

Науковий вісник Львівського національного університету  
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.  
Серія: Сільськогосподарські науки

Scientific Messenger of Lviv National University  
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.  
Series: Agricultural sciences

ISSN 2519–2698 print  
ISSN 2707–5834 online

doi: 10.32718/nvlvet-a10150  
<https://nvlvet.com.ua/index.php/agriculture>

UDC 582.261.2:547:664

## Biological features, biotechnology, cultivation and areas of stagnation of microscopic single-cell algae of the genus *Chlorella*: (review of the literature)

V. Grishko<sup>✉</sup>, V. Zotsenko, N. Bogatko, D. Ostrovskiy

Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, Ukraine

### Article info

Received 22.10.2024  
Received in revised form  
25.11.2024  
Accepted 26.11.2024

Bila Tserkva National Agrarian  
University, pl. Soborna, 8/1,  
Bila Tserkva, 09117, Ukraine.  
Tel.: +38-098-595-20-02  
E-mail: vetalgwa44@gmail.com

**Grishko, V., Zotsenko, V., Bogatko, N., & Ostrovskiy, D. (2024). Biological features, biotechnology, cultivation and areas of stagnation of microscopic single-cell algae of the genus *Chlorella*: (review of the literature). Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences, 26(101), 329–340. doi: 10.32718/nvlvet-a10150**

Currently, microscopic algae have become a promising alternative raw material that represents a huge biodiversity and has many advantages that can approach the potential of traditional agricultural raw materials. The article describes a wide range of properties of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* based on scientific studies reported in various literature sources. Attention is focused on their morphology, physiology, and modern biotechnological approaches to the cultivation, accumulation, collection, purification, and processing of biomass are considered. The processes of obtaining valuable biologically active components, such as proteins, lipids, carbohydrates, and pigments from the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* are presented. Particular attention is paid to the influence of cultivation conditions on the chemical composition of the obtained microalgal biomass, as well as methods and technologies for its further processing into valuable biologically active components. The article describes the use of *Chlorella* microalgae in such industries as biotechnology, pharmaceuticals, cosmetics, food and chemicals, energy, and agriculture. The article emphasizes the prospects of microalgae in the production of biofuels, including biodiesel and bioethanol, as well as in bioremediation, including wastewater treatment. Based on global scientific research, *Chlorella* microalgae have been shown to be multifunctional sources of proteins, lipids and carbohydrates suitable for both human consumption and animal feed. Due to the ability of microalgae to grow in different environmental conditions, they are a promising solution for industrial biomass production, which is potentially unable to compete with traditional farming methods. Thanks to its ability to use carbon dioxide and release oxygen in the process of life, the concentration of CO<sub>2</sub> in the environment is reduced, which in turn is of crucial environmental importance. The authors emphasize the significant scientific and technological progress in the use of microalgae *Chlorella vulgaris* in recent years, due to its versatility and significant opportunities for further research and practical application in various fields.

**Key words:** biotechnology, cultivation, microalgae, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, biological properties, chemical composition, proteins, lipids, carbohydrates, pigments.

## Біологічні особливості, біотехнологія культивування та сфери застосування мікроскопічних одноклітинних водоростей роду *Chlorella*: (огляд літератури)

В. А. Гришко<sup>✉</sup>, В. М. Зоценко, Н. М. Богатко, Д. М. Островський

Білоцерківський національний аграрний університет, м. Біла Церква, Україна

Станом на теперішній час мікроскопічні водорості стали багатобічною альтернативною сировиною котра являє собою величезне біорізноманіття і має багато переваг, що може наблизитись до потенціалу традиційної сільськогосподарської сировини. У статті на основі наукових досліджень висвітлених в різних літературних джерелах описано широкий спектр властивостей мікрowodоростей *Chlorella vulgaris* і *Chlorella sorokiniana*. Акцентовано увагу на їх морфології, фізіології, а також розглянуто учасні біотехнологічні підходи до культивування, накопичення, збору, очистки та обробки біомаси. Наведено процеси отримання з

мікродоростей *Chlorella vulgaris* і *Chlorella sorokiniana* цінних біологічно активних компонентів, таких як білки, ліпіди, вуглеводи, пігменти. Особливо увага приділена впливу умов культивування на хімічний склад отриманої біомаси мікродоростей, а також методам і технологіям її подальшої переробки на цінні біологічно-активні компоненти. У статті розкрито застосування мікродоростей *Chlorella* в таких галузях, як біотехнологія, фармацевтична промисловість, косметологія, харчова та хімічна промисловість, енергетика й сільське господарство. Відзначено перспективність мікродоростей у виробництві біопалива, включаючи біодизель і біоетанол, а також у біоремедіації, зокрема очищенні стічних вод. На основі всесвітніх наукових досліджень показано, що мікродорості *Chlorella* є багатofункціональними джерелами білків, ліпідів і вуглеводів, що придатні як для харчування, так і для створення кормів для тварин. Завдяки здатності мікродоростей до росту в різних умовах навколишнього середовища, вони є перспективним рішенням для промислового виробництва біомаси, що потенційно не здатна конкурувати з традиційними методами землеробства. Завдяки її здатності використовувати в процесі життєдіяльності вуглекислий газ і виділяти кисень, зменшується концентрація CO<sub>2</sub> у навколишньому середовищі, що в свою чергу має надважливе екологічне значення. Авторами акцентується увага на значному науково-технічному прогресі у сфері використання мікродоростей *Chlorella vulgaris* за останні роки, за рахунок її універсальності та значних можливостей для подальших наукових досліджень і практичного застосування в різних галузях.

**Ключові слова:** біотехнологія, культивування, мікродорості, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, біологічні властивості, хімічний склад, білки, ліпіди, вуглеводи, пігменти.

## Вступ

За сучасними історично-науковими даними мікроскопічні водорості мають давню історію, майже 3,4 мільярда років тому. Найстарішу з відомих мікродоростей, що належить до групи ціанобактерій, знайдено у скам'янілих в скелях Західної Австралії. Генетичними і біохімічними дослідженнями підтверджено, що до наших днів їх біологічна структура залишається незмінною незважаючи на їх примітивну форму, вони все ж являють собою досить складну організовану форму життя. У працях інших науковців фактичний час еволюції ціанобактерій становить до 2,7 мільярдів років тому (Dalton, 2002). За думкою, біологів-еволюціоністів водорості є предками сучасних рослин. Водорості дали початок морським рослинам які потім перемістилися на сушу під час палеозойської ери 450 мільйонів років тому, подібно до сценарію переміщення тварин з води на сушу. Однак дана гіпотеза містить багато недоведених протирічч (небезпека висихання, організація живлення, розмноження та захист від Оксигену), тому дана наукова думка повинна бути, доповнена ширшими науковими дослідженнями.

Мікроскопічні водорості мають досить високу харчову цінність. А першими, хто споживав синьо-зелену мікроскопічну водорість, були ацтеки та інші жителі Мезоамерики, які використовували їхню біомасу як важливу біодобавку до раціону харчування та джерело білку (Venkataraman, 1997). У наш час мікроскопічні організми *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* і *Spirulina platensis* все ще використовуються як харчові добавки, а продукти їхнього обміну як: природні барвники для хімічної та харчової промисловості, біологічно активні компоненти в фармацевтичних препаратах, в корми раціонах для тварин та аквакультури, а також в галузях косметики та енергетики. Останніми десятиліттями мікроскопічні водорості використовують як перспективний енергетичний ресурс завдяки їхній здатності накопичувати велику кількість ліпідів, придатних для виробництва біодизелю, який використовують так же, як і нафтове паливо (González-Fernández et al., 2012). Вони є також джерелом таких продуктів, як білки, вуглеводи, пігменти, вітаміни та мінерали. Крім того, мікроскопічні водорості інтенсивно вловлюють сонячне світло в

процесі фотосинтезу, виробляючи близько половини атмосферного кисню на землі та поглинаючи величезну кількість вуглекислого газу як основного елементу живлення. Тому особливо доцільно з економічної точки зору встановлювати біотехнологічні фабрики з культивування мікроскопічних водоростей хлорели поруч із тепловими електро та теплостанціями, що працюють на викопних енергоресурсах (Ghirardi et al., 2000; Banerjee et al., 2002).

Мікроскопічні водорості мають широкі властивості пристосування до факторів навколишнього середовища, і можуть рости як у прісній, так і в морській воді, а також на землі, від замерзлих земель Скандинавії до гарячих пустельних ґрунтів Сахари (Lee, 2008). Якщо встановити біотехнологічні установки з культивування водоростей розумним чином, мікроскопічні водорості не конкурували б із сільськогосподарськими угіддями, не було б конфлікту з виробництвом харчових продуктів (Singh et al., 2011) і особливо не спричиняли б вирубки лісів.

Мікродорості представляють величезне біорізноманіття, близько 40 000 з яких уже описано або проаналізовано (Hu et al., 2008). Однією з найвидатніших є зелена еукаріотична мікродорість *C. vulgaris*, яка належить до такої наукової класифікації: Область: *Eukaryota*, Царство: *Protista*, Відділ: *Chlorophyta*, Клас: *Trebouxiophyceae*, Порядок: *Chlorellales*, Родина: *Chlorellaceae*, Рід: *Chlorella*, Вид: *Chlorella vulgaris*. Таким чином, Мартінус Віллем Бейерінк, голландський дослідник, вперше виявив її в 1890 році як першу мікродорість із чітко визначеним ядром (Beijerinck, 1890). Назва *Chlorella* походить від грецького слова *chloros* (Χλωρός), що означає зелений, і латинського суфікса *ella*, що означає її мікроскопічний розмір. Це одноклітинна мікродорість, яка росте в прісній воді і існує на землі з докембрійського періоду 2,5 мільярда років тому, і з тих пір її генетична цілісність залишається незмінною (Brasier et al., 2002). На початку 1900-х років вміст білка *Chlorella* (>55 % сухої ваги) привернув увагу німецьких учених як нетрадиційне джерело їжі. У 1950-х роках Інститут Карнегі у Вашингтоні (Burlew, 1953) взяв на себе дослідження, і йому вдалося виростити цю мікроскопічну водорість у великому масштабі для зменшення CO<sub>2</sub> у повітрі. Сьогодні Японія є світовим лідером у споживанні хлорели та використо-

вуге її для лікування (Kitada et al., 2009), оскільки вона показала імуномодуючі та протиракові властивості (Justo et al., 2001). Після згодовування його щурам, мишам і кроликам у вигляді порошку він показав захисні властивості проти захворювань системи кровотворення (Souza Queiroz et al., 2013), пов'язаних із віком, таких як серцево-судинні захворювання, гіпертонія та катаракта; знижує ризик атеросклерозу та стимулює синтез колагену для шкіри (Sano et al.,

1988). Крім того, *C. vulgaris* також здатна синтезувати значну кількість ліпідів, особливо після нітрогенного голодування з профілем жирних кислот, і є придатним для виробництва біодизеля (Chisti, 2007).

**Морфологія *Chlorella vulgaris*.** *C. vulgaris* є сферичною мікроскопічною клітиною діаметром 1,5–15 мкм (рис. 1) (Illman et al., 2000), і має багато структурних елементів, подібних до рослин (рис. 2).

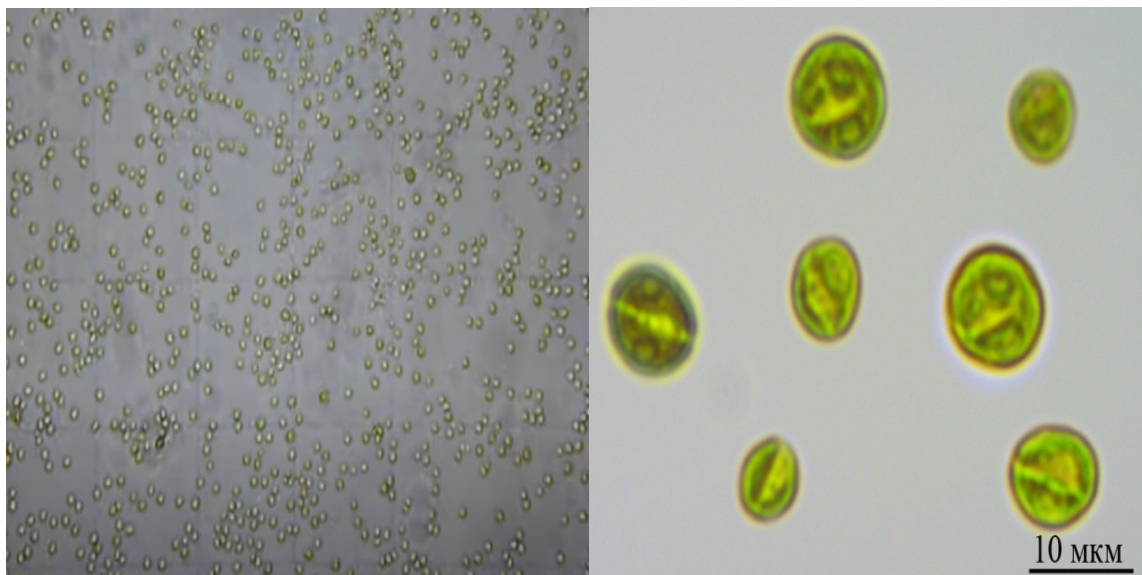


Рис. 1. Клітини *Chlorella vulgaris* під світловим мікроскопом

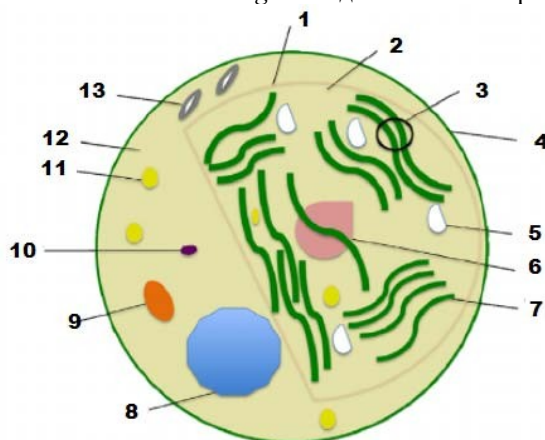


Рис. 2. Внутрішня будова *Chlorella vulgaris*

1 – мембрана хлоропласта; 2 – хлоропласт; 3 – хлорофіл і каротиноїди; 4 – клітинна стінка; 5 – крохмальне зерно; 6 – піреноїд; 7 – тилакоїд; 8 – ядро; 9 – вакуоля; 10 – апарат Гольджі; 11 – ліпідна крапля; 12 – цитоплазма; 13 – мітохондрія

У кожній клітині міститься гомогенна протоплазма, одне ядро і хлоропласт. Цитоплазма являє собою гелеподібну субстанцію. Ядро *Ch. vulgaris* містить 16 хромосом. Хлоропласт широкий поясо-подібний, незамкнутий, забарвлений у зелений колір. Він містить у собі структуру, звану піреноїдом. Крім того, в ньому містяться крохмальні зерна і ліпідні краплі. У тилакоїдах хлоропласта присутні пігменти: хлорофіл а, хлорофіл b і каротиноїди. Джгутиків, скоротливих вакуолей і вічок хлорела не має.

На зрілій стадії товщина клітинної стінки та її склад непостійні, вони змінюються відповідно до умов росту та навколишнього середовища. Деякі дослідники (Atkinson et al., 1972) пояснювали, що жорст-

кість клітинної стінки, обумовлена наявним шаром спорополненіну, хоча загальновизнано, що *C. vulgaris* має одношарову клітинну стінку, у якій відсутній спорополненін. Це є надзвичайно стійкий полімеризований каротиноїд, знайдений на клітинній стінці *Chlorella fusca* (Biedlingmaier et al., 1987; Hagen et al., 2002). Жорсткість зберігає цілісність клітини і є захистом від навколишнього середовища. За час раннього формування в аутоспорангії новоутворена клітинна стінка залишається крихкою, утворюючи тонкий електронно-щільний одношаровий шар товщиною 2 нм (Yvonne & Tomas, 2000). Клітинна стінка дочірньої клітини поступово збільшується в товщину, поки не досягне 17–21 нм після дозрівання де утворюється



мікрофібрилярний шар, який представляє собою хітозанопоподібний шар, що складається з глікозаміну (Kapaun & Reisser, 1995; Yvonne & Tomas, 2000), що пояснює його жорсткість.

Однак суперечливе дослідження, проведене на *C. vulgaris* щодо наявності спорополненію Martinez et al. (1991) котрі спостерігаючи за зовнішнім триламінарним шаром виявили стійкі залишки після ацетолізу.

Під оболонкою клітини міститься гелеподібна речовина, яка складається з води, розчинних білків і мінералів. У цьому гелеподібному середовищі містяться внутрішні органели *C. vulgaris*, такі як мітохондрії, мале ядро, вакуолі, один хлоропласт і тільце Гольджі (Kuchitsu et al., 1987).

Кожна мітохондрія містить генетичні матеріали, дихальний апарат і має двохарову мембрану; зовнішня мембрана оточує весь органел і складається з рівного співвідношення білків і фосфоліпідів. Тим не менш, внутрішня мембрана складається з втричі більшої кількості білків, ніж фосфоліпідів; вона оточує внутрішній простір, який називається матриксом, який містить більшість мітохондріальних білків (Solomon et al., 1999).

*C. vulgaris* має один хлоропласт з подвійною обволікаючою мембраною, що складається з фосфоліпідів; зовнішня мембрана проникна для метаболітів та іонів, але внутрішня мембрана має більш специфічну функцію щодо транспорту білків. Крохмальні гранули, що складаються з амілози та амілопектину, можуть утворюватися всередині хлоропласта, особливо під час несприятливих умов росту. Піреноїд містить високі рівні рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази оксигенази (RuBisCO) і є центром фіксації вуглекислого газу. У хлоропласті також зберігається кластер злитих тилакоїдів, де синтезується домінуючий пігмент хлорофіл, який маскує колір інших пігментів, таких як лютеїн. Під час азотистого стресу ліпідні глобули в основному накопичуються в цитоплазмі та хлоропласті (Lee, 2008).

**Розмноження.** *C. vulgaris* – це нерухома репродуктивна клітина (аутоспора), яка швидко розмножується. Для хлорели характерне нестатеве розмноження. Клітини здебільшого діляться на 2–8 аутоспор (рис. 3). Стійкого циклу розвитку не має, в культурі розвивається асинхронно.

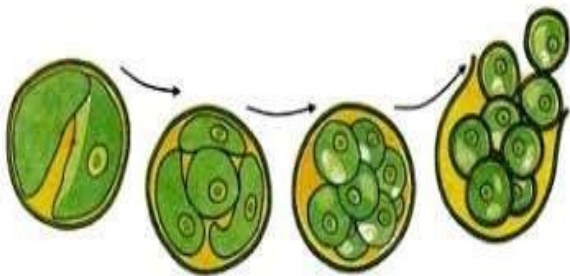


Рис. 3. Нестатеве розмноження *Chlorella vulgaris* (схема)

Клітини *Ch. vulgaris* здатні вільно розподілятися в середовищі культивування, вони не осідають у стані спокою протягом 6–15 діб. Культура хлорели не вибаглива до живильного середовища та наявності вугле-

кислого газу у ній, при культивуванні не потребує механічного перемішування.

Таким чином, протягом 24 год одна клітина *C. vulgaris*, вирощена в оптимальних умовах, розмножується шляхом аутоспоруляції, що є найпоширенішим нестатевим розмноженням у водоростей. Таким чином чотири дочірні клітини, що мають власну клітинну стінку, утворюються всередині клітинної стінки материнської клітини (рис. 4) (Yamamoto et al., 2004).



Рис. 4. Поділ клітини під електронним мікроскопом (Yamamoto et al., 2004)

Після дозрівання цих новоутворених клітин стінка материнської клітини розривається, дозволяючи звільнитися дочірнім клітинам, а залишки материнської клітини будуть споживатися новоутвореними дочірніми клітинами як поживний субстрат.

**Біотехнологія культивування біомаси хлорели у відкритих системах ставкового типу.** Біотехнологія культивування хлорели у відкритих ставкових системах є економічно вигідним методом для виробництва біомаси. Такі системи традиційно розташовують поблизу електростанцій чи промислових об'єктів із високими викидами CO<sub>2</sub>, де біомаса поглинає азот у формі NO<sub>2</sub>. Оптимальна глибина ставок для забезпечення ефективного доступу сонячного світла становить 15–50 см.

Водночас відкриті ставки мають недоліки: ризик забруднення, випаровування, проникнення бактерій, неконтрольованість розростання інших водоростей, сезонні температурні коливання та стійкість регулювання CO<sub>2</sub> і освітлення. Наприкінці експоненціальної фази росту клітин в глибині підтримується менше світла, що значно знижує продуктивність. Для розв'язання цих проблем необхідно постійно перемішувати поживне середовище з культурою (Brennan & Owende, 2010).

**Закриті біотехнології культивування біомаси хлорели.** Ці системи культивування хлорели розроблені для усунення недоліків виявлених у відкритих ставкового типу біотехнологіях, забезпечуючи контрольовані умови (рН, інтенсивність світла, температура, концентрація CO<sub>2</sub>). Завдяки цьому отримують більшу концентрацію клітин і продуктів, придатних для фармацевтики, харчової продукції та косметики. Такі системи оптимальні також для чутливих штамів, що не витримують умов навколишнього середовища.

Часто у біореакторах подача  $\text{CO}_2$  створюється шляхом барботування, а при недостатньому природному освітленні застосовуються люмінесцентні лампи чи світлодіодне освітлення. Захисні трубки ламп мають прозорі стінки завтовшки кілька міліметрів діаметром до 20 см, що забезпечує ефективне поглинання світла. Науковцями випробувано різні конструкції: плоскі фотопластинкові (Zhang et al., 2001), трубчасті і колонні фотобіореактори (Kojima & Zhang, 1999). Наприклад, Деген та ін. (Degen et al., 2001) досягли продуктивності сухої біомаси 0,11 г/л·год, культивуючи *C. vulgaris* в аеріфтному фотобіореакторі з плоскою панеллю при безперервному освітленні (980 мкЕ/м<sup>2</sup>·с).

Основні недоліки закритих систем включають обмеження за рахунок високої вартості конструкції, освітлення площі та витрати на стерилізацію (Lee, 2001).

Закриті системи також дозволяють культивувати мікроводорості у ферментерах із джерелами органічного вуглецю без необхідності світла. Це забезпечує вищі темпи росту та продуктивність біомаси, наприклад, до 0,25 г/л·д (Liang et al., 2009). Джерелами вуглецю для *C. vulgaris* можуть бути глюкоза, ацетат, гліцерин і глутамат, при цьому глюкоза забезпечує максимальну швидкість росту. Водночас основним обмеженням є висока вартість цукру, що конкурує з потребами в харчовій промисловості та при виробництві біопалива.

Міксотрофний метаболізм *C. vulgaris* дозволяє поєднувати автотрофне (фотосинтез) і гетеротрофне (використання органічних речовин) живлення. Це забезпечує незалежність від світла та органічних субстратів. За даними Yeh і Chang (Yeh & Chang, 2012), такий підхід демонструє високу продуктивність біомаси (2–5 г/л·д) і ліпідів (67–144 мг/л·д). Перевагами міксотрофії зменшується втрата біомаси через дихання в темряві та скорочення потреби в органічних субстратах (Liang et al., 2009).

**Інші методи біотехнології культивування біомаси хлорели.** Інтенсифікація вирощування *C. vulgaris* для підвищення врожайності шляхом її спільної іммобілізації з бактерією *Azospirillum brasilense* в альгінатних культурах (de-Bashan et al., 2005). Ця методика базується на гіпотезі, що *A. brasilense* сприяє зростанню рослинних рослин через втручання у гормональний метаболізм рослини-господаря, а також забезпечує бактеріальний Оксиген ( $\text{O}_2$ ) для біологічного розкладу забруднювачів. У свою чергу мікроводорості споживають вивільнений  $\text{CO}_2$ , який утворюється внаслідок дихання бактерій (Muñoz & Guieysse, 2006).

Залежно від штаму *C. vulgaris* (de-Bashan et al., 2002), ця методика забезпечує: подовження життєвого циклу мікроводорості, підвищення виробництва біомаси, збільшення розміру клітин (до 62 %), підвищення концентрації пігментів і ліпідів.

Одночасно підвищене поглинання мікроводоростями Цинку, Кадмію, Фосфору, Нітрогену та інших важких металів зі стічних вод. Однак використання іншої асоціативної бактерії, *Phyllobacterium myrsinacearum*, у системі вирощування *C. vulgaris*,

може призвести до негативного ефекту, включаючи зупинку росту або загибель клітин мікроводорості (Lebsky et al., 2001).

Крім того, параметри середовища, такі як концентрація змішування та напруги зсуву pH, суттєво впливають на підвищення фотосинтетичної активності та інтенсивності росту *C. vulgaris* (Leupold et al., 2013).

**Збирання біомаси.** Метод центрифугування є найпоширенішим при збиранні біомаси *C. vulgaris*, забезпечуючи високий рівень ефективності при досягненні до 92–94 % біомаси. Цей процес складає близько 20–30 % від загальних витрат на виробництво біомаси. Центрифугування протягом 15 хвилин на швидкості 5000 об/хв, дозволяє швидко обробляти великі об'єми суспензії мікроводорості без значних витрат часу.

Морфологічні особливості *C. vulgaris* залишають місце для високих відцентрових швидкостей під час центрифугування без пошкодження клітинної структури. Окрім центрифугування, також застосовуються інші методи збирання біомаси, такі як флокуляція, флоатація та фільтрація. У деяких випадках комбінування цих методів дозволяє досягти ще кращих результатів у отриманні біомаси.

Флокуляція, флоатація та фільтрація також використовується для збирання біомаси мікроводоростей. Флокуляція відбувається, коли клітини водоростей, агрегують через зменшення негативного поверхневого заряду, з утворенням грудок. Цей процес ще називають автофлокуляцією, він пов'язаний з підвищенням pH через асиміляцію  $\text{CO}_2$ , нітратів та фосфатів. Для прискорення процесу додають NaOH, який індукує понад 90 % флокуляції при pH 11 (Vandamme et al., 2012), або вапно. Вапно, завдяки  $\text{Mg}^{2+}$  з  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , виявляється більш проданим у промислових масштабах. Інші флокулянти, як хітозан і *Paenibacillus sp.* в присутності  $\text{CaCl}_2$ , також демонструють високу ефективність (Divakaran & Sivasankara Pillai, 2002). Флокуляція часто використовують у поєднанні з центрифугуванням або фільтрацією для покращення збирання біомаси (Lee et al., 2012).

Флоатація, заснована на захопленні клітин мікроводорості диспергованими мікропухирцями повітря, також може відбуватися природно для підвищення вмісту ліпідів у водоростях. Cheng та ін. (Cheng et al., 2011) продемонстрували ефективну флоатацію *C. vulgaris* за допомогою озону. Цей метод не потребує хімічних добавок, але з економічної точки зору його економічна життєздатність у промислових масштабах потребує необхідно провести подальших і досліджень.

Фільтрація включає пропускання суспензії через фільтри для концентрації клітин водоростей. Для *C. vulgaris* звичайна фільтрація не є ефективною через малий розмір клітин, тому використовують ультрафільтрацію або мікрофільтрацію. Для *C. vulgaris* екзополісахариди не є значною перешкодою, що дозволяє зберегти високу ефективність фільтрації (Frappart et al., 2011). Однак ультрафільтрація залежить від різних параметрів, як тип фільтра та трансмембранний тиск, що потребує оптимізації цих факторів для покращення процесу (Chang & Lee, 2012).

**Методи руйнування клітин мікроводоростей для отримання БАР.** *C. vulgaris* має стійку клітинну стінку, що ускладнює процес екстракції внутрішніх компонентів. Руйнація клітин є складною та дорогою операцією. Застосовано різні методи, серед яких охолодження при механічному руйнуванні, щоб уникнути перегріву та окиснення компонентів. Ензиматична обробка є перспективною, але вимагає знання ультраструктури клітинної стінки для вибору відповідного ферменту (Lee et al., 2010). За даними Lee et al. (2010) та Zheng et al. (2001), найефективнішими методами для руйнування клітин *C. vulgaris* з відновленням 30 % ліпідів є автоклавування, мікрохвильове оброблення, ферментація та подрібнення рідким азотом. Однак якість цільових молекул залежить від методу руйнування клітин, наприклад, амінокислотний профіль змінюється після лужної обробки чи гомогенізації під високим тиском (Safi et al., 2014). Ефективність методів більшими контролюють мікроскопічними спостереженнями або порівнянням виходу компонентів до та після руйнування клітин.

**Білковий склад та амінокислотний профіль мікроводоростей, *C. vulgaris*.** Білки є компонентами мікроводоростей, зберігаючи роль у рості, відновленні клітин та захисту від зовнішніх агентів (Solomon et al., 1999). Загальний вміст білку в *C. vulgaris* складає 42–58 % сухої маси біомаси, змінюючись у зв'язку з умовами культивування (Becker, 1994). Білки клітин *C. vulgaris* поділяються на кілька категорій: 20 % зв'язано з клітинною стінкою, 50 % є внутрішньоклітинними, а 30 % мігрують у клітину і назад (Berliner, 1986). Молекулярна маса білків змінюється від 12 до 120 кДа, з найбільшим піком інтенсивності для клітин, вирощених в автотрофних умовах (Morris et al., 2008).

Амінокислотний профіль *C. vulgaris* є високоякісним і порівнянним з рекомендаціями ВООЗ та ФАО для харчування людини, оскільки водорості синтезують як замінні, так і незамінні амінокислоти (Becker, 1994). Білки *C. vulgaris* також мають високу емульгуючу здатність, що робить їх перспективними для застосування в харчовій промисловості. Емульгуючі білки, екстрагованих при рН 7, досягала 3 090 750 мл олії/г білку зі стабільністю 79–71 % (Ursu et al., 2014).

Екстракція білків мікроводоростей завершує солюбілізацію в лужному розчині, а подальше очищення може включати осадження за допомогою трихлороцтової або соляної кислоти (Safi et al., 2013). Інший метод розділення – ультрафільтрація, яку застосовували для *Tetraselmis suecica* (Safi et al., 2014), і її можна адаптувати для *C. vulgaris*. Кількість білків визначають за методів: К'ельдаля, Лоурі або Бредфорда, хоча деякі дослідники пропонують використання коригувальних коефіцієнтів для перерахунку азоту в білок (Diniz et al., 2011).

Визначення вмісту амінокислот також залежить від жорсткості клітинної стінки та умов вирощування, що ускладнює використання універсального коефіцієнта (López et al., 2010). Методи, такі як аналіз Лоурі, є точними для водорозчинних білків, хоча вони можуть не охопити всі амінокислоти (Barbarino & Lourenço, 2005).

**Ліпідний склад мікроводоростей, *C. vulgaris*.** Ліпіди – це гетерогенна група сполук, які розчиняються в неполярних розчинниках і мають важливе значення для мікроводоростей (Bajguz, 2000). У *C. vulgaris* вміст ліпідів може варіювати від 5 % до 40 % від сухої біомаси за оптимальних умов росту та складається в основному з гліколіпідів, фосфоліпідів, вуглеводнів, воску та невеликої кількості вільних жирних кислот (Hu et al., 2008). Ліпіди синтезуються хлоропластами та розміщуються на клітинних стінках і мембранах органел, таких як хлоропласти та мітохондрії. Під час стресових умов вміст ліпідів може досягати 58 %, у вигляді триацилгліцеринів (Becker, 1994), що накопичуються в цитоплазмі та міжтилакоїдному просторі хлоропластів (Hu et al., 2008).

Для виявлення накопичення ліпідів у клітинах *C. vulgaris* застосовують метод фарбування барвником Nile Red, що розглядається за допомогою флуоресцентного мікроскопа, та дає можливість оцінити інтенсивність накопичення ліпідів (Liu et al., 2008). Однак цей метод може бути неефективним через товсту клітинну стінку, що потребує попереднього руйнування клітин (Chen et al., 2011). Екстракція ліпідів можлива і шляхом методів Блая і Дайера, або за допомогою органічних розчинників, таких як гексан і петролейний ефір. Загальні ліпіди включають фосфоліпіди (PL), гліколіпіди (GL) і нейтральні ліпіди (NL), які фракціонуються через колонкову хроматографію (Olmstead et al., 2013).

Для екологічної екстракції пропонується використовувати надкритичний діоксид вуглецю (SC-CO<sub>2</sub>), що дає чисті екстракти без забруднення. Додавання етанолу або попереднє руйнування клітин може підвищити вихід екстракції, хоча це може вплинути на економічну ефективність (Dejoye et al., 2011).

Профіль жирних кислот варіюється в залежності від умов росту. За міксотрофних умов жирні кислоти складаються на 60–68 % із насичених і мононазованих жирних кислот, таких як пальмітинова (C16:0) та стеаринова (C18:0). Такий профіль є підходящим для виробництва біодизеля. В умовах, сприятливих для росту, жирні кислоти *C. vulgaris* утворюють більше поліненасичених жирних кислот, таких як лінолева (C18:2), ліноленова (C18:3) та ейкозапентаєнова (C20:5) кислоти, що робить їх корисними для харчових композицій (Stephenson et al., 2010).

**Вуглеводний склад мікроводоростей, *C. vulgaris*.** Вуглеводи в *C. vulgaris* представлені відновлювальними цукрами та полісахаридами, такими як крохмаль і целюлоза. Крохмаль є основним полісахаридом, розташованим у хлоропласті, складається з амілози та амілопектину і служить накопичувачем енергії для клітин. Целюлоза, що утворює захисний волокнистий бар'єр на клітинній стінці, є структурним полісахаридом з високою стійкістю. Крім того, іншим полісахаридом є  $\beta$ -1-3 глюкан, який має численні корисні властивості для здоров'я людини (Lordan et al., 2011).

Загальний вміст вуглеводів визначається за допомогою сірчано-фенольного методу, що дозволяє кількісно оцінити прості цукри після гідролізу при 110 °C, з використанням НРІС. Для крохмалю кращим є ферментативний метод, ніж кислотний (DuBois et al.,



1956). Під час обмеження вмісту азоту в поживному субстраті можна досягти вуглеводів в межах 12–55 % від сухої маси (Brányiková et al., 2011).

Клітинна стінка *C. vulgaris* складається з хітозано-подібного шару, целюлози, геміцелюлози, білків, ліпідів і мінералів (Northcote et al., 1958; Janczyk et al., 2007). Вуглеводневий склад клітинної стінки включає рамнозу, галактозу, глюкозу, ксилозу, арабінозу та манозу, причому рамноза є домінуючим цукром (Ogawa et al., 1999).

**Пігменти отримані з мікроводоростей *C. vulgaris*.** Основним пігментом у *C. vulgaris* є хлорофіл, який може складати 1–2 % сухої маси і знаходиться в тилакоїдах. Мікроводорості також складають значну кількість каротиноїдів, які діють як додаткові пігменти, вловлюючи світло; зокрема,  $\beta$ -каротин зв'язується з крапельками ліпідів у хлоропластах, а первинні каротиноїди з хлорофілом у тилакоїдах. Вони передають енергію у фотосистему та забезпечують роль фотопротекторів, захищаючи хлорофіл від деградації під час інтенсивного впливу радіації та кисню (Solomon et al., 1999). Ці пігменти мають численні терапевтичні властивості, зокрема антиоксидантну активність, захист проти дегенерації сітківки, регуляцію холестерину, профілактику серцево-судинних захворювань і раку товстої кишки, а також зміцнення імунної системи (Gouveia et al., 2005).

Феофітини, біохімічно подібні до хлорофілу, локалізуються при розпаді хлорофілу в умовах росту або стресу і є ліпофільними, тому їх екстракція пов'язана із залученням ліпідів. Оптимізація процесу екстракції пігментів, створених за допомогою різних розчинників (диметилформамід, дихлорметан, ацетон, гексан, етанол), на апараті Сокслета, ультразвукової екстракції та рідинної екстракції під тиском (PLE), що забезпечують одночасне вилучення каротиноїдів і хлорофілу при мінімізації утворення феофітинів (Gors et al., 2009; Cha et al., 2010). Для посилення відновлення каротиноїдів потрібно екстракцію SC-CO<sub>2</sub> за умов 35 МПа і 40–55 °С, що дає чисті, прозорі екстракти (Cha et al., 2010). Додатково для підвищення виходу екстракції додають етанол. Пігменти кілька разів за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) і спектрофотометрії (Ritchie, 2006).

**Мінеральний та вітамінний склад мікроводоростей *C. vulgaris*.** Мінерали в *C. vulgaris* визнаються через спалювання біомаси та наступну атомно-абсорбційну спектрофотометрію зразків. Вони мають важливі функції в організмі людини, зокрема калій, який важливий для регуляції внутрішньоклітинної рідини, вуглеводного обміну та нервових імпульсів, а також використовується в якості добрива (KCl, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>). Магній підтримує нормальну нервову діяльність та скорочення м'язів, дефіцит якого може призвести до депресії. Цинк бере участь в метаболізмі, включаючи синтез вуглеводів, ліпідів і білків, а також захищає від окислювальних процесів (Solomon et al., 1999).

*C. vulgaris* містить вітаміни, зокрема водорозчинні (групи С і В) та жиророзчинні (А, D, Е і К). Вітамін А підтримує ріст клітин, вітаміни Е і С мають антиоксидантну активність, покращують кровообіг і функції

м'язів (Becerra et al., 1999). Вітаміни групи В сприяють активності ферментів у метаболізмі, утворенні та трансформації еритроцитів, сприяють зниженню ризику виникнення раку підшлункової залози та підтримують здоров'я шкіри, волосся та м'язів (Brown et al., 1997). Концентрація вітамінів чутлива до умов культивування: максимальна досягається при автотрофному рості з 10 % CO<sub>2</sub>, але в гетеротрофних умовах вміст вітамінів вищий за рахунок присутності глюкози в середовищі, що використовується як джерело вуглецю (Hanan, 2011).

**Застосування *C. vulgaris* в енергетиці.** Зростання попиту в енергоресурсах посилює екологічні виклики. Третє покоління біопалива з водоростей, зокрема мікроводоростей, є перспективною альтернативою традиційним культурам (соя, кукурудза, ріпак), оскільки не конкурує з виробництвом продовольства, і не потребує використання орних земель (Singh et al., 2011). Хоча собівартість біопалива з водоростей залишається високою, їх продуктивність значно перевищує традиційні сільськогосподарські культури (до 10–20 разів більше олії за короткий період).

*C. vulgaris*, за міксотрофного вирощування накопичує значну кількість ліпідів, має жирноокислювальний профіль, який підходить для біодизелю. Його властивості відповідають міжнародним стандартам (ASTM 6751, EN 14214, ANP 255). Залишки після вилучення ліпідів утворюють білки й вуглеводи, які використовують виробництва для біоолії та біовугілля методом піролізу, забезпечуючи до 94 % відновлення енергії. Однак висока кількість азоту в біоолії знижує його якість (Francisco et al., 2010).

Крохмаль, що міститься в *C. vulgaris* також придатний для виробництва біоетанолу, із конверсією 65 % після оцукрювання та ферментації (Hirano et al., 1997). Альтернативою є гідротермальне зрідження, яке дозволяє виробляти біопаливо з усієї біомаси, підвищуючи енергетичну цінність на 10–15 % (Ross et al., 2010). Оптимальні умови цього процесу: 300–350 °С і 150–200 бар.

Основними перешкодами до комерціалізації біопалива з водоростей є висока собівартість виробництва, включаючи інфраструктуру, добрива, збирання, сушіння, транспортування (Clarens et al., 2010). Аналіз життєвого циклу показує, що для досягнення конкурентоспроможності та стійкості необхідне зниження енергетичних витрат (Lardon et al., 2009).

**Використання *C. vulgaris* в раціонах харчування людини.** *C. vulgaris* є поширеною мікроводоростою, що використовується як харчова добавка, барвник (після каротиногенезу) та емульгатор (Fernandes et al., 2012). Вона доступна в складі капсул, таблеток, екстрактів і порошку (Yamaguchi, 1996). Попри високу харчову цінність, що включає багатство білків, ліпідів, полісахаридів, пігментів і вітамінів, *C. vulgaris* фактично розглядається як добавка, а не основний харчовий продукт. Це обумовлено відсутністю єдиного законодавчого регулювання якості та вимог до мікроводоростей (Grobbelaar, 2003).

Також екстракти *C. vulgaris* демонструють консервуючу активність, що підвищує ефективність синтетичних антиоксидантів, таких як бутильований гідро-

ксіанізол і бутильований гідрокситолуол (Rodriguez-Garcia & Guil-Guerrero, 2008).

***C. vulgaris* як компонент корму для тварин.** Близько 30 % продукції з мікроводоростей використовується у виробництві кормів для тварин через зростання попиту на натуральні компоненти замість синтетичних інгредієнтів. Дослідження підтверджують, що *C. vulgaris*, має багатий білковий склад, а накопичуючи каротиноїди в умовах стресу, сприяє пігментації м'яса риб та жовтків яєць у птиці, а також покращує здоров'я і тривалість життя тварин (Gouveia et al., 1996; Becker, 2007).

Крім того, *C. vulgaris* має захисну дію проти шкідливих речовин, таких як важкі метали (Плюмбум, Кадмій) та нафталін. Вона значно знижує окислювальний стрес і антиоксидантну активність у тварин підвищуючи природну резистентність (Shim et al., 2008).

**Роль *C. vulgaris* в очищених стічних вод.** Дослідження підтверджують значний потенціал *C. vulgaris* у біоремедіації: вона здатна фіксувати до 74 % CO<sub>2</sub>, поглинати 45–97 % Нітрогену, 28–96 % Фосфору та знижувати використання Оксигену на 61–86 % при очищенні різних типів стічних вод (текстильних, сільськогосподарських, каналізаційних тощо) (de-Bashan et al., 2002; Brennan & Owende, 2010). Ця мікроводорість ефективно видаляє азот, фосфор, важкі метали та патогени, використовуючи їх для її росту, що робить її економічно привабливою для одночасного очищення води та виробництва біомаси. *C. vulgaris* демонструє високу продуктивність при спільній іммобілізації в альгінатних культурах, що стимулює ріст бактерій і покращує видалення до 100 % амонію за 48 годин (4 цикли) та 83% Фосфору за один цикл (de-Bashan et al., 2002). Завдяки своїм властивостям, *C. vulgaris* є однією з найефективніших мікроводоростей для очищення стічних вод (González et al., 1997).

**Агрохімічне застосування *C. vulgaris* у рослинництві.** Екстракти *C. vulgaris* утворюють речовини, що стимулюють ріст рослин, включаючи регулятори росту, вітаміни, амінокислоти, антибактеріальні та протигрибкові сполуки, які покращують біоконтроль та продуктивність рослин. Використовуючи екстракти з *C. vulgaris* в якості біостимуляторів покращується ріст багатьох рослин завдяки високому вмісту в них нітрогенази, нітратредуктази та мінералів (Ordog, 1999).

Дослідження позакореневого застосування екстракту *C. vulgaris* для пшениці (*Triticum aestivum*) показало, що обприскування 50 % розчином екстракту через 25 днів після посіву збільшило врожайність на 140 % та масу зернин на 40 % (Shaaban, 2001). У дослідженнях з *Lactuca sativa* додавання мікроводоростей до водного середовища сприяло зростанню біомаси та вмісту пігментів у продукції, причому найкращі результати досягалися при концентрації 2–3 г сухих водоростей на 1 л води (Faheed & Fattah, 2008). Ці дослідження підтверджують ефективність водної суспензії *C. vulgaris* як комерційного біодобрива.

**Концепція виробництва енергоресурсів за використання *C. vulgaris*.** Біомаса мікроводоростей може бути використана для отримання біоводню

шляхом прямого або непрямого фотолізу води, а також за допомогою темного бродиння, яке супроводжується утворенням водню та летких жирних кислот. Виробництво водню залежить від таких чинників, як співвідношення вуглецю до азоту, рН, температура, умови культивування, методи попередньої обробки та вид мікроводоростей. Зокрема, для цієї мети широко застосовують *Chlorella*. Світло сприяє збільшенню біомаси мікроводоростей, причому фіолетове світло відіграє важливу роль у цьому процесі. Крім того, ефективність виробництва біоводню залежить від інтенсивності освітлення, активності ферментів і здатності фіксувати CO<sub>2</sub>. Отже, *C. vulgaris* з усім його біологічним потенціалом білки, вуглеводи, ліпіди, пігменти, мінеральні речовини та вітаміни заслуговує на глибоку наукову увагу (Naik et al., 2010). Біомаса мікроводоростей також може бути використана для отримання біодизеля, який складається з метилових ефірів жирних кислот, отриманих шляхом переестерифікації олій із спиртами. Мікроводорості, вирощені в стічних водах, накопичують ліпіди, придатні для цього процесу. Основними етапами виробництва біодизеля є культивування, сушіння, екстракція олій і подальша переестерифікація до метилових ефірів жирних кислот. Для екстракції використовують різні методи, зокрема екстракцію розчинником, ультразвукову та ферментативну екстракцію. Під час процесу переестерифікації тригліцериди або жирні кислоти взаємодіють зі спиртами, такими як метанол, етанол, бутанол чи аміловий спирт. Метанол і етанол найчастіше застосовуються через їхню низьку вартість і доступність. Крім того, клітини мікроводоростей здатні взаємодіяти з різними нано- та мікрочастинками. Зокрема, металеві наночастинки, такі як ферит міді (CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), часто використовуються як опора для іммобілізації ферментів (Peter et al., 2021; Rajesh Banu et al., 2021).

## Висновки

Цей огляд розкриває широкий потенціал і переваги *C. vulgaris*, а також висвітлює її технологічні властивості, базуючись на вже проведених наукових дослідженнях. *C. vulgaris* легко культивується на простих і економічних поживних середовищах із оптимізованими умовами, що забезпечують швидке зростання порівняно з наземними енергетичними культурами, а також високу продуктивність біомаси. Водночас витрати на промислове виробництво та обробку залишаються значними, вимагаючи залучення висококваліфікованих фахівців для ефективної конкуренції на ринку. Незважаючи на це, за останнє десятиліття було досягнуто значних технологічних проривів, і прогнозується, що біотехнологічна галузь із використанням мікроводоростей значно розшириться найближчим часом. Завдяки своїм унікальним біологічним властивостям, мікроводорість *C. vulgaris* викликає великий інтерес у біотехнологів, що робить її перспективним об'єктом для подальших досліджень і ключовим компонентом біоіндустрії майбутнього.



## Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

## References

- Atkinson, A. W., Jr, Gunning, B. E., & John, P. C. (1972). Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of (14)C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta*, 107(1), 1–32. DOI: 10.1007/BF00398011.
- Bajguz, A. (2000). Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol Biochem*, 38(3), 209–215. DOI: 10.1016/S0981-9428(00)00733-6.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2002). *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical reviews in biotechnology*, 22(3), 245–279. DOI: 10.1080/07388550290789513.
- Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *J Appl Phycol*, 17, 447–460. DOI: 10.1007/s10811-005-1641-4.
- Becerra, G., Menolasina, S., & Salvador, A. (1999). Supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography of Vitamin E in pharmaceutical preparations. *J High Resolut Chromatogr*, 22(5), 300–302. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4168(19990501)22:5%3C300::AID-JHRC300%3E3.0.CO;2-E.
- Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge; New York: Cambridge University Press.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207–210. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- Beijerinck, M. (1890). Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Ztg*, 48, 729.
- Berliner, M. D. (1986). Proteins in *Chlorella vulgaris*. *Microbios*, 46, 199–203.
- Biedlingmaier, S., Wanner, G., & Schmidt, A. (1987). A Correlation between Detergent Tolerance and Cell Wall Structure in Green Algae. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42, 245–250. DOI: 10.1515/znc-1987-0313.
- Brányiková, I., Mašálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and bioengineering*, 108(4), 766–776. DOI: 10.1002/bit.23016.
- Brasier, M. D., Green, O. R., Jephcoat, A. P., Kleppe, A. K., Van Kranendonk, M. J., Lindsay, J. F., Steele, A., & Grassineau, N. V. (2002). Questioning the evidence for Earth's oldest fossils. *Nature*, 416(6876), 76–81. DOI: 10.1038/416076a.
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sustain Energy Rev*, 14, 557–577. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.009.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315–331.
- Burlew, J. S. (1953). *Algal culture from laboratory to pilot plant*. Washington DC: Carnegie Institution of Washington. DOI: 10.1093/aibsbulletin/3.5.11.
- Cha, K. H., Kang, S. W., Kim, C. Y., Um, B. H., Na, Y. R., & Pan, C. H. (2010). Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 4756–4761. DOI: 10.1021/jf100062m.
- Chang, Y.-R., & Lee, D.-J. (2012). Coagulation–membrane filtration of *Chlorella vulgaris* at different growth phases. *Dry Technol*, 30, 1317–1322.
- Chen, W., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource technology*, 102(1), 135–141. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.076.
- Cheng, Y. L., Juang, Y. C., Liao, G. Y., Ho, S. H., Yeh, K. L., Chen, C. Y., Chang, J. S., Liu, J. C., & Lee, D. J. (2010). Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 101(23), 9092–9096. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.07.016.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294–306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Clarens, A. F., Resurreccion, E. P., White, M. A., & Colosi, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental science & technology*, 44(5), 1813–1819. DOI: 10.1021/es902838n.
- Dalton, R. (2002). Microfossils: squaring up over ancient life. *Nature*, 417, 782–784. DOI: 10.1038/417782a.
- de-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. (2005). Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology ecology*, 54(2), 197–203. DOI: 10.1016/j.femsec.2005.03.014.
- de-Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K., & Bustillos, J. J. (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian journal of microbiology*, 48(6), 514–521. DOI: 10.1139/w02-051.
- de-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water research*, 36(12), 2941–2948. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00522-x.
- Degen, J., Uebele, A., Retze, A., Schmid-Staiger, U., & Trösch, W. (2001). A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of biotechnology*, 92(2), 89–94. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00350-9.
- Dejoye, C., Vian, M. A., Lumia, G., Bouscarle, C., Charton, F., & Chemat, F. (2011). Combined extraction processes of lipid from *Chlorella vulgaris* microalgae: microwave prior to supercritical carbon dioxide

- extraction. International journal of molecular sciences, 12(12), 9332–9341. DOI: 10.3390/ijms12129332.
- Diniz, G., Barbarino, E., Oiano-Neto, J., Pacheco, S., & Lourenço, S. (2011) Gross Chemical Profile and Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Five Tropical Seaweeds. American Journal of Plant Sciences, 2, 287–296. DOI: 10.4236/ajps.2011.23032.
- Divakaran, R., & Sivasankara Pillai, V. (2002). Flocculation of algae using chitosan. Journal of Applied Phycology 14, 419–422. DOI: 10.1023/A:1022137023257.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 28(3), 350–356. URL: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac60111a017>.
- Faheed, F., & Fattah, Z. A. (2008). Effect of *Chlorella vulgaris* as bio-fertilizer on growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant. J Agric Soc Sci, 4, 165–169.
- Fernandes, B., Dragone, G., Abreu, A.P. et al. (2012). Starch determination in *Chlorella vulgaris*—a comparison between acid and enzymatic methods. J Appl Phycol, 24, 1203–1208. DOI: 10.1007/s10811-011-9761-5.
- Francisco, É. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., Franco, T. T. (2010). Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. J Chem Technol Biotechnol, 85(3), 395–403. DOI: 10.1002/jctb.2338.
- Frappart, M., Massé, A., Jaffrin, M. Y., Pruvost, J., & Jaouen, P. (2011). Influence of hydrodynamics in tangential and dynamic ultrafiltration systems for microalgae separation. Desalination, 265(1-3), 279–283. DOI: 10.1016/j.desal.2010.07.061.
- Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., & Melis, A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. Trends in biotechnology, 18(12), 506–511. DOI: 10.1016/s0167-7799(00)01511-0.
- González, L. E., Cañizares, R. O., & Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresour Technol, 60(3), 259–262. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00029-1.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J-P. (2012). Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: focus on cultivation and biofuel production. Biofuel Bioprod Biorefin, 6(1), 105–113. DOI: 10.1002/bbb.338.
- Gors, M., Schumann, R., Hepperle, D., & Karsten, U. (2009). Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. J Appl Phycol, 22, 265–276. DOI: 10.1007/s10811-009-9455-4.
- Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A.P., Sousa, I., & Empis, J. (2005). *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. Eur Food Res Technol, 222, 362–367. DOI: 10.1007/s00217-005-0105-z.
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., & Empis, J. (1996). *Chlorella vulgaris* used to colour egg yolk. J Sci Food Agric, 70(2), 167–172. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199602)70:2%3C167::AID-JSFA472%3E3.0.CO;2-2.
- Grobelaar, J. U. (2003). Quality Control and Assurance: crucial for the sustainability of the applied phycology industry. J Appl Phycol, 15, 209–215. DOI: 10.1023/A:1023820711706.
- Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. Eur J Phycol, 37(2), 217–226. DOI: 10.1017/S0967026202003669.
- Hanan, M. K. (2011). Comparative effects of autotrophic and heterotrophic growth on some vitamins, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, amino acids and protein profile of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Afr J Biotechnol, 10, 13514–13519.
- Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S., & Ogushi, Y. (1997). CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. Energy, 22(2-3), 137–142. DOI: 10.1016/S0360-5442(96)00123-5.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The Plant journal : for cell and molecular biology, 54(4), 621–639. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03492.x.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and microbial technology, 27(8), 631–635. DOI: 10.1016/s0141-0229(00)00266-0.
- Janczyk, P., Franke, H., Souffrant, W. B. (2007). Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. Anim Feed Sci Technol, 132(1-2), 163–169. DOI: 10.1016/j.anifeeds.2006.03.007.
- Justo, G. Z., Silva, M. R., & Queiroz, M. L. (2001). Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. Immunopharmacology and immunotoxicology, 23(1), 119–132. DOI: 10.1081/iph-100102573.
- Kapaun, E., & Reisser, W. (1995). A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae). Planta, 197, 577–582. DOI: 10.1007/BF00191563.
- Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., et al. (2009). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. J Chem Technol Biotechnol, 84(5), 657–661. DOI: 10.1002/jctb.2096.
- Kojima, E., & Zhang, K. (1999). Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors. Journal of bioscience and bioengineering, 87(6), 811–815. DOI: 10.1016/s1389-1723(99)80158-3.
- Kuchitsu, K., Oh-hama, T., Tsuzuki, M., & Miyachi, S. (1987). Detection and characterization of acidic compartments (vacuoles) in *Chlorella vulgaris* 11 h cells by <sup>31</sup>P-in vivo NMR spectroscopy and

- cytochemical techniques. Arch Microbiol, 148, 83–87. DOI: 10.1007/BF00425353.
- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. Environ Sci Technol, 43, 6475–6481. DOI: 10.1021/es900705j.
- Lebsky, V. K., Gonzalez-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2001). Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Canadian journal of microbiology, 47(1), 1–8. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15049443>.
- Lee, D. J., Liao, G. Y., Chang, Y. R., & Chang, J. S. (2012). Coagulation-membrane filtration of *Chlorella vulgaris*. Bioresource technology, 108, 184–189. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.098.
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Bioresource technology, 101 Suppl 1, S75–S77. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.03.058.
- Lee, R. E. (2008). Phycology. 4th ed. Cambridge, England; New York: Cambridge University Press.
- Lee, Y.-K. (2001). Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. J Appl Phycol, 13, 307–315. DOI: 10.1023/A:1017560006941.
- Leupold, M., Hindersin, S., Gust, G., Kerner, M., & Hanelt, D. (2013). Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. J Appl Phycol, 25, 485–495. DOI: 10.1007/s10811-012-9882-5.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnology letters, 31(7), 1043–1049. DOI: 10.1007/s10529-009-9975-7.
- Liu, Z. Y., Wang, G. C., & Zhou, B. C. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Bioresource technology, 99(11), 4717–4722. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.073.
- López, C. V., García, M.delC., Fernández, F. G., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. Bioresource technology, 101(19), 7587–7591. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.077.
- Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. Marine drugs, 9(6), 1056–1100. DOI: 10.3390/md9061056.
- Martínez, F., Ascaso, C., & Orús, M. I. (1991). Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. Ann Bot, 67(3), 239–245. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a088128.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Cacetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew Sustain Energy Rev, 14(1), 217–232. DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Morris, H. J., Almarales, A., Carrillo, O., & Bermúdez, R. C. (2008). Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. Bioresource technology, 99(16), 7723–7729. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.01.080.
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. Water research, 40(15), 2799–2815. DOI: 10.1016/j.watres.2006.06.011.
- Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. Renew Sustain Energy Rev, 14(2), 578–597. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.003.
- Northcote, D. H., Goulding, K. J., & Horne, R. W. (1958). The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. The Biochemical journal, 70(3), 391–397. DOI: 10.1042/bj0700391.
- Ogawa, K., Ikeda, Y., & Kondo, S. (1999). A new trisaccharide,  $\alpha$ -D-glucopyranuronosyl-(1-3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- $\alpha$ -L-rhamnopyranose from *Chlorella vulgaris*. Carbohydr Res, 321(1-2), 128–131. DOI: 10.1016/S0008-6215(99)00176-7.
- Olmstead, I. L., Hill, D. R., Dias, D. A., Jayasinghe, N. S., Callahan, D. L., Kentish, S. E., Scales, P. J., & Martin, G. J. (2013). A quantitative analysis of microalgal lipids for optimization of biodiesel and omega-3 production. Biotechnology and bioengineering, 110(8), 2096–2104. DOI: 10.1002/bit.24844.
- Ordog, V. (1999). Beneficial effects of microalgae and cyanobacteria in plant/soil- systems, with special regard to their auxin-and cytokinin-like activity. In: Proceedings of the international workshop and training course on microalgal biology and biotechnology. Mosonmagyaróvár, Hungary, 13–26.
- Peter, A. P., Khoo, K. S., Chew, K. W., Ling, T. C., Ho, S. H., Chang, J. S., & Show, P. L. (2021) Microalgae for biofuels, wastewater treatment and environmental monitoring. Environ Chem Lett, 19(4), 2891–2904. DOI: 10.1007/s10311-021-01219-6.
- Rajesh Banu, J., Ginni, G., Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Adish Kumar, S., Bhatia, S. K., et al (2021). Integrated biorefinery routes of biohydrogen: Possible utilization of acidogenic fermentative effluent. Bioresour Technol, 319, 124241. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124241.
- Ritchie, R. J. (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynthesis research, 89(1), 27–41. DOI: 10.1007/s11120-006-9065-9.
- Rodríguez-García, I., & Guil-Guerrero, J. L. (2008). Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. Food chemistry, 108(3), 1023–1026. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.059.
- Ross, A. B., Biller, P., Kubacki, M. L., Li, H., Lea-Langton, A., Jones, J. M. (2010). Hydrothermal processing of microalgae using alkali and organic acids. Fuel, 89(9), 2234–2243. DOI: 10.1016/j.fuel.2010.01.025.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-García, C., & Pontalier, P.-Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. J Appl Phycol, 25, 523–529.



- DOI: 10.1007/s10811-012-9886-1.
- Safi, C., Charton, M., Ursu, A.V., Laroche, C., Zebib, B., Pontalier, P.-Y., et al. (2014). Release of hydro-soluble microalgal proteins using mechanical and chemical treat- ments. *Algal Res*, 3, 55–60. DOI: 10.1016/j.algal.2013.11.017.
- Safi, C., Liu, D., Yap, B.J., Martin, G. O., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P.-Y. (2014). A two-stage ultrafiltration process for separating multiple components of *Tetraselmis suecica* after cell disruption. *J Appl Phycol*, 26, 2379–2387. DOI: 10.1007/s10811-014-0271-0.
- Sano, T., Kumamoto, Y., Kamiya, N., Okuda, M., & Tanaka, Y. (1988). Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats. *Artery*, 15(4), 217–224. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3136759>.
- Shaaban, M. (2001). Green microalgae water extracts as foliar feeding to wheat plants. *Pak J Biol Sci*, 4(6), 628–632. DOI: 10.3923/pjbs.2001.628.632.
- Shim, J. Y., Shin, H. S., Han, J. G., Park, H. S., Lim, B. L., Chung, K. W., & Om, A. S. (2008). Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats. *Journal of medicinal food*, 11(3), 479–485. DOI: 10.1089/jmf.2007.0075.
- Singh, A., Nigam, P. S., & Murphy, J. D. (2011). Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresource technology*, 102(1), 10–16. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.032.
- Solomon, E. P., Berg, L. R., & Martin, D. W. (1999). *Biology*. 5th ed.. Fort Worth: Saunders College Publishing.
- Souza Queiroz, J., Barbosa, C. M. V., da Rocha, M. C., Bincoletto, C., Paredes-Gamero, E. J., de Souza Queiroz, M. L., & Palermo Neto, J. (2013). *Chlorella vulgaris* treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis. *Brain, behavior, and immunity*, 29, 39–50. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.12.001.
- Stephenson, A. L., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2010). Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*, 1(1), 47–58. DOI: 10.4155/bfs.09.1.
- Ursu, A. V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 157, 134–139. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.071.
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource technology*, 105, 114–119. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.105.
- Venkataraman, L. V. (1997). *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell Biology and biotechnology. *J Appl Phycol*, 9, 295–296.
- Yamaguchi, K. (1996). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *J Appl Phycol*, 8, 487–502. DOI: 10.1007/BF02186327.
- Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of plant research*, 117(4), 257–264. DOI: 10.1007/s10265-004-0154-6.
- Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource technology*, 105, 120–127. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.103.
- Yvonne, N., & Tomas, K. (2000). Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Arch Hydrobiol*, 100, 95–105. DOI: 10.1127/algol\_stud/100/2000/95.
- Zhang, K., Miyachi, S., & Kurano, N. (2001). Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(4), 428–433. DOI: 10.1007/s002530000550.