

Получение экстрактов косметического назначения из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*

Бутова Светлана Николаевна

доктор биологических наук, профессор

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, город Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: vbutov@bk.ru

Щеголева Ирина Дмитриевна

кандидат технических наук, доцент

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, город Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: shegoleva.mgupp@yandex.ru

Тхоржевская Кристина Александровна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, город Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: thorgevskaycrisna@gmail.com

В настоящее время наблюдается устойчивая тенденция увеличения ассортимента косметических продуктов, обогащенных биологически активными веществами, поиск новых природных косметических ингредиентов. Одним из перспективных сырьевых ресурсов этого направления может быть микроводоросль *Chlorella Vulgaris*. Биомасса микроводоросли содержит полноценный белок – до 60% с.в., полиненасыщенные жирные кислоты, витамины группы В, витамин С, β -каротин, микроэлементы и т.д. Наиболее эффективно можно использовать этот природный комплекс в форме экстрактов. Однако значительным препятствием для процесса экстракции является сложная многослойная структура клеточной стенки микроводоросли. Целью данной работы была разработка технологии получения экстрактов косметического назначения из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*. В исследованиях использовали образец микроводоросли *Chlorella Vulgaris*, производимый НПБК «Дело», Россия. Было изучено разрушение клеточной стенки микроводоросли (до начала экстракции) ферментными гидролитическими препаратами разного типа. Наибольший результат по выходу экстрактивных веществ был получен при действии комбинации ферментов целлюлазы, пектиназы, протеиназы. Было рассмотрено влияние на процесс экстракции следующих технологических параметров: соотношение сырье:экстрагент, продолжительность и температура экстракции, тип экстрагента. Величину экстракции оценивали по выходу водорастворимой белковой фракции – она составляла большую часть экстрактивных веществ. При анализе влияния разных факторов на экстракцию водорастворимой белковой фракции было установлено преобладающее значение предварительной ферментативной обработки микроводоросли, роль параметров экстракции была выражена в меньшей степени. В результате работы определены технологические режимы получения водных и водно-глицериновых экстрактов из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*: гидромодуль 1:45, температура 25–40 °С, продолжительность экстракции 1 ч. Разработаны рецептуры косметических продуктов на основе новых природных экстрактов.

Ключевые слова: микроводоросль *Chlorella Vulgaris*, природное биологическое сырье, режимы экстракции, ферментные препараты, водные и глицериновые экстракты

В последние годы интерес к микроводоросли *Chlorella Vulgaris* был связан, в основном, с ее использованием в производстве биодизельного топлива, а также кормов для животноводства (Богданов, 2002; Богданов, 2007; Михеева, 2018). Биомасса этого природного сырья представляет собой ценный источник белков, углеводов, витаминов, полиненасыщенных жирных кислот, минеральных веществ, пигментов. По данным, которые приводит Богданов Н.И. (Богданов, 2007),

содержание белков в хлорелле может достигать 60% с.в. В белках представлены все незаменимые аминокислоты. Имеются также липиды, витамины группы В, витамин С, β -каротин, хлорофилл, флавоноиды, разнообразные микроэлементы – кобальт, никель, марганец, цинк, железо, иод и др. При этом хлорелла не образует токсичных метаболитов или продуктов распада. Уникальное сочетание биологически активных веществ микроводоросли может найти применение в

косметической продукции. Некоторые разработки в этом направлении известны (Бутова, 2017; Бутова, Тхоржевская, 2017). Однако доступность комплекса БАВ хлореллы ограничена особенностями строения ее клетки.

Chlorella Vulgaris представляет собой одноклеточную пресноводную микроводоросль сферической формы с размером от 2 до 10 мкм. Клеточная стенка хлореллы имеет сложное строение. Наружный трехслойный компонент стенки образован двумя электронно-плотными зонами, между которыми находится электронно-прозрачная центральная зона. Эта часть клеточной стенки содержит спорополнения – вещество устойчивое к действию ферментов. Внутренний, более толстый слой стенки образован целлюлозными микрофибриллами. Завершает эту конструкцию цитоплазматическая мембрана (Аутжанова, 2014). В результате прочная клеточная стенка защищает сконцентрированные в хлорелле ценные вещества, препятствуя их извлечению и использованию. Трудоемкий процесс разрушения клеточной стенки ограничивает широкое применение хлореллы в косметической продукции.

В настоящее время известно несколько способов разрушения клеточной стенки микроводоросли. Используют механическое, ультразвуковое, термическое, биохимическое и другие типы воздействий (Бутова, Тхоржевская, 2017; Альбицкая, 1995; Березин, 2012). Из материалов, представленных в научной литературе, можно сделать вывод о том, что наиболее перспективным для выделения БАВ из хлореллы является ферментативный способ разрушения ее клеточной структуры. Анализ литературных данных показал, что для разрушения клеточной стенки хлореллы авторы применяли преимущественно препараты целлюлолитических и протеолитических ферментов. Этому предшествовало мощное механическое воздействие на клетку, а в завершении ферментативных реакций – тепловое воздействие, которое также служило для инактивации ферментов (Альбицкая, 1995; Березин, 2012). Такая комбинация приводила к увеличению выхода экстрактивных веществ, однако не гарантировала сохранения активности выделяемых химических соединений, что особенно важно для косметической продукции.

Большую роль в извлечении химических компонентов из сырья играют условия экстракции, а именно: соотношение сырье:экстрагент, продолжительность и температура экстракции, тип экстрагента. Правильно подобранные параметры экстракции позволяют достигнуть высокой степени

извлечения биологически активных веществ, при сохранении их структуры и действия, что имеет большое значение для получения косметических экстрактов.

Целью работы является разработка технологии экстрактов косметического назначения из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*.

Материалы и методы

Объектом исследования был порошок микроводоросли *Chlorella Vulgaris*. Проведен сравнительный анализ промышленных порошкообразных образцов микроводоросли от разных производителей: C'est Si Bon Company, США; ООО НПК «Дело», Россия; Suzhou Vitajoy Bio-TechCo., LTD, Китай; Taiwan Chlorella Manufacturing Company (TCMC), Тайвань. Выбор сырья для получения экстрактов осуществляли на основании анализа биохимических показателей. В образцах микроводоросли определяли: количество азота – методом Несслера (Государственная фармакопея СССР, 1990) с расчетом белка по белковому коэффициенту 6,25; количество жира – методом Фолча (Соловьев, Северин, 1989), клетчатку – методом Кюршнера и Ганака (Сахарова, Щеголева, Казаков, 1996). Спектрофотометрическими методами оценивали содержание хлорофилла (Росгидромет, 2013), β -каротина (Первушкин, Маркова, Куркин, Желонкин, 2013), витамина В₁₂ (Государственная фармакопея РФ, 2015).

При разработке технологии получения экстрактов из микроводоросли *Chlorella Vulgaris* решали проблему максимального извлечения биологически активных веществ и сохранности их свойств. С этой целью клеточную стенку микроводоросли разрушали действием ферментных препаратов разного типа: №1 включал целлюлазу, пектиназу, протеиназу; №2 – лизоцим; №3 – целлюлазу; №4 – пектиназу и амилазу. Ферментативный гидролиз проводили 1 ч при температуре 45°C, гидролизированный продукт высушивали до концентрации сухих веществ 50%, затем переходили к экстракции.

При выборе рациональных условий экстракции были изучены следующие параметры: гидромодуль (соотношение сырье:экстрагент), продолжительность и температура экстракции, тип экстрагента. С точки зрения процесса экстракции химические вещества хлореллы приближенно можно разделить на две группы – водорастворимые и жирорастворимые. К первой группе относятся белковые вещества и продукты их гидролиза, а также некоторые водорастворимые витамины,

соли, БАВ. Во вторую группу входят хлорофилл, некоторые витамины и БАВ. Данное исследование посвящено получению преимущественно водных экстрактов, поэтому контроль качества экстрактов проводили по содержанию в них белка, определяемому методом Лоури (Соловьев, Северин, 1989).

Опыты проводили в трехкратной повторяемости. Статистическую обработку данных анализа осуществляли с помощью программы MS Excel 2007.

Результаты исследования

Результаты анализа биохимических показателей образцов микроводоросли *Chlorella Vulgaris* от разных производителей показали преимущество химического состава образца ООО НПК «Дело», Россия, – он содержал наибольшее количество белка, каротиноидов и витамина В₁₂, а также имел высокие показатели по хлорофиллу. Данный образец микроводоросли *Chlorella Vulgaris* был взят для дальнейших исследований. Химический состав образца микроводоросли *Chlorella Vulgaris* от ООО НПК «Дело» представлен в Табл. 1.

Таблица 1

Химический состав образца микроводорос-ли *Chlorella Vulgaris* ООО НПК «Дело», Россия

Химические соединения	Содержание химических соединений в образце микроводоросли <i>Chlorella Vulgaris</i> , %
Белок	48,5
Хлорофилл	3,58
Жиры	4,82
Каротиноиды	0,15
Витамин В12 (мкг/г)	0,019
Клетчатка	14,0
Гемицеллюлозы	12,2
Вода	9,90

Задачами первого этапа работы были определение композиции ферментов для разрушения клеточной стенки хлореллы, а также количества экстрагента, необходимого для извлечения из нее водорастворимых веществ. До начала экстракции на образец хлореллы действовали ферментными препаратами (ф.п.) разного типа. Ферментативный гидролиз проводили 1 ч при температуре 45°C, гидролизированный продукт высушивали до концентрации сухих веществ 50%, затем переходили к экстракции. Влияние гидромодуля на эффективность извлечения БАВ определяли изменением соотношения сырье: экстрагент в интервале 1:30–1:50.

Экстракцию проводили дистиллированной водой с температурой 25°C в течение 1 ч. В завершении процесса экстракт отделяли центрифугированием при скорости 1000 об/мин. Поскольку основным водорастворимым соединением хлореллы является белок, в центрифугате определяли суммарную концентрацию белков и продуктов их гидролиза методом Лоури. Рассчитывали выход белка из микроводоросли в процентах по отношению к его исходному содержанию в образце (Табл. 2).

Таблица 2

Влияние ферментных препаратов и соотношения сырье:экстрагент на выход белка в экстракт из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*

Сырье	Выход белка в экстракт, %, при соотношении сырье: экстрагент:*				
	1:30	1:35	1:40	1:45	1:50
<i>Chlorella Vulgaris</i> + ф.п. №1	30,6	31,2	31,9	32,7	31,6
<i>Chlorella Vulgaris</i> + ф.п. №2	18,1	19,4	20,7	21,5	21,4
<i>Chlorella Vulgaris</i> + ф.п. №3	22,4	22,5	24,7	25,4	25,1
<i>Chlorella Vulgaris</i> + ф.п. №4	19,5	21,1	23,9	23,5	23,2
Контроль (без ф.п.)	18,1	19,4	20,7	21,3	20,4

* приведены результаты в виде средних арифметических значений измеряемого параметра, при этом величина доверительных интервалов составила 1,0-2,5% при уровне значимости 0,5.

Далее оценивали, как влияют время и температура экстракции на выход белка в экстракт. Образец микроводоросли *Chlorella Vulgaris*, после предварительного действия ферментного препарата (ф.п. №1), смешивали с водой в соотношении 1:45 и выдерживали от 0,25 до 4 ч. Экстракцию вели при температуре 25°C. В полученных экстрактах определяли концентрацию белка и рассчитывали выход белка из микроводоросли в процентах по отношению к его исходному содержанию в образце (Рис. 1).

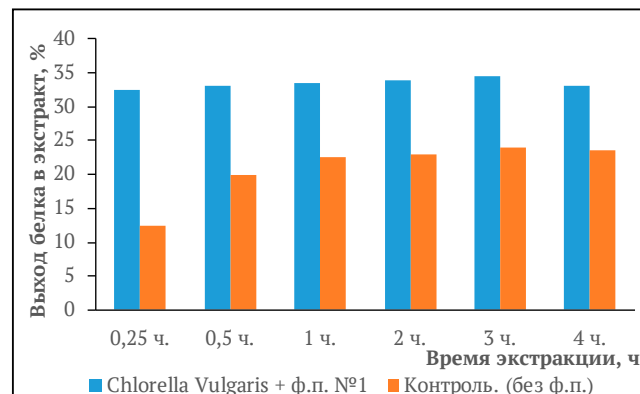


Рисунок 1. Влияние времени экстракции на выход белка в экстракт из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*.

Влияние температуры экстракции на выход белка в водный экстракт представлено на Рис. 2. Продолжительность экстракции составляла 1 ч, гидромодуль 1:45.

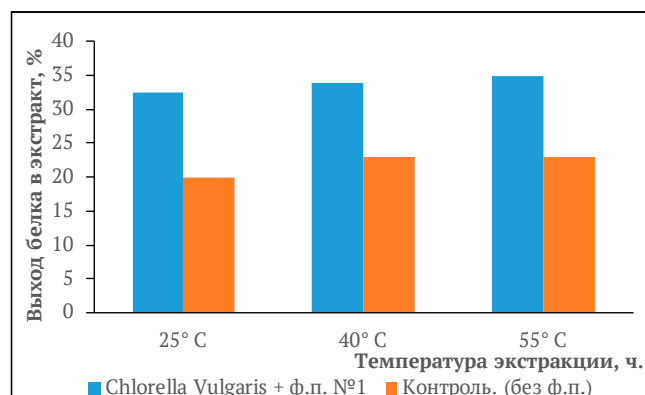


Рисунок 2. Влияние температуры экстракции на выход белка в экстракт из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*.

Сравнительный анализ возможного использования экстрагентов трех типов – вода, водный раствор глицерина, водный раствор пропиленгликоля – приведен в Табл. 3. Концентрация растворов глицерина и пропиленгликоля составляла от 30 до 95%. Образец микроводоросли *Chlorella Vulgaris* предварительно обрабатывали ферментным препаратом №1, затем добавляли экстрагент в соотношении 1:45 и проводили экстракцию 1 ч при температуре 25°C.

Таблица 3

Влияние типа экстрагента на выход белка в экстракт из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*

Концентрация раствора, %	Выход белка в экстракт, %, при воздействии экстрагента:		
	вода	глицерин	пропиленгликоль
–	32,7	–	–
30	–	35,6	–
50	–	35,7	23,4
70	–	34,4	15,3
95	–	33,2	11,3

Обсуждение

Как следует из полученных данных (Табл. 2), на экстракцию белка из микроводоросли *Chlorella Vulgaris* влияет как тип ферментного препарата, применяемого для предварительной обработки образца, так и соотношение сырье:экстрагент во время экстракции, при этом первый фактор выражен сильнее. Наибольший прирост водорастворимого белка в экстракте был получен

при использовании ферментного препарата №1, гидролизующего одновременно клетчатку, пектиновые вещества и белки. При величинах гидромодуля от 1:30 до 1:50 выход белка в экстракт по сравнению с контролем (без ф.п.) возрастал в 1,5-1,7 раза. Применение одной целлюлазы (ф.п. №3) позволило увеличить выход белка в 1,2 раза, совместно пектиназы и протеиназы (ф.п. №4) – в 1,1 раза. Применение лизоцима (ф.п. №2) не повлияло на экстракцию белка. Анализируя влияние гидромодуля, установили, что при использовании для предварительного гидролиза ферментного препарата, включающего целлюлазу, пектиназу, протеиназу (ф.п. №1), наибольший выход белка можно получить при величине гидромодуля 1:45. Этот режим был взят для продолжения исследований.

Показано (Рис. 1), что изменение времени экстракции от 0,25 до 4 ч влияет на выход белка из хлореллы. При увеличении времени экстракции от 0,25 до 3 ч концентрация белка в водном экстракте возрастала: из опытного образца (с действием ф.п.) в 1,07 раза, из контрольного – в 1,82 раза. Дальнейшее увеличение времени экстракции до 4 ч незначительно снижало выход белка. Анализируя результаты, можно сделать вывод, что действие ферментативного комплекса на клетку хлореллы столь велико, что даже минимального времени экстракции (0,25 ч) достаточно для достижения высокого выхода экстрактивных веществ. Рациональным с точки зрения технологии получения экстракта и использования оборудования можно считать время процесса не более 1 ч. В случае, когда по технологическому заданию требуется получить максимальный выход экстрактивных веществ, продолжительность экстракции следует увеличить до 3 ч.

При изучении влияния температурного фактора на экстракцию был рассмотрен интервал температур от 25°C до 55°C (более высокие температуры могли вызвать снижение биологической активности экстрагируемых продуктов). Данные представленной на Рис. 2 диаграммы свидетельствуют, что при повышении температуры от 25 до 55°C экстракция усиливается, но незначительно – в 1,05 раза. Из этого следует, что допустимо проводить экстракцию при невысоких температурах – 25-40°C.

Одним из важнейших факторов процесса экстракции является природа экстрагента. Это особенно актуально при получении экстрактов косметического назначения. С целью определения оптимального экстрагента для выделения БАВ из микроводоросли *Chlorella Vulgaris* использовали

экологически безвредные жидкости, которые широко применяются в косметических изделиях: вода, водные растворы глицерина и пропиленгликоля с концентрациями от 30 до 95%. Показано (Табл. 3), что лучшую экстрагирующую способность проявляли водные растворы глицерина. При этом наиболее высокие результаты были получены при использовании растворов глицерина с концентрацией 30-50%. Самыми слабыми растворителями были водные растворы пропиленгликоля, особенно концентрированные. Вода по экстракционной способности была близка к водным растворам глицерина.

Заключение

Таким образом, в ходе исследования были определены технологические режимы получения водных и водно-глицериновых экстрактов из микроводоросли *Chlorella Vulgaris*. Показана целесообразность предварительной обработки хлореллы комбинацией гидролитических ферментов, включающей целлюлазу, пектиназу, протеиназу, с последующей экстракцией при соотношении сырье: экстрагент 1:45, температуре 25-40°C, продолжительности экстракции 1 ч. Показана возможность и эффективность применения российского промышленного порошкообразного препарата хлореллы ООО НПК «Дело» для производства экстрактов косметического назначения. Полученные результаты использованы при разработке рецептур новых питательных косметических кремов..

Литература

- [1] Богданов Н. И. Хлорелла: зеленый корм круглый год // Комбикорма. 2002. № 6. С. 49.
- [2] Богданов Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных. Пенза: Пензенский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, 2007. 48 с.
- [3] Михеева Т. Перспективы использования культивируемых и планктоновых микроскопических водорослей // Наука и инновации. 2018. № 2. С. 15-19.
- [4] Бутова С. Н. Патент РФ на изобретение № 2628533. Антицеллюлитный гель / С. Н. Бутова, К. А. Тхоржевская, И. Д. Щеголева. Оpubл.: 18.08.17; Бюл. № 23.
- [5] Бутова С. Н., Тхоржевская К. А. Обоснование использования микроводоросли *Chlorella Vulgaris* в косметическом производстве // Современные проблемы техники и технологии пищевых производств: Материалы XVIII международной научно-практической конференции (16-17 февраля 2017 г) / Алт.гос. техн.ун-т им. И. И.Ползунова. Барнаул: Изд-во АлтТГУ. 2017. С. 52-53.
- [6] Аутжанова Н. Б. Морфологическая и систематическая характеристика хлореллы. Ее производство и применение // Научный вестник, химико-биологические науки. 2014. № 1. С. 113-126.
- [7] Альбицкая О. Н. Патент на изобретение РФ № 2044770. Способ извлечения биологически активных веществ из биомассы микроводоросли рода *Chlorella* / О. Н. Альбицкая [и др.]. Оpubл: 27.09.95.
- [8] Березин С. С. Патент на изобретение РФ № 2466771. Бычков А.Л., Ломовский О.И. Способ извлечения биологически активных веществ из биомассы микроводоросли рода *Chlorella* / С. С. Березин, А. Л. Бычков, О. И. Ломовский. Оpubл: 10.09.12.
- [9] Государственная фармакопея СССР / МЗ РФ. Репринтное издание XI-го издания 1990 г. 397 с.
- [10] Северин С. Е., Соловьев Т. А. Практикум по биохимии. М.: МГУ. 1989. 509 с.
- [11] Казаков Е. Д., Щеголева И. Д., Сахарова И. А. Лабораторный практикум по курсу «Биохимия зерна и продуктов его переработки». М.: Издательский комплекс МГУПП. 1996. 118 с.
- [12] Росгидромет. РД 52.24.784-2013. Массовая концентрация хлорофилла «а». Методика измерений спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом. Ростов-на-Дону. 2013.
- [13] Первушкин С. В., Маркова И. И., Куркин В. А., Желонкин Н. Н. Разработка методик количественного определения содержания β-каротина и фикоцианина в биомассе спирулины пищевой (*SPIRULINA PLATENSIS*) // Фундаментальные исследования. 2013. № 8. С. 1426-1429.
- [14] Государственная фармакопея РФ/МЗ РФ. XIII-е издание. 2015 г. ОФС. 1.2.3.0017.15. Методы количественного определения витаминов.

Obtaining of Cosmetic Extracts from Microalga *Chlorella Vulgaris*

Svetlana N. Butova

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: vbutov@bk.ru*

Irina D. Schegoleva

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: shegoleva.mgupp@yandex.ru*

Kristina A. Thorzevskaya

*Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: thorgevskaycrisna@gmail.com*

Currently, there is a steady trend of increasing the range of cosmetic products enriched with biologically active substances, the search for new natural cosmetic ingredients. One of the promising raw materials of this direction can be the microalga *Chlorella Vulgaris*. Biomass of microalga contains a full-fledged protein - up to 60% d.v., polyunsaturated fatty acids, B vitamins, vitamin C, β -carotene, trace elements, etc. It is most effective to use this natural complex in the form of extracts. However, a significant obstacle to the extraction process is the complex multilayer structure of the cell wall of microalgae. The purpose of this work was to develop a technology for obtaining cosmetic extracts from the microalga *Chlorella Vulgaris*. In the studies we used a sample of microalga *Chlorella Vulgaris*, produced by NPO Delo, Russia. The destruction of the cell wall of microalgae (before the start of extraction) by enzymatic hydrolytic preparations of various types was studied. The greatest result on the yield of extractive substances was obtained by the action of a combination of cellulase, pectinase, and proteinase enzymes. The influence on the extraction process of the following technological parameters was considered: the raw material: extractant ratio, duration and extraction temperature, type of extractant. The extraction value was estimated from the yield of the water-soluble protein fraction - it comprised a large part of the extractive substances. When analyzing the influence of various factors on the extraction of the water-soluble protein fraction, the prevalent value of the preliminary fermentative treatment of microalgae was established, the role of the extraction parameters was less pronounced. As a result of the work, technological regimes for obtaining water and water-glycerin extracts from microalga *Chlorella Vulgaris* were determined: 1:45 water module, 25-40 °C temperature, extraction time 1 hour. Formulations were developed of cosmetic products based on new natural extracts.

Keywords: microalga *Chlorella Vulgaris*, natural biological raw materials, extraction modes, enzyme preparations, aqueous and glycerin extracts, cosmetic products

References

- [1] Bogdanov N. I. *Hlorella: zelenyj korm kruglyj god* [*Chlorella: green fodder all year round*]. Kombikorma, 2002, no. 6, 49.
- [2] Bogdanov N. I. *Suspenziya khlorelly v ratsione selskokhozyaystvennykh zhivotnykh* [*Suspension of chlorella in the diet of farm animals*]. Penza: Penzenskij nauchno-issledovatel'skij institut selskogo hozyajstva, 2007. 48 p.
- [3] Mikheyeva T. *Perspektivy ispolzovaniya kultiviruemyh i planktonovyh mikroskopicheskikh vodoroslej* [Perspectives of using cultivated and plankton microscopic algae]. Nauka i innovatsii, 2018, no. 2, 15-19.
- [4] Butova S. N., Tkhrzhevskaya K. A., Schegoleva I. D. *Antitsellulitnyy gel* [Anti-cellulite gel]. Patent RF No. 2628533. 18.08.17.
- [5] Butova S. N., Tkhrzhevskaya K. A. *Obosnovanie ispolzovaniya mikrovodorosli Chlorella Vulgaris v kosmeticheskom proizvodstve* [Rationale for the use of microalga *Chlorella Vulgaris* in cosmetic production]. *Sovremennyye problemy tekhniki i*

- tehnologii pishchevykh proizvodstv: materialy XVIII mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Barnaul: Publishing house AltTU, 2017, 52-53.
- [6] Autzhanova N. B. Morfologicheskaya i sistematicheskaya harakteristika hlorelly. Ee proizvodstvo i primeneniye [Morphological and systematic characteristics of chlorella. Its production and application]. Nauchnyy vestnik, khimiko-biologicheskiye nauki, 2014, no. 1, 113-126.
- [7] Albitskaya O. N. Sposob izvlecheniya biologicheskii aktivnykh veshchestv iz biomassy mikrovdorosli roda Clorella [Method for extracting biologically active substances from biomass microalgae of the genus Chlorella]. Patent RF No. 2044770. 27.09.95.
- [8] Berezin S. S., Bychkov F. L., Lomovskiy O. I. Sposob izvlecheniya biologicheskii aktivnykh veshchestv iz biomassy odnokletochnoy mikrovdorosli roda Clorella [Method for extracting biologically active substances from biomass of unicellular microalga of the genus Chlorella]. Patent RF No. 2460771. 10.09.12.
- [9] Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR / Ministerstvo zdravookhraneniya. Pereizdannyi vypusk XI izdaniya 1990 goda [State Pharmacopoeia USSR / Ministry of Health. Reprinted edition of the XI edition of 1990]. 1998. 397 p.
- [10] Severin S. E., Soloviev T. A. Praktikum po biokhimi [Laboratory manual on biochemistry]. Moscow, 1989. 509 p.
- [11] Kazakov E. D., Schegoleva I. D., Sakharova I. A. Laboratornyy praktikum po kursu «Biokhimiya zerna i produktov yego pererabotki» [Laboratory manual of cour «Biochemistry of grain and its products»]. Moscow, 1996. 118 p.
- [12] Roshydromet. RD 52.24.784-2013. Massovaya koncentraciya hlorofilla «a». Metodika izmerenij spektrofotometricheskimi metodami s ehkstrakciey ehtanolom [Mass concentration of chlorophyll «a». Method of measurement by spectrophotometric method with ethanol extraction]. Rostov-on-Don, 2013.
- [13] Pervushkin S. V., Markova I. I., Kurkin V. A., Zhelonkin N. N. Razrabotka metodik kolichestvennogo opredeleniya sodержaniya β-karotina i fikocianina v biomasse spiruliny pishchevoj (SPIRULINA PLATENSIS) [Development of methods for quantitative determination of β-carotene and phycocyanin content in spirulina food biomass (SPIRULINA PLATENSIS)]. Fundamentalnyye issledovaniya, 2013, no. 8, 1426-1429.
- [14] Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy Federatsii / Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii. XIII-ye izdaniye. 2015 OFS. 1.2.3. 0017. 15. Metody kolichestvennogo opredeleniya vitaminov [Methods of quantitative determination of vitamins].