

*Я. В. Устинская, М. А. Еськова, К. И. Меронюк, В. С. Темнова**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕЖИМОВ ДЕЗИНТЕГРАЦИИ КЛЕТОК УЛЬТРАЗВУКОМ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Клетки микроводорослей являются перспективным источником белка, который, помимо пищевой ценности, проявляет многочисленные биологические свойства: антиоксидантные, бактериостатические, антигипертензивные, иммуномодулирующие и противовоспалительные [1]. 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 [2].

Сложность извлечения белков из клеток микроводорослей заключается в том, что большинство видов микроводорослей обладают жесткими клеточными стенками [3], которые препятствуют экстракции белка. Клеточные стенки микроводорослей могут сильно различаться по строению, но чаще всего содержат следующие полимеры: целлюлоза, гемицеллюлоза (ксилоглюкан, маннаны, глюкуроан, (1 → 3) -β-глюкан), хитиноподобный пептидогликан и ульван [3].

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. Одним из наиболее перспективных методов дезинтеграции клеток микроводорослей является воздействие ультразвука. Применение этого метода позволяет увеличить выход извлечения целевого внутриклеточного продукта в 2–3 раза [4].

В связи с этим, целью исследования было определение закономерностей влияния режимов дезинтеграции ультразвуком клеток микроводоросли штамма *Chlorella vulgaris Beijer IPPAS C-1 (Chlorella sorokiniana)*, полученного в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, на выход экстракции внутриклеточного белка.

Культивирование штамма микроводорослей осуществлялось в фотобиореакторах объемом 2 л в течение 8 суток на питательной среде Tamiya, которая вносилась на первые и четвертые сутки, в авто-

* Работа выполнена под руководством канд. техн. наук, доцента кафедры «ТОПиХП» ФГБОУ ВО «ГГТУ» М. С. Темнова.

трофных условиях при уровне фотосинтетически активной радиации 150 мкмоль фотонов/(м²·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%. Количество клеток в полученной суспензии составляло 40 млн кл/мл.

Подсчет клеток в суспензии осуществлялся методом прямого подсчета в камере Горяева.

Концентрирование клеток осуществлялось в поле центробежных сил с использованием центрифуги Sigma 2-16 RK/2-16P в течение 8,5 мин при $g = 1700$ (4000 об/мин). Полученная биомасса влажностью 98...99% делилась на образцы объемом 25 мл. Дезинтеграцию клеток микроводорослей осуществляли с использованием следующего метода (табл. 1): обработка клеток ультразвуком (дезинтегратор Scientz IID) с частотой 25 кГц, мощностью 50, 100 или 150 Вт в течение 1, 3 или 5 мин (1, 3 или 5 циклов обработки).

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

1. Параметры дезинтеграции клеток ультразвуком

Режим	Время обработки ультразвуком τ_u (x1), мин	Мощность ультразвука P_u (x2), Вт	Воздействие ультразвука/пауза (x3), с/с
1	5	150	5/1
2	5	50	5/1
3	1	150	5/1
4	1	50	5/1
5	5	150	1/1
6	5	50	1/1
7	1	150	1/1
8	1	50	1/1
9	3	100	3/1

Экстракцию белков из биомассы микроводорослей проводили в течение 24 часов при температуре 37 °С с использованием в качестве растворителя фосфатного буфера (рН 7,2-7,4), взятого в количестве 25 мл. После экстракции биомасса клеток отделялась от экстракта

с использованием центрифуги *IKA mini G* (в течение 10 минут при 6000 об/мин).

Содержание белка в экстракте определяли с использованием спектрофотометрического метода и с использованием генетического анализатора *Maxlife Personal Gene Analyzer H 100*. Для расчетов использовалась среднее значение концентраций, полученных с использованием двух методик.

Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

2. Результаты эксперимента по дезинтеграции клеток ультразвуком

Режим	τ_u (x1), мин	P_u (x2), Вт	Воздействие ультразвука/ пауза (x3), с/с	Выход белка Pr, % (масс.)
1	5	150	5/1	11,4
2	5	50	5/1	8,2
3	1	150	5/1	6,2
4	1	50	5/1	2,2
5	5	150	1/1	3,4
6	5	50	1/1	2,9
7	1	150	1/1	1,1
8	1	50	1/1	1,0
9	3	100	3/1	1,3
Отриц. контроль	–	–	–	1,1

Воздействие ультразвука (частотой 25 кГц и мощностью 50 – 150 Вт в течение 1 – 5 мин (1 – 5 повторов обработки)) 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 (табл. 2), по сравнению с отрицательным контролем (биомасса с целыми клетками микроводорослей). Наиболее перспективным режимом, увеличивающим выход водорастворимого белка до 11,4% (масс.), является режим № 1: воздействие ультразвуком мощностью 150 Вт в течение 5 минут (время воздействия/пауза – 5:1). Значительное увеличение выхода водорастворимого белка объясняется тем, что ультразвуковое воздействие оказывает комплексное воздействие на клетки биомассы микроводорослей:

- 1) способствует механическому разделению скоплений клеток;
- 2) приводит к нарушению работы мембранных каналов, которые меняют свою проводимость, что вызывает изменение осмотического давления и разрыв клеточных стенок;
- 3) вызывает отрыв макромолекул и молекулярных комплексов с внешней поверхности цитоплазматической мембраны и клеточной стенки из-за возникающих на границе клетка–внешняя среда кавитационных эффектов.

Результаты экспериментального исследования показывают, что, по-видимому, реальное содержание белка в клетках микроводорослей значительно ниже, чем описано в большинстве исследований [1, 2]. 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.).

Проведенное экспериментальное исследование позволяет сделать вывод о том, что применение ультразвуковых установок позволяет в значительной степени увеличить выход водорастворимых белков (до 10,4 раза) при их извлечении из клеток микроводорослей штамма *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana*), обладающего жесткой клеточной стенкой.

Статья написана при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации – грант МК-2235.2020.8.

Список литературы

1. Sedighi, M. Enzymatic Hydrolysis of Microalgae Proteins Using Serine Proteases: a Study to Characterize Kinetic Parameters / M. Sedighi, H. Jalili, M. Darvish, et al. // Food. Chem. 284 (2019). – 334 – 339.
2. Alam, M. A. Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products / M. A. Alam, J.-L. Xu, Z. Wang // Springer Nature Singapore. – 2020. – 483 p.
3. Dixon, C. Green Microalgae Biomolecule Separations and Recovery / C. Dixon, L. R. Wilken // Bioresour. Bioprocess. 5 (2018). – 24 p.
4. Lee, A. K. Disruption of Microalgal Cells for the Extraction of Lipids for Biofuels: Processes and Specific Energy Requirements / A. K. Lee, D. M. Lewis, P. J. Ashman // Biomass Bioenergy. 46 (2012). 89 – 101.

Кафедра «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО «ТГТУ»