

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ КЛЕТОК  
*CHLORELLA SOROKINIANA*, ПОВЫШАЮЩИХ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКЦИИ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ**

**М.С. Темнов, Я.В. Устинская, М.А. Еськова, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий**

Михаил Сергеевич Темнов \*, Яна Витальевна Устинская, Мария Александровна Еськова,  
Кирилл Иванович Меронюк, Дмитрий Станиславович Дворецкий

Технологический институт, Тамбовский государственный технический университет, ул. Советская, 106,  
Тамбов, Российская Федерация, 392000

E-mail: temnov.mihail@mail.ru\*, ustinskaya.yana@yandex.ru, mashaeskova@yandex.ru, mirych.87@yandex.ru,  
dvoretsky@yahoo.com

*Целью исследования был сравнительный анализ методов дезинтеграции (использование фермента лизоцима, сверхвысококачастотного излучения и ультразвука) клеток микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana*), позволяющих извлечь максимальное количество водорастворимого внутриклеточного белка с минимальными затратами. Дезинтеграция клеток микроводорослей позволяет значительно увеличить выход водорастворимого белка до 10,4 раза по сравнению с контролем (биомасса микроводорослей с целыми клетками). Время дезинтеграции также является важным фактором, величина которого прямо пропорционально влияет на затраты материальных и энергетических ресурсов. Наиболее перспективными методами дезинтеграции с точки зрения сокращения времени на обработку являются сверхвысококачастотное излучение и ультразвук. Сверхвысококачастотное излучение в большинстве случаев приводит к значительному сокращению числа крупных клеток из-за возникновения локальных микроскопических перегревов, вскипанию внутриклеточной воды и разрыву клеток, и, соответственно, уменьшению средней площади поверхности клеток микроводорослей. Ультразвук вызывает увеличение средней площади поверхности клеток при энергетических затратах не более 7,5 кДж энергии на 25 мл суспензии, по-видимому, из-за отрыва макромолекул и молекулярных комплексов с внешней поверхности цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Увеличение энергетических затрат более 7,5 кДж энергии на 25 мл суспензии приводит к разрушению крупных клеток микроводорослей и вызывает снижение средней площади поверхности клеток. Использование этих методов позволяет значительно сэкономить время по сравнению с ферментативным методом обработки биомассы. При этом, с учетом величины выхода водорастворимого внутриклеточного белка, более перспективным методом является циклическое воздействие ультразвуком.*

**Ключевые слова:** микроводоросли, клеточная стенка, белки, дезинтеграция, ультразвук, СВЧ-излучение, фермент

**COMPARATIVE ANALYSIS OF DISINTEGRATION METHODS OF *CHLORELLA SOROKINIANA*  
CELLS THAT INCREASE THE EFFICIENCY OF EXTRACTION  
OF INTRACELLULAR WATER-SOLUBLE PROTEINS**

**M.S. Temnov, Ya.V. Ustinskaya, M.A. Eskova, K.I. Meronyuk, D.S. Dvoretzky**

Mikhail S. Temnov \*, Yana V. Ustinskaya, Maria A. Eskova, Kirill I. Meronyuk, Dmitry S. Dvoretzky

Institute of Technology, Tambov State Technical University, Sovetskaya st., 106, Tambov, 392032, Russia

E-mail: temnov.mihail@mail.ru\*, ustinskaya.yana@yandex.ru, mashaeskova@yandex.ru, mirych.87@yandex.ru,  
dvoretsky@yahoo.com

*The aim of this study was a comparative analysis of disintegration methods (the use of enzyme lysozyme, microwave radiation and ultrasound) of microalgae *Chlorella vulgaris* Beijer*

**IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana*) cells, allowing to extract maximum amount of water-soluble intracellular protein with minimal costs. Disintegration of microalgae cells can significantly increase yield of water-soluble protein up to 10.4 times compared to the control (biomass of microalgae with whole cells). Disintegration time is also important factor, the value of which directly proportionally affects cost of material and energy resources. The most promising methods of disintegration in terms of reducing processing time are microwave radiation and ultrasound. Microwave radiation in most cases produces to a significant reduction in number of large cells due to the occurrence of local microscopic overheating, boiling of intracellular water and cell rupture, and, accordingly, a decrease in average surface area microalgae cells. Ultrasound causes an increase in the average cell surface area at an energy consumption of no more than 7.5 kJ of energy per 25 ml of suspension, apparently due to the detachment of macromolecules and molecular complexes from the cytoplasmic membrane and cell wall. An increase in energy consumption of more than 7.5 kJ of energy on 25 ml of suspension produces to destruction of large microalgae cells, and causes a decrease in average surface area of cells. The use of these methods can significantly save time compared to the enzymatic method of processing biomass. At the same time, taking into account the value of yield of water-soluble intracellular protein, a more promising method is cyclic exposure to ultrasound.**

**Key words:** microalgae, cell wall, proteins, disintegration, ultrasound, microwave radiation, enzyme

**Для цитирования:**

Темнов М.С., Устинская Я.В., Еськова М.А., Меронюк К.И., Дворецкий Д.С. Сравнительный анализ методов дезинтеграции клеток *Chlorella sorokiniana*, повышающих эффективность экстракциивнутриклеточных водорастворимых белков. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2022. Т. 65. Вып. 4. С. 79–86

**For citation:**

Temnov M.S., Ustinskaya Ya.V., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Dvoretzky D.S. Comparative analysis of disintegration methods of *Chlorella sorokiniana* cells that increase the efficiency of extraction of intracellular water-soluble proteins. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2022. V. 65. N 4. P. 79–86

## ВВЕДЕНИЕ

Биомасса микроводорослей может являться перспективным источником белка, поиски которого считаются актуальной научной проблемой из-за постоянно растущего глобального спроса на продовольствие и корма для животных. Клетки микроводорослей имеют более высокую эффективность фотосинтеза по сравнению с высшими растениями и более гибкий метаболизм [1-3], а также, в зависимости от штамма, равны или превосходят по аминокислотному составу белка традиционные растительные источники белка [4, 5]. Белки клеток микроводорослей могут составлять до 42-58% сухой биомассы клетки, из которых около 20% входят в состав клеточной стенки, 50% – ферменты, а оставшиеся 30% секретируются во внеклеточную среду [6]. Белки и пептиды, извлеченные из микроводорослей, помимо пищевой ценности, проявляют многочисленные биологические свойства: антиоксидантные, бактериостатические, антигипертензивные, иммуномодулирующие и противовоспалительные [7, 8]. Сложность извлечения белков из клеток микроводорослей заключается в том, что большинство видов микроводорослей обладают жесткими клеточными стенками [9-14], которые

препятствуют экстракции белка. Клеточные стенки микроводорослей могут сильно различаться по строению, но чаще всего содержат следующие полимеры: целлюлоза, гемицеллюлоза (ксилоглюкан, маннан, глюкуроан, (1 → 3)-β-глюкан), хитиноподобный пептидогликан и ульван [11-14]. Это обстоятельство представляет серьезную проблему при применении биомассы микроводорослей в качестве источника пищевых нутриентов, поскольку она не усваивается людьми и нежвачными животными. Для разрушения клеточной стенки необходимо применение эффективных методов дезинтеграции, что делает внутриклеточный белок доступным для пищеварительных ферментов. Поиску путей повышения энергоэффективности процесса извлечения ценных компонентов из клеток уделяется большое внимание, поскольку на его долю приходится до 40-60% от общей себестоимости конечного продукта [15, 16]. Методы разрушения клеток могут быть поделены на три группы: механические (физические), химические и биохимические. Механические методы менее специфичны и дезинтегрируют клеточные стенки всех видов микроводорослей, но более энергоемкие, чем химические и биохимические методы [14]. Химическая дезинтеграция клеточных стенок менее

энергоемкая, но связана с веществами, которые могут повлиять на качество и чистоту целевого продукта [14]. Биологический метод дезинтеграции считается безопасным, но в настоящее время мало изучен и обычно экономически не выгоден [9].

В связи с этим, целью исследования был сравнительный анализ методов дезинтеграции клеток микроводорослей (ферментом "лизоцим", СВЧ-излучением и ультразвуком) и интерпретация причин изменения наблюдаемых характеристик.

#### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

##### Объект исследования

Объектом исследования являлся штамм *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana*), полученный в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Культивирование штамма микроводорослей осуществлялось в фотобиореакторах объемом 2 л в течение 8 сут на питательной среде Тамия, которая вносилась на первые и четвертые сутки, в автотрофных условиях при уровне фотосинтетически активной радиации 150 мкмоль фотонов/(м<sup>2</sup>·с)), количество вносимого посевного материала, отобранного на стационарной стадии роста, составляло 10% от общего объема суспензии, температура культивирования составляла 30 ± 3 °С, уровень рН изменялся в диапазоне 6,2-8,0, аэрация суспензии (180 л/(л·ч)) осуществлялась газовой смесью с содержанием диоксида углерода 0,03% [17]. Количество клеток в полученной суспензии составляло 40 млн кл/мл.

##### Концентрирование биомассы

Отделение фугата от биомассы микроводорослей осуществлялось с использованием центрифуги Sigma 2-16 PK/2-16P при скорости вращения 4000 об/мин в течение 10 мин [17]. Количество клеток в полученной сконцентрированной суспензии составляло 5,5 млрд кл/мл.

##### Дезинтеграция клеток биомассы

Полученная биомасса влажностью 98-99% делилась на образцы объемом по 25 мл. Дезинтеграцию клеток микроводорослей осуществляли с использованием следующих методов (табл. 1-3):

1. Разрушение клеток с применением фермента лизоцима, взятого в количестве 5, 15 мг/г

биомассы при температуре 37 °С в течение 4, 16 ч [18, 19] (табл. 1).

2. Разрушение клеток с применением СВЧ-облучателя LG MB-40R42DS (сверхвысокочастотное излучение) мощностью 280, 420 или 560 Вт в течение 10, 20 или 30 с (1, 2 или 3 цикла обработки) [18] (табл. 2).

3. Обработка клеток ультразвуком (дезинтегратор Scientz IID) с частотой 25 кГц, мощностью 50 или 150 Вт в течение 60-300 с (режимы 1-4: 10 или 50 операций обработки в режиме 5 с (обработка ультразвуком) и 1 с (перерыв); режимы 5-8: 30 или 150 операций обработки в режиме 1 с (обработка ультразвуком) и 1 с (перерыв)) [18] (табл. 2).

Отрицательным контролем была биомасса микроводорослей, используемая для экстракции водорастворимых внутриклеточных белков, без предварительной дезинтеграции.

##### Определение сухого вещества клеток микроводорослей в сконцентрированной суспензии

Предварительно взвешенную пробирку со сконцентрированной биомассой клеток микроводорослей помещали в сушильный шкаф «HS-121A» при температуре 80 °С и сушили до постоянной массы ( $\Delta = 0,01$  г), затем взвешивали. Сухую биомассу определяли по формуле:

$$M = (a-b)/V, \quad (1)$$

где M – сухая биомасса, г/мл; a – масса центрифужной пробирки со сконцентрированной биомассой клеток микроводорослей, г; b – масса центрифужной пробирки (фильтра) без осадка, г; V – объем культуральной жидкости, мл.

##### Экстракция водорастворимых внутриклеточных белков из биомассы микроводорослей

Экстракцию белков из биомассы микроводорослей проводили в течение 24 ч при температуре 37 °С с использованием в качестве растворителя фосфатного буфера (рН 7,2-7,4), взятого в количестве 25 мл [25].

##### Отделение экстракта от биомассы

После экстракции биомасса клеток отделялась от экстракта с использованием центрифуги ИКА mini G (в течение 10 мин при 6000 об/мин).

Таблица 1

Параметры дезинтеграции клеток лизоцимом  
Table 1. Parameters of cell disintegration by lysozyme

Режим	Время обработки ферментом (x1), ч	Количество вносимого фермента (x2), мг/г	Кодированное значение (x1)	Кодированное значение (x2)
1	16	15	+1	+1
2	16	5	+1	-1
3	4	15	-1	+1
4	4	5	-1	-1

**Параметры дезинтеграции клеток СВЧ-излучением и ультразвуком**  
**Table 2. Parameters of cell disintegration by microwave radiation and ultrasound**

Режим	Время обработки СВЧ-излучением (x1), с	Мощность (x2), Вт	Количество операций обработки (x3), шт	Кодированное значение		
				(x1)	(x2)	(x3)
СВЧ-излучение						
1	30	560	3	+1	+1	+1
2	30	280	3	+1	-1	+1
3	10	560	3	-1	+1	+1
4	10	280	3	-1	-1	+1
5	30	560	1	+1	+1	-1
6	30	280	1	+1	-1	-1
7	10	560	1	-1	+1	-1
8	10	280	1	-1	-1	-1
9	20	420	2	0	0	0
Ультразвук						
1	300	150	50	+1	+1	+1
2	300	50	50	+1	-1	+1
3	60	150	10	-1	+1	+1
4	60	50	10	-1	-1	+1
5	300	150	150	+1	+1	-1
6	300	50	150	+1	-1	-1
7	60	150	30	-1	+1	-1
8	60	50	30	-1	-1	-1

*Определение концентрации водорастворимых белков в экстракте*

Содержание белка в экстракте определяли с использованием спектрофотометрического метода (спектрофотометр ПЭ-5400 УФ) [25] и с использованием генетического анализатора Maxlife Personal Gene Analyzer H 100 [20]. Для расчетов использовалось среднее значение концентраций, полученных с использованием двух методик [24].

*Подсчет энергетических затрат на дезинтеграцию клеток в 25 мл суспензии*

Общие энергетические затраты на дезинтеграцию клеток в 25 мл суспензии при обработке их ферментом лизоцимом  $Z_f$  (Дж) складывались из следующих составляющих:

$$Z_f = Z_1 + Z_2, \tag{2}$$

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

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

$$Z_{mw} = P \cdot \tau \cdot n, \tag{3}$$

где  $P$  – мощность СВЧ-излучения, Вт;  $\tau$  – время воздействия СВЧ-излучения, с;  $n$  – количество циклов обработки.

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

$$Z_{us} = P_u \cdot \tau_u, \tag{4}$$

где  $P_u$  – мощность воздействия ультразвуком, Вт;  $\tau_u$  – время воздействия ультразвука, с.

*Определение концентрации клеток в суспензии и средней площади поверхности клеток*

Измерение концентрации клеток  $c$  в суспензии микроводорослей до и после обработки различными способами дезинтеграции проводилось методом прямого подсчета с использованием камеры Горяева. Диаметр клеток определялся с помощью окуляр-микрометра [21]. Для расчета площади поверхности клеток  $S$  использовалась формула:

$$S = 4 \cdot \pi \cdot R^2, \tag{5}$$

где  $R$  – радиус клетки, мкм.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов эксперимента по дезинтеграции клеток микроводорослей ферментом лизоцимом (табл. 3) позволяет сделать вывод, что применение ферментного препарата для дезинтеграции клеток микроводорослей увеличивает выход белка до 2,9% (режим обработки 3).

**Таблица 3**  
**Результаты эксперимента по дезинтеграции клеток лизоцимом**  
**Table 3. Results of an experiment on cell disintegration with lysozyme**

Режим	Pr, % (масс.)	t <sub>s</sub> , °C	Z <sub>f</sub> , кДж	S±1,9, мкм <sup>2</sup>	Время обработки, ч
1	2,4	37±1	17,4	18,1	16
2	1,8		17,4	21,2	16
3	2,9		5,4	47,8	4
4	1,3		5,4	10,1	4
Отриц. контроль	1,1	24	0	38,5	-

Примечание: где Pr – выход белка; t<sub>s</sub> – температура суспензии после обработки

Note: where Pr – protein yield; t<sub>s</sub> – suspension temperature after processing

Увеличение времени обработки с 4 до 16 ч снижало выход белка, что, по-видимому, связано с разрушением части нативных белковых молекул во время длительного нахождения во внеклеточном пространстве. Важно отметить существенную разницу в наблюдаемой средней площади поверхности клеток *S* у образцов микроводорослей, разрушенных в условиях режимов 3 и 4. Как видно из результатов эксперимента, при малых дозировках фермент чаще разрушает крупные клетки, имеющие сформированную прочную клеточную стенку, которая содержит пептидогликан. Это приводит к уменьшению средней площади поверхности клеток в 3,8 раза по сравнению с контролем. Лизоцим гидролизует β-(1→4)-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозаминном (ферментативный механизм воздействия), разрушает клеточную стенку, что приводит к гибели крупных клеток. Молодые клетки с небольшой площадью поверхности чаще выживают, по-видимому, из-за того, что площадь взаимодействия клетки и молекул фермента меньше. При увеличении концентрации лизоцима молодые клетки с небольшой площадью поверхности *S* чаще взаимодействуют с молекулами фермента. При этом клеточные стенки у них не настолько прочные, как у крупных возрастных клеток [23]. В связи с этим воздействие лизоцима на такие клетки осуществляется, по-видимому, по типу катионного механизма: молекулы этого фермента способны встраиваться в клеточную мембрану с образованием в ней пор [22], что увеличивает проницаемость мембран. В результате из-за изменения осмотического давления площадь поверхности клеток *S* увеличивается в 1,2 раза (до 47,8 мкм<sup>2</sup>) по сравнению с контролем.

Затем к 16 ч такие клетки разрушаются, что подтверждается снижением средней площади поверхности клеток до 18,1 мкм<sup>2</sup> (режим 1). При увеличении дозировки фермента выход белка увеличивается в 1,6 раза, увеличение же времени обработки ферментом с 4 до 16 ч снижает выход белка на 17%.

Максимальный выход белка при дезинтеграции клеток микроводорослей СВЧ-излучением (режим 1) составил 5,5% (табл. 4).

**Таблица 4**  
**Результаты эксперимента по дезинтеграции клеток СВЧ-излучением**  
**Table 4. Results of an experiment on cell disintegration by microwave radiation**

Режим	Pr, % (масс.)	t <sub>s</sub> , °C	Z <sub>mw</sub> , кДж	S±1,9 мкм <sup>2</sup>	Время обработки*, ч
СВЧ-излучение					
1	5,5	70	50,4	30,2	0,3
2	4,3	53	25,2	22,9	0,25
3	3,3	50	16,8	32,2	0,25
4	3,1	45	8,4	28,3	0,2
5	1,2	70	16,8	24,6	0,008
6	1,3	52	8,4	28,3	0,008
7	1,3	38	5,6	24,6	0,0003
8	1,4	38	2,8	42,5	0,0003
9	2,2	61	16,8	21,2	0,1
Ультразвук					
1	11,4	38	37	13,8	0,08
2	8,2	35	12,5	28,5	0,08
3	6,2	34	7,5	32,2	0,02
4	2,2	32	2,5	52,8	0,02
5	3,4	39	22,5	32,2	0,08
6	2,9	35	7,5	50,2	0,08
7	1,1	35	4,5	52,8	0,02
8	1,0	36	1,5	36,3	0,02
9	1,3	36	13,5	26,4	0,05
Отр. контр.	1,1	24	0	38,5	-

Примечание: \* – время обработки рассчитывалось с учетом времени на охлаждение суспензии после каждой операции обработки

Note: \* – the processing time was calculated taking into account the time for cooling the suspension after each processing operation

При этом порционный ввод энергии (режим 4) в суспензию более выгоден с точки зрения выхода белка, по сравнению с однократным вводом энергии (режим 6). Это, вероятно, связано с тем, что каждый этап обработки позволяет вовлечь в процесс дезинтеграции новые небольшие клеточные агрегаты полярных молекул, которые образовались на предыдущем этапе обработки в результате разрушения больших клеточных образований:

компонентов клеточных стенок, органелл, мульти-белковых комплексов. Эти образующиеся агрегаты полярных молекул начинают активно вращаться в переменном электромагнитном поле, что приводит к увеличению количества локальных микроскопических перегревов, вскипанию большего объема воды и более эффективному разрушению клеток [28]. При извлечении из клеток микроводорослей нативных белков важно соблюдать температурный режим дезинтеграции, несоблюдение которого приведет к разрушению нативной структуры белковых молекул. СВЧ-излучение приводит к разрушению клеток с большой площадью поверхности при всех режимах обработки, кроме режима обработки биомассы №8. По-видимому, при осуществлении этого режима образуется небольшое количество «локальных перегревов», вскипание воды незначительно, что приводит лишь к увеличению внутреннего объема клеток, но не разрушению клеток.

Воздействие ультразвука (частота 25 кГц, мощность 50-150 Вт в течение 1-5 мин) на клетки микроводорослей *Chlorella sorokiniana* привело к значительному увеличению выхода водорастворимых белков от 1,2 раза до 10,4 раза, в зависимости от режима обработки суспензии.

Значительное увеличение выхода водорастворимого белка объясняется явлением кавитации [23]. Увеличение средней площади поверхности клеток у образцов, обработанных в режимах 4, 6 и 7 под действием ультразвука обусловлено, по-видимому, отрывом макромолекул и молекулярных комплексов с внешней поверхности цитоплазматической мембраны и клеточной стенки, который обусловлен возникающими на границе клетка-внешняя среда кавитационными эффектами. Такой механизм обработки характерен для режимов, при осуществлении которых в суспензию объемом 25 мл вводилось не более 7,5 кДж энергии. Это приводило к нарушению работы мембранных каналов, которые меняли свою проводимость, что вызывало изменение осмотического давления и размера клеток. Введение в суспензию большого количества энергии, по-видимому, приводит к разрушению крупных клеток микроводорослей, что объясняет снижение средней площади поверхности при реализации режимов 1-3, 5, 8 и 9. Однако важно отметить, что кратковременное воздействие ультразвука мощностью 50-150 Вт в течение 1 мин (режимы 4,7 и 8), вероятно, в основном способствует механическому разделению скоплений клеток, что объясняет невысокий выход водорастворимого белка. Полученные экспериментальные данные согласуются с рядом исследований [26, 27], которые

подтверждают эффективность применения ультразвука при извлечении внутриклеточных белков из биомассы микроводорослей *Chlorella*.

Результаты экспериментального исследования показывают, что, по-видимому, реальное содержание белка в клетках микроводорослей значительно ниже, чем описано в большинстве исследований [1-3, 5, 6]. Это можно объяснить тем, что большинство данных о концентрациях белков микроводорослей получено с применением гидролиза биомассы водорослей и оценки общего азота; таким образом, помимо белка учитывались другие компоненты микроводорослей, также содержащие азот (нуклеиновые кислоты, амины, и др.), данное предположение согласуется с выводом, сделанным в исследовании [4].

#### ВЫВОДЫ

Установлено, что дезинтеграция клеток микроводорослей позволяет увеличить выход водорастворимого белка до 10 раз по сравнению с образцами, не подвергавшимися разрушению. Выявлено, что время дезинтеграции прямо пропорционально влияет на затраты материальных и энергетических ресурсов. Наиболее перспективными методами дезинтеграции с точки зрения сокращения времени на обработку являются СВЧ-излучение и ультразвук. Определено, что наибольший выход водорастворимого внутриклеточного белка 11,4% (масс.) наблюдался после дезинтеграции клеток ультразвуком частотой 25кГц, мощностью 150 Вт в течение 300 с в режиме обработки 5 с (обработка ультразвуком) и 1 с (перерыв). Перспективным подходом к дезинтеграции клеток может стать совместное влияние рассмотренных воздействий.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-2235.2020.8.).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.*

*The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Grant of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists - candidates of sciences No. MK-2235.2020.8.).*

*The authors declare the absence a conflict of interest warranting disclosure in this article.*

## ЛИТЕРАТУРА

## REFERENCES

- Chisti Y.** Constraints to commercialization of algal fuels. *J. Biotechnol.* 2013. V. 167. N 3. P. 201-214. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.020.
- Лыткина Л.И., Шенцова Е.С., Коптев Д.В., Ситников Н.Ю.** Биореактор с применением импеллерных мешалок для культивирования биомассы микроводорослей. *Вестн. ВГУИТ.* 2019. Т. 81. № 1. С. 32-35. DOI: 10.20914/2310-1202-2019-1-32-35.
- Каленик Т.К., Добрынина Е.В., Остапенко В.М., Тори Я., Хироси Ю.** Исследование пигментов сине-зеленой водоросли спирулины платенсис для практического использования в технологиях кондитерских изделий. *Вестн. ВГУИТ.* 2019. Т. 81. № 2. С. 170-176. DOI: 10.20914/2310-1202-2019-2-170-176.
- Becker E.W.** Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 2007. V. 25. N 2. P. 207-210. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Abd Allah E.F.** Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J. Biolog. Sci.* 2019. V. 26. N 4. P. 709-722. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.11.003.
- Alam M.A., Xu J.-L., Wang Z.** Microalgae biotechnology for food, health and high value products. Singapore: Springer. 2020. 483 p. DOI: 10.1007/978-981-15-0169-2.
- Sedighi M., Jalili H., Darvish M., Sadeghi S., Ranaei-Siadat S.-O.** Enzymatic hydrolysis of microalgae proteins using serine proteases: A study to characterize kinetic parameters. *Food Chem.* 2019. V. 284. P. 334-339. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.111.
- Rojas V., Rivas L., Cárdenas C., Guzmán F.** Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae as Emerging Sources of Antibacterial Peptides. *Molecules.* 2020. V. 25. N 24. P. 5804. DOI: 10.3390/molecules25245804.
- Dixon C., Wilken L.** Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresour. Bioprocess.* 2018. V. 5. N 14. DOI: 10.1186/s40643-018-0199-3.
- Baudelet P.-H., Ricochon G., Linder M., Muniglia L.** A New insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res.* 2017. V. 25. P. 333-371. DOI: 10.1016/j.algal.2017.04.008.
- Lee S.-Y., Cho J.M., Chang Y.K., Oh Y.-K.** Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: a review. *Bioresour. Technol.* 2017. V. 244. N 2. P. 1317-1328. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.038.
- Cronmiller E., Toor D., Shao N.C., Kariyawasam T., Wang M.H., Lee J.-H.** Cell wall integrity signaling regulates cell wall-related gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. 2019. V. 9. N 1. DOI: 10.1101/543280.
- Molina-Grima E., Belarbi E., Acien G.** Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 2003. V. 20. P. 491-515. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00050-2.
- Lee A.K., Lewis D.M., Ashman P.J.** Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Bio. Bioenergy.* 2012. V. 46. P. 89-101. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034.
- Show K.-Y., Lee D.-J., Tay J.-H., Lee T.-M., Chang J.-S.** Microalgal drying and cell disruption-recent advances. *Bioresour. Technol.* 2015. V. 184. P. 258-266. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.139.
- Chisti Y.** Constraints to commercialization of algal fuels. *J. Biotechnol.* 2013. V. 167. N 3. P. 201-214. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.020.
- Lytkina L.I., Shentsova E.S., Koptev D.V., Sitnikov N.Yu.** The bioreactor with use of impeller mixers for cultivation of biomass of microalgae. *Vestn. VGUIT.* 2019. V. 81. N 1. P. 32-35 (in Russian). DOI: 10.20914/2310-1202-2019-1-32-35.
- Kalenik T.K., Dobrynina E.V., Ostapenko V.M., Torii Ya., Khiroimi Yu.** Research of pigments of blue-green algae spirulina platensis for practical use in confectionery technology. *Vestn. VGUIT.* 2019. V. 81. N 2. P. 170-176 (in Russian). DOI: 10.20914/2310-1202-2019-2-170-176.
- Becker E.W.** Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 2007. V. 25. N 2. P. 207-210. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Abd Allah E.F.** Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J. Biolog. Sci.* 2019. V. 26. N 4. P. 709-722. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.11.003.
- Alam M.A., Xu J.-L., Wang Z.** Microalgae biotechnology for food, health and high value products. Singapore: Springer. 2020. 483 p. DOI: 10.1007/978-981-15-0169-2.
- Sedighi M., Jalili H., Darvish M., Sadeghi S., Ranaei-Siadat S.-O.** Enzymatic hydrolysis of microalgae proteins using serine proteases: A study to characterize kinetic parameters. *Food Chem.* 2019. V. 284. P. 334-339. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.111.
- Rojas V., Rivas L., Cárdenas C., Guzmán F.** Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae as Emerging Sources of Antibacterial Peptides. *Molecules.* 2020. V. 25. N 24. P. 5804. DOI: 10.3390/molecules25245804.
- Dixon C., Wilken L.** Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresour. Bioprocess.* 2018. V. 5. N 14. DOI: 10.1186/s40643-018-0199-3.
- Baudelet P.-H., Ricochon G., Linder M., Muniglia L.** A New insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res.* 2017. V. 25. P. 333-371. DOI: 10.1016/j.algal.2017.04.008.
- Lee S.-Y., Cho J.M., Chang Y.K., Oh Y.-K.** Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: a review. *Bioresour. Technol.* 2017. V. 244. N 2. P. 1317-1328. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.038.
- Cronmiller E., Toor D., Shao N.C., Kariyawasam T., Wang M.H., Lee J.-H.** Cell wall integrity signaling regulates cell wall-related gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. 2019. V. 9. N 1. DOI: 10.1101/543280.
- Molina-Grima E., Belarbi E., Acien G.** Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 2003. V. 20. P. 491-515. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00050-2.
- Lee A.K., Lewis D.M., Ashman P.J.** Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: processes and specific energy requirements. *Bio. Bioenergy.* 2012. V. 46. P. 89-101. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034.
- Show K.-Y., Lee D.-J., Tay J.-H., Lee T.-M., Chang J.-S.** Microalgal drying and cell disruption-recent advances. *Bioresour. Technol.* 2015. V. 184. P. 258-266. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.139.

16. Смятская Ю.А., Кузнецова Т.А., Политаева Н.А., Амира Туми, Атаманюк И.В., Разговоров П.Б. Изучение химического состава и свойств биомассы из микроводорослей *Chlorella sorokiniana* при различных видах физических воздействий. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2019. Т. 62. Вып. 2. P. 72-78. DOI: 10.6060/ivkkt.20196202.5796.
17. Temnov M.S., Ustinskaya Y.V., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Golubyatnikov O.O., Dvoretzky S.I., Dvoretzky D.S. Analysing the influence of cultivation conditions on the activity of metabolic pathways of bcaa biosynthesis in *Chlorella vulgaris* microalgae. *Chem. Eng. Transact.* 2021. V. 86. P. 169-174. DOI: 10.3303/CET2186029.
18. Zheng H., Yin J., Gao Z., Huang H., Ji X., Dou C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011. V. 164. N 7. P. 1215-1224. DOI: 10.1007/s12010-011-9207-1.
19. Al-Zuhair S., Ashraf S., Hisaindee S., Darmaki N.A., Battah S., Svistunenko D., Reeder B., Stanway G., Chaudhary A. Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. *Eng. Life Sci.* 2017. V. 17. P. 175-185. DOI: 10.1002/elsc.201600127.
20. Fluorometer for the quantitation of DNA, RNA, and protein. <https://www.geneon.net/products/devices-tools/fluorometer-for-dna-rna-and-protein-1>.
21. Градова Н.Б., Бабусенко Е.С., Горнова И.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. М.: Дели принт. 2004. 144 с.
22. Gálvez-Iriqui A.C., Plascencia-Jatomea M., Bautista-Bañón S. Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Rev. Tex. Fitopatol.* 2020. V. 38. N 3. C. 1-24. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-6.
23. Антушева Т.И. Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы. *Живые и биокостные системы*. 2013. Вып. 4. С. 1-11.
24. Уилсон К., Уолкер Д. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. М.: БИНОМ. 2015. 855 с.
25. Pandey A., Negi S., Binod P., Larroche C. Pretreatment of biomass: processes and technologies. Elsevier. 2014. 272 p.
26. Zhang R., Chen J., Zhang X. Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. *Bioresour. Technol.* 2018. V. 247. P. 267-272. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.087.
27. Hildebrand G., Poojary M., O'Donnell C., Lund M.N., Garcia-Vaquero M., Tiwari B.K. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *J. Appl. Phycol.* 2020. V. 32. P. 1709-1718. DOI: 10.1007/s10811-020-02105-4.
28. Dvoretzky D., Dvoretzky S., Temnov M., Akulinin E., Zuorro A. The effect of the complex processing of microalgae *Chlorella vulgaris* on the intensification of the lipid extraction process. *Chem. Eng. Transact.* 2017. V. 57. P. 721-726. DOI: 10.3303/CET1757121.
16. Smyatskaya Y.A., Kuznetsova T.A., Politaeva N.A., Amira T., Atamanyuk I.V., Razgovorov P.B. Study of chemical composition and properties of biomass of *Chlorella sorokiniana* under influence of different physical factors. *ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]*. 2019. V. 62. N 2. P. 72-78. DOI: 10.6060/ivkkt.20196202.5796.
17. Temnov M.S., Ustinskaya Y.V., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Golubyatnikov O.O., Dvoretzky S.I., Dvoretzky D.S. Analysing the influence of cultivation conditions on the activity of metabolic pathways of bcaa biosynthesis in *Chlorella vulgaris* microalgae. *Chem. Eng. Transact.* 2021. V. 86. P. 169-174. DOI: 10.3303/CET2186029.
18. Zheng H., Yin J., Gao Z., Huang H., Ji X., Dou C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011. V. 164. N 7. P. 1215-1224. DOI: 10.1007/s12010-011-9207-1.
19. Al-Zuhair S., Ashraf S., Hisaindee S., Darmaki N.A., Battah S., Svistunenko D., Reeder B., Stanway G., Chaudhary A. Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. *Eng. Life Sci.* 2017. V. 17. P. 175-185. DOI: 10.1002/elsc.201600127.
20. Fluorometer for the quantitation of DNA, RNA, and protein. <https://www.geneon.net/products/devices-tools/fluorometer-for-dna-rna-and-protein-1>.
21. Gradova N.B., Babusenko E.S., Gornova I.B. Laboratory manual in general microbiology. М.: Deli Print. 2004. 144 p. (in Russian).
22. Gálvez-Iriqui A.C., Plascencia-Jatomea M., Bautista-Bañón S. Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Rev. Tex. Fitopatol.* 2020. V. 38. N 3. P. 1 -24. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-6.
23. Antusheva T.I. Some features of the effect of ultrasound on microorganisms. *Zhivye Biokostnye Sistemy*. 2013. N 4. P. 1-11 (in Russian).
24. Wilson K., Walker J. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. М.: BINOM. 2015. 855 p. (in Russian).
25. Pandey A., Negi S., Binod P., Larroche C. Pretreatment of biomass: processes and technologies. Elsevier. 2014. 272 p.
26. Zhang R., Chen J., Zhang X. Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. *Bioresour. Technol.* 2018. V. 247. P. 267-272. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.087.
27. Hildebrand G., Poojary M., O'Donnell C., Lund M.N., Garcia-Vaquero M., Tiwari B.K. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *J. Appl. Phycol.* 2020. V. 32. P. 1709-1718. DOI: 10.1007/s10811-020-02105-4.
28. Dvoretzky D., Dvoretzky S., Temnov M., Akulinin E., Zuorro A. The effect of the complex processing of microalgae *Chlorella vulgaris* on the intensification of the lipid extraction process. *Chem. Eng. Transact.* 2017. V. 57. P. 721-726. DOI: 10.3303/CET1757121.

Поступила в редакцию 06.10.2021  
Принята к опубликованию 31.01.2022

Received 06.10.2021  
Accepted 31.01.2022