – C. 242-252.

204. Kumar, D. A. Responses in Growth and Lipid Productivity of *Chlorella vulgaris* to Different Nitrogen Sources / D. A. Kumar, T. Gopal, K. Harinath, G. Sibi // SOJ Microbiology and Infectious Diseases – 2017. – T. 5 – № 2 – C. 1-6.

205. Feng, T-Y. Examination of metabolic responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* / T-Y. Feng, Z.-K. Yang, J-W. Zheng, Y. Xie, D-W. Li, S. Murugan, W-D. Yang, J-S. Liu, H-Y. Li // Scientific Reports – 2015. – T.5– C. 10373.

206. Paytan, A. The oceanic Phosphorus cycle / A. Paytan, K. McLaughlin // Chemical Reviews – 2007. – T. 107 – № 2 – C. 563-576.

207. Xie, M. Optimization of *Chlorella sorokiniana* cultivation condition for simultaneous enhanced biomass and lipid production via CO₂ fixation / M. Xie, Y. Qiu, C. Song, Y. Qi, Y. Li, Y. Kitamura // Bioresource Technology Reports – 2018. – T. 2 – C. 15-20.

208. Ratledge, C. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms / C. Ratledge, J. Wynn // *Advances in Applied Microbiology* – 2007. – T. 51– C. 1-52.

209. Solovchenko, A. Phosphorus starvation and luxury uptake in green microalgae revisited / A. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg, I. Selyakh, L. Semenova, T. Ismagulova, A. Lukyanov, I. Mamedov, E. Vinogradova, O. Karpova, I. Konyukhov, S. Vasilieva, P. Mojzes, C. Dijkema, M. Vecherskaya, I. Zvyagin, L. Nedbal, O. Gorelova // *Algal Research* – 2019. – T. 43 – C. 101651.

210. Roopnarain, A. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production / A. Roopnarain, V. Gray, S. Sym // *Bioresource Technology* – 2014. – T. 156 – C. 408-411.

211. Salama, E-S. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress / E-S. Salama, H-C. Kim, R. Abou-Shanab, M-K. Ji, Y-K. Oh, S-H. Kim, B-H. Jeon // *Bioprocess and Biosystems Engineering* – 2013. – T. 36 – № 6 – C. 827-833.

212. Minhas, A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids / A. Minhas, P. Hodgson, C. Barrow and A. Adholeya // *Frontiers in Biology* – 2016. – T. 7 – C. 546.

213. Hu, H. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis sp.*, with enriched carbon sources / H. Hu, K. Gao // *Biotechnology Letters* – 2013. – T. 25 – № 5 – C. 421-425.

214. Dou, X. The effects of trace elements on the lipid productivity and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* / X. Dou, X.-H. Lu, M.-Z. Lu, L.-S. Yu, R. Xue and J. Ji // *Renewable Energy* – 2013. – 671545.

215. Miazek, K. Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review / K. Miazek,

W. Iwanek, C. Remacle, A. Richel, D. Goffin // International Journal of Molecular Science – 2015. – T. 16 – № 10 – C. 23929-23969.

216. Goecke, F. Use of lanthanides to alleviate the effects of metal ion-deficiency in *Desmodesmus quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta) / F. Goecke, C.G. Jerez, V. Zachleder, F.L. Figueroa, T. Rezanka, K. Bisova, M. Vitova // Frontiers in Microbiology – 2015. – T. 6 – № 2 – doi: 10.3389/fmicb.2015.00002.

217. Sun, J. Microstructures and functional groups of *Nannochloropsis* sp. cells with arsenic adsorption and lipid accumulation / J. Sun, J. Cheng, Z. Yang, K. Li, J. Zhou, K. Cen // Bioresource Technology – 2015. – T. 194 – № 10 – C. 305-311.

218. Padrova, K. Trace concentrations of iron nanoparticles cause overproduction of biomass and lipids during cultivation of cyanobacteria and microalgae / K. Padrova, J. Lukavsky, L. Nedbalova, A. Cejkova, T. Cajthaml, K. Sigler, M. Vitova, T. Rezanka // Journal of Applied Phycology – 2015. – T. 27 – C. 1443-1451.

219. Pilon, L. Radiation transfer in photobiological carbon dioxide fixation and fuel production by microalgae / L. Pilon, H. Berberoğlu, R. Kandilian // Journal of quantitative spectroscopy and radiative transfer – 2011. – T. 112 – C. 2639-2660.

220. Khoeyi, Z. A. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris* / Z. A. Khoeyi, J. Seyfabadi, Z. Ramezanpour // Aquaculture International – 2012. – T. 20 – № 1 – C. 41-49.

221. Chen, C-L. Dewatering and Drying Methods for Microalgae / C-L. Chen, J-S. Chang, D-J. Lee // Drying Technology – 2015. – T. 33 – № 4 – C. 443-454.

222. Uduman, N. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels / N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquaha, G. M. Forde, A. Hoadley // Journal of Renewable and Sustainable Energy – 2010. – T. 2 – 012701.

223. Patel, A. An Overview of Current Pretreatment Methods Used to Improve Lipid Extraction from Oleaginous Microorganisms / A. Patel, F. Mikes, L. Matsakas // *Molecules* – 2018. – T. 23 – № 7 – 562.

224. White, D. Best Practices for the Pilot-Scale Cultivation of Microalgae, Public Output report of the EnAlgae project / D. White, A. Silkina, S. Skill, D. Oatley-Radcliffe, S. Van Den Hende, A. Ernst, C. De Viser, W. Van Dijk, M. Davey, J. Day // *EnAlga*, Swansea (UK) – 2015. – 34 c.

225. Gerardo, M. L. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants / M. L. Gerardo, S. Van Den Hende, H. Vervaeren, T. Coward, S.C. Skill // *Algal Research* – 2015. – T. 11– C. 248-262.

226. Mujumdar, A.S. Drying technology: trends and applications in post-716 harvest processing / A.S. Mujumdar, C.L. Law // *Food Bioprocessing Technologies* – 2010. – T. 3– C. 843-852.

227. Bagchi, S.K. Development of an oven drying protocol to improve biodiesel production for an indigenous chlorophycean microalga *Scenedesmus* sp. / S.K. Bagchi, P.S. Rao, N. Mallick // *Bioresource Technology* – 2015. – T. 180– C. 207-213.

228. Show, K-Y. Algal biomass dehydration / K-Y. Show, D-J. Lee, J-S. Chang // *Bioresource Technology* – 2013. – T. 135– C. 720-729.

229. Viswanathan, T. Drying characteristics of a microalgae consortium developed for biofuels production / T. Viswanathan, S. Mani, K.C. Das, S. Chinnasamy, A. Bhatnagar // *Transactions of ASABE* – 2011. – T. 54– C. 1-8.

230. Weschler, M.K. Process energy comparison for the production and harvesting of algal biomass as a biofuel feedstock / M.K. Weschler, W.J. Barr, W.F. Harper, A.E. Landis // *Bioresource Technology* – 2014. – T. 153– C. 108-115.

231. Patil, V. Towards sustainable production of biofuels from microalgae / V. Patil, K-Q. Tran, H.R. Giselrãd // *International Journal of Molecular Sciences* – 2008. – T. 9 – № 7 – C. 1188-1195.

232. Agbede, O.O. Thin layer drying of green microalgae (*Chlorella* sp.) paste biomass: Drying characteristics, energy requirement and mathematical modeling / O.O. Agbede, E.O. Oke, S.I. Akinfenwa, K.T. Wahab, S. Ogundipe, O.A. Aworanti, A.O. Arinkoola, S.E. Agarry, O.O. Ogunleye, F. Nihinlola Osulale, K.A. Babatunde // *Bioresource Technology Reports* – 2020. – T. 11–100467.

233. Kim, B.K. Application of Dairy Food Processing Technology Supplemented with Enriched-nutrients for the Elderly: II. The Applicable Technology of Carefoods for the Elderly / B.K. Kim, H.W. Jang, G.H. Choi, Y-I. Moon, S. Oh, D.J. Park // *Journal of Milk Science and Biotechnology* – 2019. – T. 37 – № 4 – C. 213-222.

234. Erbay, Z. A Review of Thin Layer Drying of Foods: Theory, Modeling, and Experimental Results / Z. Erbay, F. Icier // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* – 2010. – T. 50 – № 5 – C. 441-464.

235. Diamente, L.M. Mathematical Modelling of The Thin Layer Solar Drying of Sweet Potato Slices / L.M. Diamente, P.A. Munro // *Solar Energy* – 1993. – T. 51 – № 4 – C. 271-276.

236. Shelef, G. Technical report: Microalgae Harvesting and Processing : A Literature Review / G. Shelef, A. Sukenik, M. Green // U.S. Department of Energy Office of Scientific and Technical Information – 1984. – 65 c.

237. Hosseinizand, H. Economic analysis of drying microalgae *Chlorella* in a conveyor belt dryer with recycled heat from a power plant / H. Hosseinizand, C.J. Lim, E. Webb, S. Sokhansanj // *Applied Thermal Engineering* – 2017. – T. 124 – C. 525-532.

238. Stramarkou, M. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris* / M. S. Stramarkou, Papadaki, K. Kyriakopoulou, M. Krokida // *Journal of Applied Phycology* – 2017. – T. 29 – C. 2947-2960.

239. Ryckebosch, E. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the Microalga *Phaeodactylum tricornutum* / E. Ryckebosch, K.

Muylaert, M. Eeckhout, T. Ruysen, I. Foubert // Journal of Agricultural and Food Chemistry – 2011. – Т. 59 – С. 11063-11069.

240. Günerken, E. Cell disruption for microalgae biorefineries / E. Günerken, E. D'Hondt, M.H.M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, R.H. Wijffels// Biotechnology Advances – 2015. – Т. 33 – С. 243-260.

241. 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. – Т. 244 – С. 1317-1328.

242. Bead milling for the extraction of microalgal proteins [Электронный ресурс] / Pro Future – Электрон. дан. – EUFIC, 2020. – Режим доступа: <https://www.pro-future.eu/news/bead-milling-for-the-extraction-of-microalgal-proteins> [Дата обращения: 22 сентября 2020].

243. Agerkvist, I. Characterization of E. coli cell disintegrates from a bead mill and high pressure homogenizers / I. Agerkvist, S.O. Enfors // Biotechnology and Bioengineering – 1990. – Т. 36 – № 11 – С. 1083-1089.

244. Chisti, Y. Disruption of microbial cells for intracellular products / Y. Chisti, M. Moo-Young // Enzyme Microbiological Technology – 1989. – Т. 8 – С. 194-204.

245. Lee, S. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii* / S. Lee, B.D. Yoon, H.M. Oh // Biotechnology Techniques – 1998. – Т. 12 – С. 553-556.

246. Lee J.Y. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae / J.Y. Lee, C. Yoo, S.Y. Jun, C.Y. Ahn, H.M. Oh // Bioresource Technology – 2010. – Т. 101 – С. 75-77.

247. Middelberg, A.P.J. Process scale disruption of microorganisms / A.P.J. Middelberg // Biotechnological Advances – 1995. – Т. 13 – № 3 – С. 491-551.

248. Mutanda, T. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production / T. Mutanda, D. Ramesh, S. Karthikeyan, S. Kumari, A. Anandraj, F. Bux // Bioresource Technology – 2011. – Т. 102 – С. 57-70.

249. Vogels, G. Combination of enzymatic and/or thermal pretreatment with mechanical cell disintegration / G. Vogels, M.R. Kula // *Chemical Engineering Science* – 1992. – Т. 47 – С. 123-131.

250. Капооре R.V. Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery / R.V. Капооре, Т.О. Butler, J. Pandhal, S. Vaidyanathan // *Open Access Biology* – 2018. – Т. 7 – № 1 – 18.

251. Экстракция твердых и жидких веществ [Электронный ресурс] / Библиотека специальной литературы – Электрон. дан. – Россия, 2020. – Режим доступа: Спеc-Книга.ru [Дата обращения: 22 сентября 2020].

252. Dong, T. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review / T. Dong, E.P. Knoshaug, P.T. Pienkos, L.M.L. Laurens // *Applied Energy* – 2016. – Т. 177 – С. 879-895.

253. Aboul-Enein, H.Y. Separation Techniques in Clinical Chemistry (1st Edition) / H.Y. Aboul-Enein // CRC Press, Boca Raton – 2003. – 552с.

254. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane-Stanley // *Journal of Biological Chemistry* – 1957. – Т. 226 – № 1 – С. 497-509.

255. Yang, F. A Novel Lipid Extraction Method from Wet Microalga *Picochlorum* sp at Room Temperature / F. Yang, W. Xiang, X. Sun // *Marine Drugs* – 2014. – Т. 12 – № 3 – P. 1258 – 1270.

256. Bligh, E.G. A rapid method of total lipid extraction and purification / E.G. Bligh, Dyer, W.J. // *Can J Biochem Physiology* – 1959. – Т. 37 – № 8 – P. 911-917.

257. Theegala, C.S. Algal Cell Disruption and Lipid Extraction: A Review on Current Technologies and Limitations / C.S. Theegala // *Algal Biorefineries* – 2015. –P. 419-441.

258. Vostrikovan, N.L. Methodological aspects of lipid extraction from biological matrices / N.L. Vostrikova, O.A. Kuznetsova, A.V. Kulikovskii // *Theory and practice of meat processing* – 2018. – Т. 3 – № 2 – С. 4-21.

259. O'Brien, R. Fats and oils. Production, composition and properties, application / R. O'Brien // Profession, St. Petersburg – 2007. – 752 с.

260. Ronald, E. Majors, Modern Technique for the Extraction of Solid Materials - An Update / E. Ronald // LCGC North America – 2006. – Т. 24 – № 7 – С. 648-660.

261. Jensen, W.B. The Origin of the Soxhlet Extractor / W. B. Jensen // Journal of chemical education – 2007. – Т. 84 – № 12 – С. 1913.

262. Balampanis, D.E. An assessment of different extraction and quantification methods of penta- and hexa-chlorobenzene from SRF fly-ash / D.E. Balampanis, F. Coulon, N. Simms, P. Longhurst, S.J.T. Pollard, C. Fenech, R. Villa // Analytical Chemistry Research – 2017. – Т. 12 – С. 28-33.

263. Papachristou, I. Analysis of the lipid extraction performance in a cascade process for Scenedesmus almeriensis biorefinery / I. Papachristou, S. Akaberi, A. Silve, E. Navarro-López, R. Wüstner, K. Leber, N. Nazarova, G. Müller, W. Frey // Biotechnology for biofuels – 2021. – Т. 14 – № 20 – doi: 10.1186/s13068-020-01870-1

264. Randall, E.L. Improved method for fat and oil analysis by a new process of extraction / E.L. Randall // Journal - Association of Official Analytical Chemists – 1974. – Т. 57 – С. 1165-1168.

265. Behr-Labor behrotest ® Randall Extraction, 4 positions [Электронный ресурс] / TMS passion in science – Электрон. дан. – Malaysia, 2019. – Режим доступа: tms-lab.com [Дата обращения: 22 июль 2021].

266. Aizpurua-Olaizola, O. Optimization of Supercritical Fluid Consecutive Extractions of Fatty Acids and Polyphenols from Vitis Vinifera Grape Wastes / O. Aizpurua-Olaizola, M. Ormazabal, A. Vallejo, M. Olivares, P. Navarro, N. Etxebarria, A. Usobiaga // Journal of Food Science – 2015. – Т. 80 – № 1 – С. 101-107.

267. Skoog, D.A. Principles of Instrumental Analysis / D.A. Skoog, F.J. Holler; T.A. Nieman // Saunders College Pub., Philadelphia – 1998. – 863с.

268. Применение CO₂ как хладагента: [Электронный ресурс]/ Анером–Электрон. дан. – Беларусь, 2018 – Режим доступа: <http://anerom.by> [Дата обращения: 03 февраль 2018].
269. Mandal, S.C. Classification of Extraction Methods / S.C. Mandal, V. Mandalm A.K. Das // Academic Press, US –2015. – 220с.
270. Otlés, S. Methods of Analysis of Food Components and Additives, Second Edition / S. Otlés // CRC Press, US –2016. – 534с.
271. Amidzhin, B. Densitometric identification of triglycerides separated by reversed-phase thin-layer chromatography / B. Amidzhin, B. Nikolova-Damyanova // Journal of Chromatography A – 1988. – Т. 446 –С. 259-266.
272. Moreau, R.A. The quantitative analysis of lipids via HPLC with a charged aerosol detector / R.A. Moreau // Lipids – 2006. – Т. 41 –С. 727-734.
273. Kuksis, A. Quantitation of plasma lipids by gas liquid chromatography on high temperature polarizable capillary columns / A. Kuksis, J.J. Myher, K. Geher // Journal of Lipid Research – 1993. – Т.34 – № 6 – С. 1029-1038.
274. Zhao, Y-Y. Chapter Six - Lipidomics: New Insight Into Kidney Disease / Y-Y. Zhao, N.D. Vaziri, R-C. Lin //Advances in Clinical Chemistry –2015. – Т.68– С. 153-175.
275. Laurens, L.M.L. Feasibility of Spectroscopic Characterization of Algal Lipids: Chemometric Correlation of NIR and FTIR Spectra with Exogenous Lipids in Algal Biomass / L.M.L. Laurens, E.J. Wolfrum // Bioenergy Research – 2011. – Т.4 – С. 22-35.
276. Huang, G.H., Rapid screening method for lipid production in alga based on Nile red fluorescence / G.H. Huang, G. Chen, F. Chen // Biomass and bioenergy – 2009. – Т.33 – С. 1386-1392.
277. Elsey, D. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids / D. Elsey, D. Jameson, B. Raleigh, J.M. Cooney // Journal of Microbiological Methods – 2007. – Т.68 – С. 639-642.

278. Khoury, S. Quantification of Lipids: Model, Reality, and Compromise / S. Khoury, C. Canlet, M.Z. Lacroix, O. Berdeaux, J. Jouhet, J. Bertrand-Michel // *Biomolecules* – 2018. – T. 8 – № 4 – C. 174 – doi:10.3390/biom8040174.

279. Sokoła-Wysoczanska E. Polyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders—A Review / E. Sokoła-Wysoczanska, T. Wysoczanski, J. Wagner, K. Czyz, R. Bodkowski, S. Lochynski, B. Patkowska-Sokoła // *Nutrients* – 2018. – T. 10 – 1561.

280. Su, K.P. Omega-3 fatty acids for major depressive disorder during pregnancy: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / K.P. Su, S.Y. Huang, T.H. Chiu, K.C. Huang, C.L. Huang, H.C. Chang, C.M. Pariante // *Journal of Clinical Psychiatry* – 2008. – T. 69 – C. 644-651.

281. Smith, G.I. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial / G.I. Smith, P. Atherton, D.N. Reeds, B.S. Mohammed, D. Rankin, M.J. Rennie, B. Mittendorfer // *American Journal of Clinical Nutrition* – 2011. – T. 93 – C. 402-412.

282. Conquer, J.A. Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment / J.A. Conquer, M.C. Tierney, J. Zecevic, W.J. Bettger, R.H. Fisher // *Lipids* – 2000. – T. 35 – C. 1305-1312.

283. Krauss-Etschmann, S. Effects of fishoil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial / S. Krauss-Etschmann, R. Shadid, C. Campoy, E. Hoster, H. Demmelmair, M. Jimenez, A. Gil, M. Rivero, B. Veszpremi, T. Decsi, B.V. Koletzko, Nutrition and Health Lifestyle (NUHEAL) Study Group // *The American Journal of Clinical Nutrition* – 2007. – T. 85 – C. 1392-1400.

284. Dunstan, J.A. The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial / J.A. Dunstan, L.R. Mitoulas, G. Dixon, D.A. Doherty, P.E.

Hartmann, K. Simmer, S.L. Prescott // *Pediatric Research*– 2007. – T. 62 – C. 689-694.

285. Gajos, G. Effects of polyunsaturated omega-3 fatty acids on responsiveness to dual antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the OMEGA-PCI (OMEGA-3 fatty acids after pci to modify responsiveness to dual antiplatelet therapy) study / G. Gajos, P. Rostoff, A. Undas, W. Piwowarska // *Journal of the American College of Cardiology* – 2010. – T. 55 – C. 1671-1678.

286. Byelashov, O.A. Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid / O.A. Byelashov, A.J. Sinclair, G. Kaur // *Lipid Technology* – 2015. – T. 27 – № 4 – C. 79-82.

287. Harris, W.S. Omega-3 fatty acids. In: Coates PM, Betz JM, Blackman MR, et al., eds. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd ed / W.S. Harris // Informa Healthcare: London and New York – 2010. – C. 577-586.

288. Chiu, C.C. The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized doubleblind placebo-controlled study / C.C. Chiu, K.P. Su, T.C. Cheng, H.C. Liu, C.J. Chang, M.E. Dewey, R. Stewart, S.Y. Huang // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* – 2008. – T. 32 – C. 1538-1544.

289. Hussein, N. Long-chain conversion of [¹³C] linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men / N. Hussein, E. Ah-Sing, P. Wilkinson, C. Leach, B.A. Griffin, D.J. Millward // *Journal of Lipid Research* – 2005. – T. 46 – C. 269–280.

290. Gerster, H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3) / H. Gerster // *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* –1998. – T. 27 – № 3 – C. 159-173.

291. Simopoulos, A.P. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications / A.P. Simopoulos // *Oilseeds and fats, Crops and Lipids* –2010. – T. 17 – № 5 – C. 267-275.

292. Swanson, D. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life / D. Swanson, R. Block, S.A. Mousa // *Advances in Nutrition* – 2012. – Т. 3 – С. 1-7.

293. Cuéllar Bermúdez, S.P. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins /S.P. Cuéllar Bermúdez, I. Aguilar-Hernández, D.L. Cardenas-Chavez, N. Ornelas-Soto, M.A. Romero-Ogawa, R. Parra-Saldivar // *Microbial Biotechnology* – 2015. – Т. 8 – № 2 – С. 190-209.

294. Пат. 9023625B2. Соединенные Штаты Америки. Methods for production of algae derived oils / R. Pottathil, L. Jolla, S. Kumar, A. Deshmukh; заявитель и патентообладатель IO-MEGA HOLDING Corp. – № US13/704,193, заявл. 22.03.2012; опубл. 14-06-2010// www.patents.google.com/

295. Guil-Guerrero, J.L. Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids / J.L. Guil-Guerrero, E. Belarbi // *Journal of the American Oil Chemists' Society* – 2001. – Т. 78 – № 2 – С. 477-484.

296. Wanasundara, U. Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: Optimization of reaction conditions / U. Wanasundara, F. Shahidi // *Food Chemistry* – 1999. – Т. 65 – С. 41-49.

297. Guil-Guerrero, J.L. Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum* / J.L. Guil-Guerrero, E. Belarbi, M.M. Reboloso-Fuentes // *Bioseparation* – 2001. – Т. 9 – № 5 – С. 299-306.

298. Mendes, A. DHA Concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation / A. Mendes, T.L. d Silva, A. Reis // *Food Technology and Biotechnology* – 2007. – Т. 45 – № 1 – С. 38-44.

299. Callejón, M.J.J. Simultaneous extraction and fractionation of lipids from the microalga *Nannochloropsis sp.* for the production of EPA-rich polar lipid concentrates / M.J.J. Callejón, A.R. Medina, P.A.G. Moreno, L.E. Cerdán, S.O. Guillén, E.M. Grima // *Journal of Applied Phycology* – 2020. – Т. 32 – С. 1117-1128.

300. Nadeem, M. Sorption of cadmium from aqueous solution by surfactant-modified carbon adsorbents / M. Nadeem, M. Shabbir, M.A. Abdullah // *Chemical Engineering Journal* – 2009. – Т. 148 – С. 365–370.

301. Shofiyani, A. Cadmium adsorption on chitosan/*Chlorella* biomass sorbent prepared by ionic-imprinting technique / A. Shofiyani, N. Narsito, S.J. Santosa, S. Noegrohati, T.A. Zahara, E. Sayekti, // *Indonesian Journal of Chemistry* – 2015. – Т. 15 – № 2 – С. 163–171.

302. Cilantro and *Chlorella* can Remove 80% of Heavy Metals from the Body within 42 Days [Электронный ресурс] / Natural society – Электрон. дан. – New York, 2019. – Режим доступа: <https://naturalsociety.com/proper-heavy-metal-chelation-cilantro-chlorella/> [Дата обращения: 17 сентября 2019].

303. Хлорелла: детокс и здоровье печени [Электронный ресурс] / My india – Электрон. дан. – Россия, 2019. – Режим доступа: <https://myindia.ru/> [Дата обращения: 17 сентября 2019].

304. Spolaorea, P. Commercial applications of microalgae / P. Spolaorea, C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert // *Journal of Bioscience and Bioengineering* – 2006. – Т. 101 – № 2 – С. 87-96.

305. Reyna-Martinez, R. Antitumor activity of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus sp.* microalgae native of Nuevo León State, México / R. Reyna-Martinez, R. Gomez-Flores, U. López-Chuken, R. Quintanilla-Licea, D. Caballero-Hernandez, C. Rodríguez-Padilla, J. Cesar Beltrán-Rocha, P. Tamez-Guerra // *Peer Journal* – 2018. – Т. 6 – e4358– doi: 10.7717/peerj.4358.

306. Lin, P-Y. *Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo / P-Y. Lin, C-T. Tsai, W-L. Chuang, Y-H. Chao, I-H. Pan, Y-K. Chen, C-C. Lin, B-Y. Wang // *BMC Complementary and Alternative Medicine* – 2017. – Т. 17 – 88.

307. Javanbakht, V. Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent / V. Javanbakht, S.A. Alavi, H. Zilouei // *Water Science and Technology* – 2014. – Т. 69 – № 9 – С. 1775-1787.

308. Juneja, A. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review / A. Juneja, R.M. Ceballos, G.S. Murthy // *Energies* – 2013. – T. 6 – C. 4607-4638.

309. Kommareddy, A. Study of light requirements of a photobioreactor, North Central ASAE/CSAE Conference Presentation MB04-111 / A. Kommareddy, G. Anderson // Winnipeg, USA – 2004.

310. Figueroa, F.L. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta) / F.L. Figueroa, J. Aguilera, F.X. Niell // *European Journal Phycology* – 1995. – T. 30 – C. 11-18.

311. Asuthkar, M. Effect of different wavelengths of light on the growth of *Chlorella pyrenoidosa* / M. Asuthkar, Y. Gunti, R. Rao S, C. S. Rao, R. Yadavalli // *International journal of pharmaceutical sciences and research* – 2016. – T. 48 – C. 847-851.

312. Wilke, A. Selective biosorption of heavy metals by algae, *Environmental Biotechnology* / A. Wilke, R. Buchholz, G. Bunke // *Environmental Biotechnology* – 2006. – T. 2 – № 2 – C. 47-56.

313. Mehta, S.K. Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris* / S.K. Mehta, J. P. Gaur // *Ecology Engineering* – 2001. – T. 8 – № 1 – C. 1-13.

314. F.A. Abu Al-Rub, Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions / F.A. Abu Al-Rub, M.H. El-Naas, I. Ashour, M. Al-Marzouqi // *Process Biochemistry* – 2005. – T. 41 – C. 457-464.

315. Konig-Peter, A. Biosorption characteristics of *Spirulina* and *Chlorella* cells to accumulate heavy metals / A. Konig-Peter, F. Kilar, A. Felinger, T. Pernyeszi // *Journal of the Serbian Chemical Society* – 2015. – T. 80 – № 3 – C. 407-419.

316. Hannon, M. Biofuels from algae: Challenges and potential / M. Hannon, J. Gimpel, M. Tran, B. Rasala, S. Mayfield // Biofuels – 2010. – T. 1. – №5. – C. 763-784.

317. Gifuni, I. Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery / I. Gifuni, A. Pollio, C. Safi, A. Marzocchella, G. Olivieri // Trends in Biotechnology – 2019. – T. 37. – №3. – C. 242-252.

318. Klok, A. J. Edible oils from microalgae: Insights in TAG accumulation / A. J. Klok, P. P. Lamers, D. E. Martens, R. B. Draaisma, R. H. Wijffels // Trends in Biotechnoloy – 2014. – T. 32. – №10. – C. 521-528.

319. Richmond, A. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition / A. Richmond, Q. Hu // John Wiley & Sons, Ltd. – 2013. – 719 c.

320. Uduman, N. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels / N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquaha, G. M. Forde, A. Hoadley // Journal of Renewable and Sustainable Energy – 2010. – T. 2. – 012701 – doi: 10.1063/1.3294480.

321. Ghernaout, D. Electrocoagulation process for microalgal biotechnology-A review / D. Ghernaout // Applied Engineering – 2019. – T. 3. – №2. – C. 85-94.

322. Cuellar-Bermudez, S. P. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins / S. P. Cuellar-Bermudez, I. Aguilar-Hernandez, D. L. Cardenas-Chavez, N. Ornelas-Soto, M. A. Romero-Ogawa, R. Parra-Saldivar // Microbial Biotechnology – 2015. – T. 8. – №2. – C. 190-209.

323. Kempkes, M. A. Pulsed electric field (PEF) method for continuous enhanced extraction of oil and lipids from small aquatic plants / M. A. Kempkes, I. Roth, M. P. J. Gaudreau // Patent, United State – 2011.

324. Solana, M. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*,

Chlorella protothecoides and *Nannochloropsis salina* / M. Solana, C. S. Rizza, A. Bertucco // Journal of Supercritical Fluids – 2014. – Т. 92. – С. 311-318.

325. SAG Medium recipe [Электронный ресурс] / Natural society – Электрон. дан. – New York, 2019. – Режим доступа: http://sagdb.uni-goettingen.de/culture_media/01%20Basal%20Medium.pdf/ [Дата обращения: 25 марта 2020].

326. Gordeev, A. A. Methods for screening live cells /A. A. Gordeev, A. B. Chetverin // Biochemistry – 2018. – Т. 83. – №1. – С. 81-102.

327. Работа с камерой Горяева [Электронный ресурс] / Тесты и задачи по клинической лабораторной диагностике – Электрон. дан. – Иркутск, 2020. – Режим доступа: <http://cldtest.ru/hdbk/chamber> [Дата обращения: 28 марта 2020].

328. Прунтова, О.В. Лабораторный практикум по общей микробиологии [Электронный ресурс] / О.В. Прунтова, О.Н. Сахно // Единое окно доступа к образовательным ресурсам – Электрон. дан. – ФГАУ ГНИИ ИТТ "Информика, 2005-2010. – Режим доступа: http://window.edu.ru/catalog/pdf2txt/341/77341/58433?p_page=5 [Дата обращения: 28 марта 2020].

329. Germer, T.A. Spectrophotometry: Accurate Measurement of Optical Properties of Materials (Experimental Methods in the Physical Sciences)/ T.A. Germer, J.C. Zwinkels, B. K. Tsai // Elsevier– 2014. – Т 46. – 533 с.

330. The difference between Optical Density, Absorbance and Extinction of gold nanoparticles [Электронный ресурс] / – Электрон. дан. – NanoHybrids, 2020. – Режим доступа: <https://nanohybrids.net/pages/differences-between-optical-density-absorbance-and-extinction-of-gold-nanoparticles>.

331. Griffiths, M.J. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density/ M.J. Griffiths, C. Garcin, R.P. van Hille, S.T.L. Harrison// Journal of Microbiological Methods. 2011. – Т. 85. – №2. – С. 119-123.

332. Barros, A. I. Harvesting techniques applied to microalgae: A review /A. I. Barros, A. L. Gonçalves, M. Simões, J.C.M. Pires// Renewable and Sustainable Energy Reviews –2015. – T. 41.– C. 1489–1500.

333. Politaeva, N. Concentration of *Chlorella sorokiniana* microalga biomass at combined usage of coagulants and flocculants/ N. Politaeva, Y. Smyatskaya, A. Toumi, A. Oparina //Eurasian Chemico-Technological Journal – 2018. – T.20.– C. 243–247,

334. Pahl, S. L. Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass / S. L. Pahl, A. K. Lee, T. Kalaitzidis, P. J. Ashman, S. Sathe, D. M. Lewis // Algae for Biofuels and Energy. Developments in Applied Phycology. Germany – 2013. – T. 5.– C.165–185.

335. Uduman, N. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels / N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquah, G. M. Forde, A. Hoadley // Journal of Renewable and Sustainable Energy –2010. – T.2.– №1. – 012701.

336. Desmorieux, H.; Hernandez, F. Biochemical and physical criteria of *Spirulina* after different drying processes. In Proceedings of the 14th International Drying Symposium (IDS), São Paulo City, Brazil, August 22–25, 2004, B, 900–907.

337. Yerima, I. A. Effects of Sun and Oven Drying Techniques on Quality of Oil Produced from *Chlorella vulgaris* (Microalgae) Biomass / I. A.Yerima, J. Appah, H. Danlami, M. B. Yerima, F. L. Canada// Biotechnology Journal International –2018. – T.22. – №1. – C. 1–11.

338. Günerken, E. Cell disruption for microalgae biorefineries / E. Günerken, E. D’Hondt, M. H. M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, R. H. Wijffels //Biotechnology advances –2015. – T.33.– №2. – C. 243–260.

339. Rowan, K.S. Photosynthetic pigments of algae / K. S. Rowan // Cambridge University Press– 1989. – 334 c.

340. Kaite, V.S. Breaking green algae *Chlorella* sp. cells by applying mechanical techniques/ V.S. Kaite, V. Makareviciene, J. Karosiene // Proceedings of The IIER International Conference, Crete, Greece – 2017. – C. 2–5.

341. Lam, G. P. Harvesting and cell disruption of microalgae : дисс. ... канд: Gerard Pieter 't Lam – 2017. – 206 с.
342. ЦеллоЛюкс-А [Электронный ресурс]/ Компания Fermenti.ru – Электрон. дан. – Бердск, 2020. – Режим доступа: <https://fermenti.ru/fermenti/celloljuks-a-2000> [Дата обращения: 13 апреля 2020].
343. Протосубтилин ГЗх (А- 120 ед./г) [Электронный ресурс] / Компания Fermenti.ru – Электрон. дан. – Бердск, 2020. – Режим доступа: <https://fermenti.ru/fermenti/protosubtilin> [Дата обращения: 13 апреля 2020].
344. Темнов, М. С. Кинетика и аппаратурнотехнологическое оформление процессов получения эфиров жирных кислот: дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.06/ Темнов Михаил Сергеевич – М., 2017. – 223 с.
345. Технологическая инструкция по использованию ферментных препаратов. ООО ПО «СИББИОФАРМ»/ Москва, 2005. – 17 с.
346. Stanbury, P. F. Principles of Fermentation Technology / P. F. Stanbury, A. Whitaker, S. J. Hall // Elsevier – 2016. – 824 с.
347. Major, R. E. Modern Technique for the Extraction of Solid Materials - An Update / R. E Major // LCGC North America Journal – 2006. – Т.24.– №7. – С. 648–660.
348. Randall, E.L. Improved Method for Fat and Oil Analysis by a New Process of Extraction / E. L. Randall // Journal of AOAC International – 1974. – Т.57.– №5. – С.1165-1198.
349. Skoog, D. A. Principles of Instrumental Analysis / D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch // 6th edition Thomson Brooks. Cole, USA – 2007. – 1039 с.
350. Ratnayake, MM.N. Preparation of Omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea complexation / MM.N. Ratnayake, B. Olsson, D. Matthews, R. G. Ackman // Fat Science and Technology – 1988. – Т.90.– №10. – С. 381-386.
351. de Rezende D.B., Re-esterification of Macauba acid oil using glycerol for acidity reduction and biodiesel production / D.B. de Rezende, M.P. de O. Rocha, V.M.D. Pasa // Brazilian Journal of Chemical Engineering – 2019. – Т.36.– № 3. – С. 1195-1204.

352. Харланов, А. Н. Инфракрасная спектроскопия для исследования адсорбционных, кислотных и основных свойств поверхности гетерогенных катализаторов, Метод. Пособ. / А. Н. Харланов, М. И. Шилина // М. – 2011. – 110 с.

353. Ионномер лабораторный И-160МИ –Руководство по эксплуатации и методика поверки, ГРБА2.840.009 РЭ – 80 с.

354. ПНД Ф 14.1:2:4.222-06 Методика выполнения измерений массовых концентраций цинка, кадмия, свинца и меди методом инверсионной вольтамперометрии на анализаторах типа ТА. – Т., 2004. – 25 с.

355. Bansod, B. A review on various electrochemical techniques for heavy metal ions detection with different sensing platforms / B. Bansod, T. Kumar, R. Thakur, S. Rana, I. Singh // Biosensors and Bioelectronics – 2017. – Т.94.– С. 443–455.

356. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04, Т 16.1:2:2:3:3.7-04 Токсикологические методы контроля. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris Beijer*) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления – М., 2014. – 30 с.

357. Suparmaniam, U. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review / U. Suparmaniam, M. K. Lam, Y. Uemura, J. W. Lim, K. T. Lee, S. H. Shuit // Renewable and Sustainable Energy Reviews – 2019. – Т. 115 – 109361 – ISSN 1364-0321.

358. Владимирова, М.Г. Массовое культивирование микроскопических водорослей /М. Г. Владимирова, В. Е. Семененко. – Режим доступа: <http://volimo.ru/books/item/f00/s00/z0000006/st145.shtml> [Дата обращения: 13 апреля 2020].

359. Azad, K. Advances in Eco-fuels for Sustainable Environment / K. Azad // Woodhead Publishing – 2019. –517 с.

360. Scherholz, M. L. Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media / M. L. Scherholz, W. R. Curtis // BMC Biotechnology – 2013. – Т. 13 – № 39 – doi:10.1186/1472-6750-13-39.

361. Lavens, P. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture / P. Lavens, P. Sorgeloos // FAO Fisheries Technical Paper. No. 361, Rome – 1995. –295 с.

362. Esbroeck, E. v. Temperature control of microalgae cultivation under variable conditions: дисс. ... маг.: Biobased Chemistry and Technology/ Elianne van Esbroeck – 2018. – 53 с.

363. Yamakawa, H. Dissipation of Excess Excitation Energy by Drought-Induced Nonphotochemical Quenching in Two Species of Drought-Tolerant Moss: Desiccation-Induced Acceleration of Photosystem II Fluorescence Decay / H. Yamakawa, C. N. Shigeru Itoh // Biochemistry. – 2013. – Т. 52 – №. 167. – P. 14451–4459.

364. Kumar, K. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass / K. Kumar, C. N. Dasgupta, D. Das // Bioresource Technology - 2014. - Т. 167. - С. 358–366.

365. Pattanaik, A. Effect of LED Lights on the Growth of Microalgae / A. Pattanaik, L. B. Sukla, D. Pradhan// Inglomayor – 2018. – Т. 14 – С. 14-24.

366. Loftus, S. E. Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production / S. E. Loftus, Z. I. Johnson // Algal Research – 2017. – Т. 24 – С. 154-166.

367. Fernández, C. G. Microalgae autoflocculation: an alternative to high-energy consuming harvesting methods / C. G. Fernández, M. Ballesteros // Journal of Applied Phycology – 2013. – Т. 25 – С. 991-999.

368. Wells, M.L. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding / M.L.Wells, P. Potin, J.S. Craigie, J. A. Raven, S. S. Merchant, K. E. Helliwell, A. G. Smith, M. E. Camire, S. H. Brawley //Journal of applied phycology – 2017. – Т. 29 – №. 2. – С. 949-982.

369. Zhang, Q. Variation of fatty acid desaturation in response to different nitrate levels in *Auxenochlorella pyrenoidosa* / Q. Zhang, Z. You, X. Miao // Royal Society – 2018. – Т. 5 – №. 11. – doi : 10.1098/rsos.181236.

370. Hempel, N. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production / N. Hempel, I. Petrick, F. Behrendt // Journal of Applied Phycology – 2012. – Т. 24 – С. 1407-1418.

371. Dhaka, V. Trans fats—sources, health risks and alternative approach - A review / V. Dhaka, N. Gulia, K. S. Ahlawat, B. S. Khatka // Journal of Food Science and Technology – 2011. – Т. 48 – №. 5. – С. 534-541.

372. Williams, C. Improving the Fat Content of Foods / C. Williams, J. Buttriss // Woodhead Publishing– 2006. – 560 с.

373. Transparent plastic tube for algae cultivation [Электронный ресурс] / Transparent plastic tube for algae cultivation – Электрон. дан. – China, 2018. – Режим доступа: <https://russian.alibaba.com/product-detail/transparent-pc-plastic-tube-for-algae-cultivation> [Дата обращения: 30 сентябрь 2018].

374. Multifunctional lemongrass oil extraction plant [Электронный ресурс] / Multifunctional lemongrass oil extraction plant – Электрон. дан. – China, 2018. – Режим доступа: <https://russian.alibaba.com/product-detail/Multi-functional-lemongrass-oilextraction-plant> [Дата обращения: 30 сентябрь 2018].

375. Mahesar, S.A. Analytical approaches for the assessment of free fatty acids in oils and fats / S.A. Mahesar, S.T.H. Sherazi, A.R. Khaskheli, A.A. Kandhro, Sirajuddin // Analytical methods – 2014. – Т. 6 – №. 14. – С. 4956-4963.

376. Alimentarius C. Codex standards for fats and oils from vegetable sources. ALIMENTARIUM, C. 1999.