

На правах рукописи



Сорокина Ксения Николаевна

**КОМПЛЕКСНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВОСТРЕБОВАННЫХ ПРОДУКТОВ
БИОТЕХНОЛОГИИ: БИОТОПЛИВА, ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРОВ И ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г. К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук» г. Новосибирск.

- Научный консультант:** **Пармон Валентин Николаевич**
академик РАН, доктор химических наук, профессор
научный руководитель ИК СО РАН, заведующий кафедрой физической химии Новосибирского государственного университета (НГУ)
- Официальные оппоненты:** **Варфоломеев Сергей Дмитриевич**
член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), научный руководитель
- Синеокий Сергей Павлович**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»), руководитель биоресурсного центра «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов»
- Гайсина Лира Альбертовна**
доктор биологических наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», научный руководитель Сектора научно-технической интеграции, профессор кафедры биоэкологии и биологического образования
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН)

Защита диссертации состоится «6» июня 2023 года в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте <http://www.ibp.ru>.

Автореферат разослан « » февраля 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.228.03, к.б.н.



Дементьев Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В связи с истощением легкодоступных источников углеводородного сырья наблюдается устойчивый интерес к разработке новых технологий, использующих возобновляемое сырье для производства моторного топлива и востребованных химических веществ [Пармон, 2020]. Основными достоинствами использования подобного вида сырья являются экологичность [Parajuli, 2015], низкое энергопотребление процессов производства на его основе [Maity, 2015], а также снижение выбросов CO₂ [Пармон, 2020]. Хотя сырье пищевого назначения (пшеница, кукуруза, подсолнечник) является основным типом возобновляемого сырья, используемого в промышленности, с этой целью в перспективе также могут применяться разнообразные виды биомассы непищевого назначения (микроводоросли, энергетические травы [Сорокина, 2017]), которые представляют интерес как локальные источники сырья. Для повышения глубины переработки биомассы необходимо использовать так называемую комплексную биопереработку сырья, совмещающую традиционные химические и каталитические подходы с современными биотехнологическими.

Биомасса микроводорослей, которая содержит липиды и углеводы, являющееся перспективным сырьем для получения альтернативных моторных топлив (биодизельного топлива и биоэтанола [Пилигаев, 2019]), а также химических веществ (водорода, пропиленгликоля, биокислот [Gong, 2015]). Для снижения стоимости производства востребованных продуктов из этого вида биомассы в будущем актуален поиск и исследование свойств новых штаммов микроводорослей, а также разработка подходов к увеличению синтеза целевых веществ в процессе культивирования.

Другим источником возобновляемого сырья для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), как компонентов биодизельного топлива, являются растительные масла. Хотя в основном для получения МЭЖК применяют гетерогенные кислотные и щелочные катализаторы, для их получения также используют иммобилизированные липазы (в частности, импортный ферментный препарат Lipozyme TL на основе липазы *Thermomyces lanuginosus*), которые также применяются в промышленности в процессах получения модифицированных пищевых жиров с низким содержанием транс-жиров, обладающих отрицательным влиянием на здоровье человека [Сорокина, 2017]. Менее изучены с этой точки зрения бактериальные липазы, в том числе продуцируемые бактериями р. *Geobacillus*, хотя в ряде исследований было показано, что они обладают высокой термостабильностью [Dror, 2015], также как липаза бактерии *Burkholderia cepacia* [Sasso, 2016]. Смежным направлением исследований является применение термостабильных липолитических ферментов, к которым в том числе относятся эстеразы, используемые в процессах гидролиза органических веществ со сложноэфирной связью с коротким радикалом. Высокая селективность ферментов и их устойчивость к ингибиторам открывает широкие возможности для их применения в процессах гидролиза органических

веществ в средах со сложным составом. В частности, применение биологической очистки воды не всегда позволяет добиться высокого уровня удаления отдельных соединений, например пестицидов, а применение озонирования сопровождается образованием канцерогенных соединений. Использование для этих целей липолитических ферментов позволит увеличить эффективность гидролиза таких соединений и избежать образования нежелательных продуктов.

Поскольку в последнее время целлюлоза все чаще применяется для получения химических веществ, возрастает актуальность создания комбинированного процесса переработки целлюлозы с использованием ее каталитического гидролиза, направленного на получение 5-ГМФ (являющегося основой для получения пластиков [Liu, 2020]) и глюкозы (образующейся как побочный продукт реакции), которая в свою очередь может использоваться как субстрат для сбраживания микроорганизмами с целью получения этанола. Для сбраживания целесообразно применять термотолерантные дрожжи, что позволяет снизить затраты на процесс и снижает контаминацию культуральной среды побочной микрофлорой [Choudhary, 2016]. Разработка комплексного процесса, сочетающего как каталитический, так и биотехнологический подход, позволит повысить глубину переработки целлюлозы и в будущем получать продукты, востребованные промышленностью.

Таким образом, комплексный подход позволит разработать подходы для получения широкого спектра веществ из возобновляемой биомассы непищевого назначения с использованием биотехнологии, а также в дальнейшем применить результаты работы для решения экологических проблем, связанных с водоочисткой.

Целью работы является разработка комплексных биотехнологических подходов к переработке компонентов возобновляемого сырья (липидов и углеводов микроводорослей, растительных масел и целлюлозы) в продукты, востребованные химической и пищевой промышленностью, а также ферментных препаратов для гидролиза фосфорорганических инсектицидов (малатиона).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выделить и исследовать свойства новых штаммов микроводорослей, оценить влияние различных факторов на накопление липидов и углеводов в биомассе, а также изучить метаболические особенности отдельных штаммов в процессе накопления нейтральных липидов на муниципальных сточных водах.
2. Разработать комплексный подход к переработке липидов биомассы микроводорослей в метиловые эфиры жирных кислот с использованием как поперечно сшитых ферментных агрегатов липазы *Burkholderia cepacia*, так и кислотной переэтерификации; а углеводов – в янтарную кислоту с использованием бактерии *Actinobacillus succinogenes* 130Z.
3. Провести поиск природных термофильных продуцентов липолитических ферментов, их клонирование, изучить свойства и оценить возможность применения полученных ферментных препаратов в реакциях гидролиза и переэтерификации органических веществ (в том числе малатиона).

4. Изучить возможность применения ферментного препарата липазы *Geobacillus stearothermophilus* G3, иммобилизированной на мезопористом силикагеле, для получения метиловых эфиров жирных кислот и модифицированных пищевых жиров из растительных масел.

5. Разработать биотехнологический подход к переработке продуктов каталитического гидролизата целлюлозы в этанол с использованием термотолерантных дрожжей.

Научная новизна

Выявлены и охарактеризованы новые штаммы микроводорослей, продуцирующие нейтральные липиды и углеводы, а также обладающие высоким уровнем накопления биомассы. Выделен штамм *Scenedesmus abundans* A-1175, который имеет высокое содержание мононенасыщенных и насыщенных липидов, что позволит в дальнейшем использовать его для получения биодизельного топлива, устойчивого к окислению. Выделенный в ходе работы штамм микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 обладает высокой способностью к очистке муниципальных сточных вод от соединений азота и фосфора, а также применим в процессах получения биомассы с высоким содержанием нейтральных липидов с целью их последующей переработки в биодизельное топливо. Впервые изучен метаболизм микроводорослей в процессе накопления нейтральных липидов при их культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах и выявлены ключевые метаболиты, связанные с высоким уровнем накопления целевого компонента биомассы. Впервые показано, что штамм микроводоросли *Parachlorella kesslerii* IC-11, который в стандартных условиях преимущественно продуцирует углеводы, в стрессовых условиях в присутствии высокой концентрацией солей в среде способен накапливать нейтральные липиды и снижать уровень соединений азота в муниципальных сточных водах. Анализ метаболизма *P. kesslerii* IC-11 на стерилизованных муниципальных сточных водах впервые показал, что накопление нейтральных липидов этим штаммом связано с накоплением эквивалентов энергии в цикле лимонной кислоты в экспоненциальной фазе, а также с окислением пролина в стационарной фазе роста. Впервые получен ферментный препарат на основе поперечно сшитых ферментных агрегатов (ПСФА) липазы бактерии *B. ceracia*, а также продемонстрирована возможность его применения для переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 в МЭЖК с высоким выходом. Была впервые продемонстрирована возможность комплексного подхода, направленного на получение МЭЖК и янтарной кислоты путем переработки биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44 с использованием прямой переэтерификации в присутствии ионной жидкости [BMIM][HSO₄] и последующим сбраживанием гидролизованных остаточных углеводов с использованием штамма *A. succinogenes* 130Z. Впервые предложен комплексный подход с целью получения этанола с высоким выходом при культивировании штаммов термотолерантных дрожжей *Kluyveromyces marxianus* C1 и *Ogataea polymorpha* CBS4732 на средах, содержащих продукты каталитического гидролиза механически активированной микрокристаллической целлюлозы. Впервые получен препарат ковалентно иммобилизированной на мезопористом силикагеле термостабильной

рекомбинантной липазы *G. stearothermophilus* G3, обладающий высокой стабильностью в реакциях переэтерификации для получения МЭЖК и модифицированных пищевых жиров. Впервые клонирована термостабильная эстераза estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* UT1 и показано увеличение уровня ее синтеза при слиянии с TrxA и с использованием комбинации шаперонов KJE, ClpB и ELS в *E. coli*. Показано, что estUT1 обладает оптимумом активности при 70-80 °C и pH 8.0, а также высокой специфичностью к короткоцепочечным жирнокислотным остаткам длиной менее восьми атомов углерода. Впервые показана возможность применения ферментного препарата, полученного методом поперечной сшивки эстеразы estUT1-TrxA, для очистки стерилизованных муниципальных сточных вод от инсектицида малатиона путем его биокаталитического гидролиза с эффективностью, превосходящей другие виды биоочистки.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость работы заключается в возможности применения иммобилизованной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 в реакциях переэтерификации масел для получения модифицированных пищевых жиров. Свойства полученной в ходе работы эстеразы estUT1 позволят в дальнейшем применять ее для гидролиза различных соединений со сложноэфирной связью с радикалами длиной менее восьми атомов углерода, в том числе для очистки стерилизованных сточных вод от инсектицида малатиона. Практическая ценность работы также заключается в разработке и оценке эффективности различных подходов к очистке сточных вод локальных очистных сооружений г. Новосибирска (с использованием выделенных в работе штаммов микроводорослей и иммобилизованных ферментных препаратов).

Теоретическая значимость работы выражается в расширении знаний о новых штаммах микроорганизмов, включающих микроводоросли, липолитические термофильные бактерии и термотолерантные дрожжи, а также возможностей их применения в комплексных процессах получения востребованных химических веществ с использованием биотехнологических подходов. Впервые изучен метаболизм микроводорослей при накоплении липидов на стерилизованных муниципальных сточных водах, что в дальнейшем позволит получать биомассу микроводорослей с высоким содержанием нейтральных липидов на реальном субстрате, в том числе при высокой концентрации солей в культуральной среде. Изучение метаболизма микроводорослей и выявление ключевых метаболитов, связанных с накоплением нейтральных липидов, является базой для последующих исследований, связанных с получением их более эффективных продуцентов. Результаты работ могут применяться в составе комплексных процессов биопереработки возобновляемого сырья в сочетании с традиционными химическими и каталитическими подходами для получения широкого спектра химических веществ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Штаммы микроводорослей *Scenedesmus abundans* A-1175 и *Micractinium* sp. IC-76 с высоким содержанием насыщенных липидов обладают характеристиками, перспективными для применения в процессах получения биодизельного топлива, стойкого к окислению.

2. При культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах наблюдаются существенные отличия при индукции накопления нейтральных липидов у липид- и углеводпродуцирующих микроводорослей, связанные с изменением углеводного и энергетического обмена клеток, соответственно.
3. Разработан новый комплексный подход, позволяющий получать как метиловые эфиры жирных кислот, так и янтарную кислоту с высоким выходом из биомассы микроводоросли *Micractinium* sp.
4. Ферментный препарат БКЛ, полученный методом ковалентной иммобилизации рекомбинантной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 на мезопористом силикагеле, обладает высокой стабильностью, но средней эффективностью в процессах получения биодизельного топлива и модифицированных пищевых жиров из растительных масел.
5. Разработан новый подход к получению этанола с высоким выходом в составе комплексной переработки целлюлозы в 5-гидроксиметилфурфурол, путем сбраживания побочных продуктов ее каталитического гидролизата, с использованием термотолерантных дрожжей *Kluyveromyces marxianus* C1 и *Ogataea polymorpha* CBS4732.
6. Ферментный препарат на основе новой рекомбинантной эстеразы estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* UT1 обладает высокой термостабильностью и высокой способностью к гидролизу инсектицида малатиона, превосходящий другие методы биологической очистки сточных вод.

Личный вклад автора

Автором лично предложены дизайн исследований, сформулированы цели, задачи, выводы и положения, выносимые на защиту, выполнен анализ, обобщение и интерпретация полученных результатов в виде докладов и публикаций по теме диссертационной работы. Работы по получению гидролизатов биомассы микроводорослей и целлюлозы выполнялись сотрудниками Лаборатории каталитических методов преобразования солнечной энергии (д.х.н. Таран О. П., с.н.с. к.х.н. Громовым Н. В. и м.н.с. Медведевой Т. Б.). Работы по получению ферментного препарата КатА выполнялись к.б.н. Самойловой Ю. В. В рамках работ по теме исследований при непосредственном руководстве автора подготовлены диссертационные работы к.б.н. Самойловой Ю. В. и к.б.н. Пилигаева А. В.

Исследования проводились при поддержке грантов: в рамках базового бюджетного финансирования Института катализа СО РАН (2008-2021), РФФИ 17-73-30032, ГК № 11411.100370213.042, ГК №16.512.11.2180, ГК №14.512.11.0065 ГК 14.613.21.0017, РФФИ № 18-38-00386 мол_а, НШ-6902.2016.3, НШ-1183.2014.3, НШ-524.2012.3 и др.

Степень достоверности результатов и апробация диссертационной работы

При проведении данной научной работы были использованы современные подходы и методы исследования. Достоверность полученных результатов была подтверждена использованием современных статистических методов анализа.

Основные результаты диссертационной работы апробированы на российских и зарубежных научных конференциях, а также конгрессах различного уровня, в том числе: VI Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, вирусологов, молекулярных биологов и биофизиков (г. Новосибирск, 2019), Catalysis for Renewable Sources: Fuel, Energy, Chemicals: 5th International Conference (Греция, 2019), Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (г. Москва, 2019), V международная научная конференция молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках OpenBio-2018 (г. Новосибирск, 2018), III Международная конференция Биотехнология новых материалов — окружающая среда — качество жизни (Красноярск, 2018), Школа молодых ученых «Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы» (г. Томск, 2018), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Биотехнология и общество в XXI веке» (г. Барнаул, 2018 г.), Международный Форум Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (г. Москва, 2018), 4th International Congress on Catalysis for Biorefineries (Франция, 2017) и др.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 60 печатных работ, из них 21 статей в российских и международных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, 2 монографии, а также 49 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 312 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка принятых сокращений, списка использованной литературы и приложений. Работа содержит 49 таблиц и 55 рисунков. Список литературы включает 557 источника, из них 520 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В разделе **Введение** обоснована актуальность исследования, поставлена цель работы и сформулированы задачи работы. Описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, охарактеризована степень достоверности результатов. Приведена информация о публикации результатов работы, апробации работы, личном вкладе автора, структуре и объеме диссертации.

В **Главе 1** приведен обзор литературы, характеризующий современные знания об исследовании свойств и применении микроводорослей, как продуцентов липидов и углеводов, а также факторов, влияющих на накопление целевых веществ и их метаболизм. Рассмотрены аспекты переработки биомассы микроводорослей в востребованные продукты (в том числе

спирты и органические кислоты) и их сравнение с другими методами получения этих веществ, а также их применение в процессах водоочистки. Приведены сведения о продуцентах термостабильных липолитических ферментов, а также об их применении в иммобилизованном виде в процессах получения биодизельного топлива и модифицированных жиров. Рассмотрены биотехнологические способы переработки целлюлозы с использованием термотолерантных дрожжей в востребованные вещества (этанол).

Глава 2 содержит информацию о материалах и методах исследования.

Объекты исследования. В ходе работы выделены штаммы: *Desmodesmus* sp. IC-75, *Desmodesmus* sp. IC-10, *P. kessleri* IC-11, *Parachlorella* sp. IC-23, *Micractinium* sp. IC-44, *Chlorella sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Chlorella* sp. IC-82, *Botryococcus* sp. A-1113 *Botryococcus* sp. A-1115, *Botryococcus* sp. A-1138, *Botryococcus* sp. A-1162, *Bracteacoccus occidentalis* A-1144, *Chlorella sorokiniana* A-1135, *Chlorella* sp. A-1176, *Chlorella* sp. A-1182, *Chlorella vulgaris* A-1123, *Nannochloris bacillaris* A-1139, *Scenedesmus abundans* A-1175, *Scenedesmus obliquus* A-1167. Штаммы *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-2, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-9, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-15 и *Parachlorella kessleri* IPPAS S-333 получены из коллекции микроводорослей IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва). Штаммы *Chlorella protothecoides* NIES-2164 и *Scenedesmus obliquus* NIES-2280 получены из коллекции микроводорослей NIES Национального института экологических исследований (Япония).

Для выделения штаммов-продуцентов липолитических ферментов использовали образцы компоста, отобранные в Новосибирской области и Республике Тыва. Ген эстеразы estUT1 был выделен из бактерии *U. thermosphaericus* UT1. Штамм *E. coli* B-1298, продуцирующий липазу G3 бактерии *G. stearothermophilus* G3, предоставлен ФИЦ ИЦИГ СО РАН [патент РФ 2540873, 10.02.2015]. Плазмиды pBB540, несущая гены ClpB и GrpE; pBB542, несущая гены DnaK, DnaJ, GroEL и GroES, предоставлены Берндом Букай [de Marco, 2007].

В ходе работы были выделены штаммы термотолерантных дрожжей из образцов молочных продуктов: *Kluyveromyces marxianus* C1, *Kluyveromyces marxianus* D5, *Kluyveromyces marxianus* B5, *Kluyveromyces marxianus* B3, *Clavispora lusitaniae* C3, *Kluyveromyces marxianus* A1, *Kluyveromyces marxianus* A5, *Kluyveromyces marxianus* D4, *Pichia kudriavzevii* B4, *Kluyveromyces marxianus* A4, *Kluyveromyces marxianus* B1, *Kluyveromyces marxianus* 4C. Штамм *Ogataea polymorpha* CBS4732 был получен из коллекции DSMZ (Германия).

Штамм *Actinobacillus succinogenes* 130Z был получен из коллекции DSMZ (Германия).

Ферментный препарат ПСФА-estUT1-TrxA получен на основе эстеразы estUT1; БКЛ - на основе липазы G3 и мезопористого силикагеля АСКГ; КатА – на основе липазы бактерии *Burkholderia cepacia* (Amano BH).

Методы исследования. Чистые культуры микроводорослей выделяли из накопительных культур методом последовательного разведения или с использованием метода проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACSAria (ЦКП «Проточная цитометрия» ФИЦ Институт

цитологии и генетики СО РАН). Идентификацию микроводорослей проводили путем ПЦР по последовательности района 18S рРНК - ITS1, 5.8S рРНК - ITS2, филогенетический анализ – с использованием программы MEGA 5 и алгоритма максимального правдоподобия. Кинетические параметры штаммов микроорганизмов (удельная скорость накопления биомассы (μ), время удвоения биомассы (T), скорость накопления биомассы и липидов (V), содержание компонентов биомассы (W)) оценивали при культивировании штаммов в конических колбах.

Первичный отбор штаммов микроводорослей по способности накапливать липиды и углеводы проводили в 24-луночной планшете в средах BBM, OECD и WW. Концентрацию биомассы оценивали путем подсчета клеток в камере Горяева. Содержание нейтральных липидов оценивали по флуоресценции после окрашивания красителем Нильским красным при 525/579 нм. Общее содержание углеводов определяли фенол-сернокислотным методом. Для получения образцов биомассы штаммы микроводорослей культивировали в лабораторной установке объемом 110 л (0.2 м × 1.5 м × 1.0 м).

Чистые культуры термофильных бактерий выделяли методом последовательного разведения. Липолитическую активность культур оценивали по размеру зоны гидролиза на трибутириновом агаре при температуре до 65 °С, идентификацию проводили по последовательности гена 16S рРНК.

Ген эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* UT1 встраивали в вектор pET32b(+) (Novagen) по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Sfr*274I. Моделирование структуры фермента проводили с использованием сервера SWISS-MODEL. Каталитическую триаду подтверждали путем сайт-направленного мутагенеза. Экспрессию рекомбинантной эстеразы estUT1 с дополнительным доменом TrxA проводили путем индукции ИПТГ клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1. Эстеразу выделяли в виде телец включения с последующим растворением в мочеvine и рефолдингом постадийным диализом, очистку белка проводили на Ni-NTA агарозе и на Sephadex G25, затем обрабатывали энтерокиназой для последующего анализа свойств. Коэкспрессию рекомбинантной эстеразы estUT1 с комбинацией шаперонов бактерии *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3), несущем плазмиды pET32b-UT1, pBB540 и pBB542, путем индукции ИПТГ. Эстеразу выделяли в виде растворимой фракции белка с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии. Полученный таким образом белок использовали для приготовления ферментного препарата ПСФА-estUT1-TrxA.

Экспрессию рекомбинантной липазы G3 проводили путем индукции ИПТГ клеток *E. coli* B-1298. Липазу выделяли методом осаждения сульфатом аммония с последующим диализом. Полученную липазу G3 использовали для приготовления иммобилизованного препарата БКЛ.

Оптимизацию приготовления ферментного препарата ПСФА-estUT1-TrxA проводили с помощью гранецентрированного центрально-композиционного планирования (FCCCD) по методу RSM в программе Design-Expert 10 (Stat-Ease Inc.). Активность эстеразы определяли при длине волны 405 нм с использованием *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот в качестве

субстратов [Еом, 2005]. Операционную стабильность ПСФА-estUT1-TrxA определяли в реакции гидролиза инсектицида малатиона при его начальной концентрации $27.5 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$ в течение 25 циклов (1 цикл - 24 ч) при 37°C в 50 mM Tris-HCl pH 7.0, OECD [OECD Technical Report, 1996] и стерилизованной сточной воде с очистных сооружений г. Новосибирска (среда WW [Piligaev, 2018]).

БКЛ готовили методом ковалентной иммобилизации липазы G3 на аминированном силикагеле, обработанным глутаровым альдегидом. Активность липазы G3 и катализатора БКЛ определяли методом алкалометрического титрования при постоянном pH по скорости гидролиза трибутирина.

Приготовление ферментного препарата КатА на основе липазы бактерии *B. ceracia* проводили методом ПСФА, параметры переэтерификации липидов микроводорослей оптимизировали с применением метода RSM с использованием центрального композиционного планирования.

Химическую переэтерификацию липидов микроводорослей проводили в присутствии 2% H_2SO_4 при 80°C , прямую – аналогично при добавлении ионных жидкости (ИЖ). Остаточную биомассу гидролизвали в присутствии 2% H_2SO_4 и сбраживали продукты гидролиза бактерией *A. succinogenes* 130Z для получения янтарной кислоты.

Для получения этанола путем сбраживания каталитического гидролизата механически активированной целлюлозы, полученного с использованием катализатора Сибунит-4-окс [Sorokina, 2017], его предварительно нейтрализовали NH_4OH до pH 5.5, упаривали, добавляли компоненты среды YNB. Влияние различных факторов на параметры культивирования дрожжей оценивали путем культивирования в глубоких 96-луночных планшетах в системе Microflask (Applikon Biotechnology), прирост биомассы оценивали по ОП₅₉₅. Влияние отдельных ингибиторов на прирост биомассы оценивали по значению IC₅₀, соответствующему концентрации вещества, вызывающей снижение прироста биомассы на 50% по сравнению с культурой, не подвергавшейся воздействию ингибитора.

Анализ концентрации NO_3^- в среде проводили при 220 нм, NH_4^+ - реактивом Несслера; PO_4^{3-} - с использованием молибдата аммония и малахитового зелёного. Концентрацию анионов (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) измеряли ионной хроматографией (883 Basic IC Plus Metrohm). Экстрагирование липидов из сухой биомассы проводили смесью хлороформа и метанола по методу Фолча. Содержание белка определяли по методу Брэдфорда, углеводов - фенол-сернокислотным и антроновым методом.

Анализ состава липидных экстрактов микроводорослей проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием смеси гексан-этиловый эфир-уксусная кислота (80:20:1) в качестве элюента. Анализ состава жирных кислот и состава метаболитов микроводорослей проводили методом ГХ/МС на приборе Agilent 7000В. Для анализа метаболических профилей штаммов микроводорослей использовали метод главных компонент

(PCA) и метод дискриминантного анализа на основе частных наименьших квадратов (PLS-DA), для анализа метаболических циклов - пакет MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

Концентрацию малатиона и МЭЖК определяли методом ГХ-МС. Триацилглицеридный состав масел анализировали методом ВЭЖХ-МС на приборе HPLC-MS 2020 Shimadzu в режиме выделенных ионов. Температуру плавления масел определяли по методу AOCS Cc.3.25.

Состав образцов гидролизатов и культуральной жидкости при сбраживании определяли с помощью ВЭЖХ на Shimadzu LC-MS2020 с колонкой (Rezex ROA-Organic Acid H⁺ 300 × 7.8 мм, Phenomenex, США) и рефрактометрическим детектором RID-10A.

Все эксперименты в работе, за исключением экспериментов RSM и применения катализатора БКЛ в реакции метанолиза подсолнечного масла, были выполнены в трёх повторениях, результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение, а также проведена оценка с использованием стандартных статистических методов (в том числе использовали одно- и многофакторный дисперсионный, а также регрессионный анализ, при необходимости проводили апостериорный анализ для множественных сравнений с поправкой Бонферрони или тестом Тьюки).

Глава 3. Выделение и исследование свойств штаммов микроводорослей

3.1 Выделение штаммов микроводорослей из природных источников

Проведено выделение 20 штаммов микроводорослей из природных источников и их таксономическая идентификация по последовательности района ДНК 18S рРНК - ITS1 - 5.8S рРНК - ITS2.

3.2 Предварительный отбор штаммов микроводорослей по способности накапливать нейтральные липиды и углеводы

Для первичного отбора штаммов использованы среды BBM, OECD и WW. При анализе накопления нейтральных липидов статистически значимые различия ($p < 0.05$, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным множественным сравнением с поправкой Холма-Бонферрони) с другими штаммами были отмечены только для *C. sorokiniana* IC-62 (среда OECD) и *Micractinium* sp. IC-76 (среда WW). Высоким уровнем накопления биомассы и липидов также обладал штамм *C. sorokiniana* IPPAS C-1 (среда BBM). Достоверные отличия ($p < 0.05$) по концентрации углеводов с другими штаммами были выявлены для *P. kessleri* IC-11 (среда BBM и WW) и *P. kessleri* IPPAS C-2 (среда WW).

3.3 Поиск и исследование свойств штаммов с повышенным содержанием мононенасыщенных и насыщенных жирных кислот

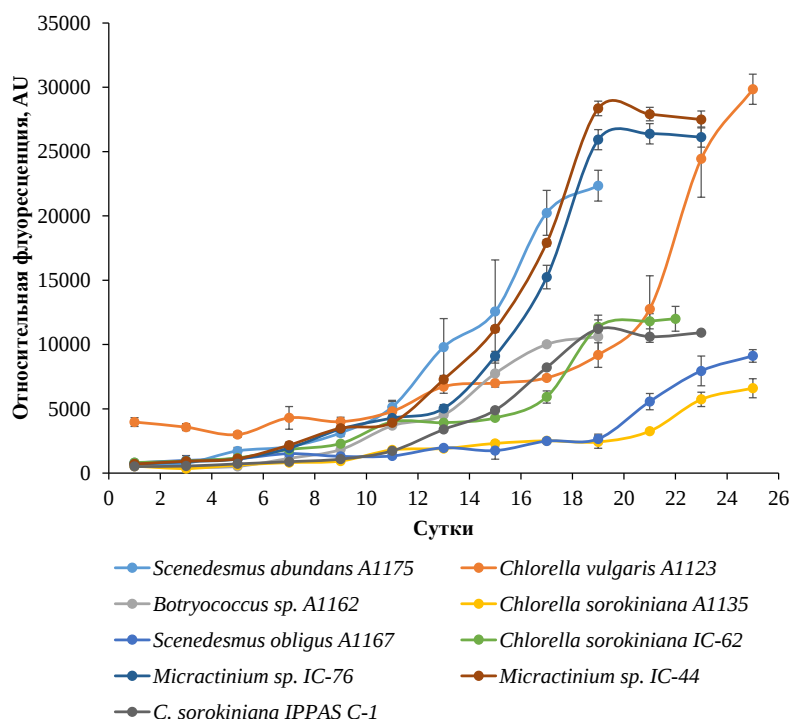


Рисунок 1 – Накопление нейтральных липидов при культивировании штаммов микроводорослей на среде BBM в колбах

двухвыборочный t-тест) уровнем накопления в стационарной фазе роста обладали штаммы *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *C. vulgaris* A1123 [Piligaev, 2015]. Выявило, что наибольшая скорость накопления липидов (32.8 ± 1.5 мг л⁻¹ сут⁻¹) наблюдается у *S. abundans* A1175. В экспоненциальной фазе роста накапливались C16:0, C18:0, C18:1, в стационарной фазе увеличивалось содержание C18:2. Штамм *S. abundans* A1175 обладал относительно высоким уровнем накопления НЖК и МНЖК ($72.8 \pm 5.8\%$) в стационарной фазе роста. По данным теста Тьюки также выявлено, что штаммы *C. vulgaris* A1123, *S. abundans* A1175, *C. sorokiniana* A1135 и *S. obliquus* A1167 достоверно отличаются ($p < 0.01$) от остальных по уровню накопления НЖК. Высоким содержанием общих липидов обладали штаммы *S. abundans* A1175 ($44.4 \pm 2.7\%$), *C. vulgaris* A1123 ($38.3 \pm 1.0\%$), *Micractinium* sp. IC-44 ($39.2 \pm 3.8\%$) и *Micractinium* sp. IC-76 ($35.5 \pm 2.8\%$), наименьшим - *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($30.8 \pm 3.3\%$). Повышенное содержание углеводов в биомассе отмечено для штаммов, относящихся к р. *Scenedesmus* и р. *Micractinium*, а также для *C. sorokiniana* IPPAS C-1, большим содержанием углеводов отличается штамм *Botryococcus* sp. A1162 ($46.3 \pm 1.1\%$). Высоким содержанием белка обладает *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($38.5 \pm 1.7\%$), меньшим – *S. abundans* A1175 ($15.7 \pm 0.7\%$).

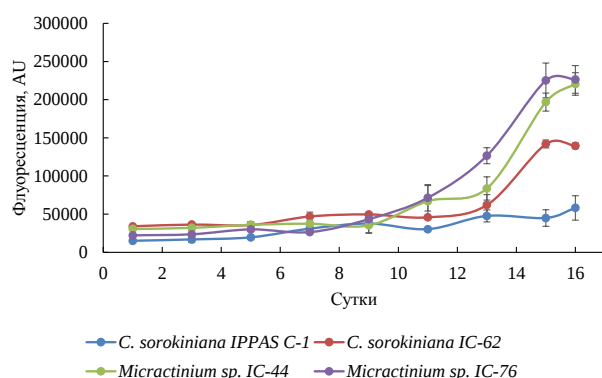
Таким образом, штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IPPAS C-1 обладают сравнимым с *S. abundans* A1175 уровнем накопления липидов, но накапливают большее количество биомассы, поэтому они были использованы для дальнейших работ по изучению влияния отдельных факторов на накопление липидов и углеводов микроводорослями, а также их метаболических особенностей при культивировании в различных средах.

Поиск штаммов микроводорослей, обладающих высоким уровнем моно- и насыщенных жирных кислот (МНЖК и НЖК), пригодных для применения в процессах получения биотоплива, проводили среди штаммов с высоким уровнем накопления биомассы и липидов, а также выбранных дополнительных штаммов. Анализ накопления нейтральных липидов при культивировании на среде BBM в колбах (Рисунок 1) выявил, что наибольшим достоверным ($p < 0.001$, парный

3.4 Исследование влияния отдельных факторов на процесс накопления нейтральных липидов и углеводов у штаммов микроводорослей

Штаммы *Micractinium* sp. IC-76 и *Micractinium* sp. IC-44 накапливали наибольшее количество нейтральных липидов в стационарной фазе роста при истощении соединений азота в среде, в то время как *C. sorokiniana* IPPAS C-1 практически их не накапливал (Рисунок 2). Все штаммы обладали сравнимыми удельными скоростями накопления биомассы, наибольшим накоплением липидов отличался *Micractinium* sp. IC-76 ($36.3 \pm 0.1\%$, 13.49 ± 1.50 мг л⁻¹ сут⁻¹), углеводов - *C. sorokiniana* IC-62 (38.6 ± 2.2 , 24.5 ± 1.7 мг л⁻¹ сут⁻¹) ($p < 0.05$, тест Тьюки).

А.



Б.

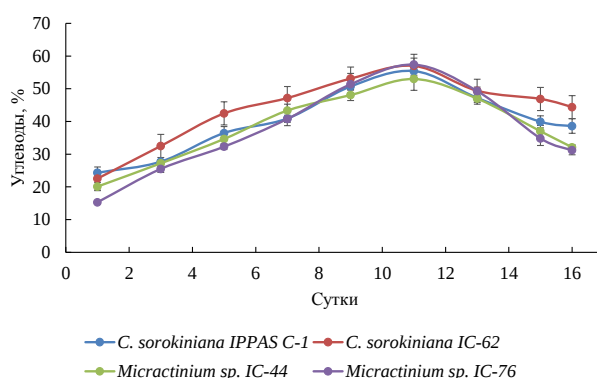


Рисунок 2 – Накопление биомассы и липидов штаммами микроводорослей с высоким уровнем липидов при культивировании на среде WW в колбах. (А) Липиды, (Б) Углеводы

В стационарной фазе роста у всех штаммов наблюдали достоверные различия с экспоненциальной фазой ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест), связанные с увеличением содержания C16:0 и C18:1, а также снижением содержания C18:0. У *Micractinium* sp. IC-44 в стационарной фазе роста было отмечено относительно высокое суммарное содержание ($71.3 \pm 4.7\%$) МЖК и НЖК, которое, однако, было меньше, чем у *S. abundans* A-1175 при культивировании на среде BBM.

Анализ параметров водоочистки при культивировании в среде WW показал, что только для *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($p < 0.01$, тест Тьюки), зарегистрировано снижение ХПК среды (до 70.1 мг O₂ л⁻¹) на пятнадцатые сутки. При этом все протестированные штаммы одинаково эффективно поглощали NH₄⁺ и PO₄³⁻ из среды.

Для штаммов с высоким уровнем накопления липидов на WW (*C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76), проводили анализ изменений в метаболических профилях, дополнительно использовали *C. sorokiniana* IPPAS C-1 с низким уровнем накопления липидов. Результаты подвергали статистическому анализу с использованием PCA и PLS-DA. PCA (Рисунок 3) выявил, что первые две основных компоненты суммарно составили 40.35% от общей дисперсии, что говорит о существенных различиях в метаболизме всех штаммов в обеих фазах роста и связано с высоким содержанием метаболитов углеводного и липидного обмена, за исключением штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1. Анализ каждого из четырех штаммов методом PLS-DA для выявления наиболее значимых изменений между фазами роста показал, что

наибольшие различия выявляются в отношении компоненты F1. У штамма *Micractinium* sp. IC-76, обладавшего наибольшим уровнем накопления нейтральных липидов, выявлено, что двенадцать метаболитов, изменяющихся при переходе экспоненциальной фазы к стационарной

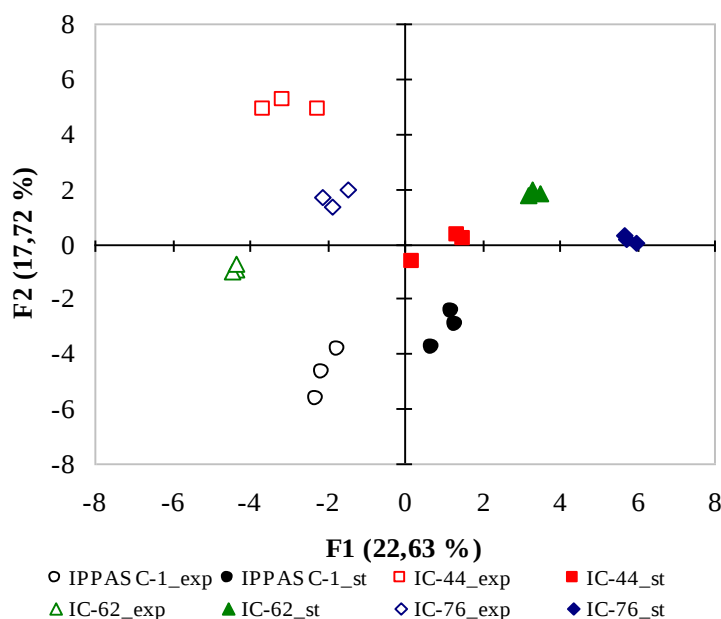


Рисунок 3 – Анализ метаболизма микроводорослей в экспоненциальной и стационарной фазе роста при культивировании на среде WW методом PCA [Piligaev, 2018]. Условные обозначения: exp – экспоненциальная фаза роста (4 сут), st – стационарная фаза роста (15 сут)

процессе индукции накопления липидов *Micractinium* sp. IC-76 на среде WW были подвержены циклы, связанные с метаболизмом сахаров (крахмала и сахарозы, а также в меньшей степени метаболизма галактозы), аминокислот (аланина, аспартата и глутамата), а также с метаболизмом глутатиона.

3.5 Исследование влияния стрессовых факторов на способность к индукции накопления нейтральных липидов у микроводорослей, продуцирующих углеводы

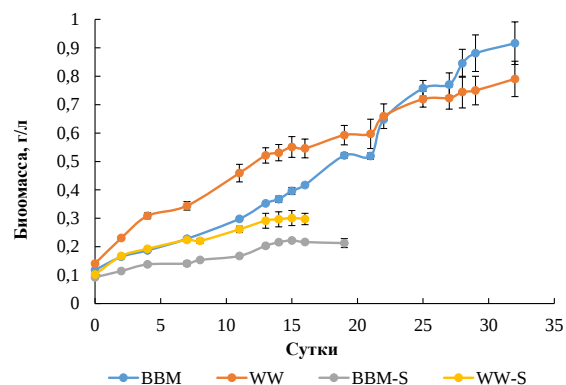
Выявлено, что штаммы *P. kessleri* IPPAS C-2, *P. kessleri* IPPAS C-9, *P. kessleri* IPPAS C-15, *P. kessleri* IPPAS S-333, *Desmodesmus* sp. IC-75, *P. kessleri* IC-11 и *Parachlorella* sp. IC-23 обладают относительно высоким уровнем накопления биомассы и углеводов, а также низким содержанием нейтральных липидов. Штамм микроводоросли *P. kessleri* IC-11 [Sorokina, 2020] был выбран для дальнейших исследований параметров роста и динамики изменения биохимического состава биомассы под влиянием стрессовых условий на средах BBM и WW, что позволяет оценить различия в метаболизме штамма на разных средах. Выявлено, что добавление солей в среду BBM в концентрации 30 г л^{-1} оказывает наибольшее влияние на накопление нейтральных липидов у *P. kessleri* IC-11 в стационарной фазе роста и достоверно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) снижает удельную скорость накопления биомассы с 0.093 ± 0.009 до $0.038 \pm 0.003 \text{ сут}^{-1}$.

с $VIP > 1$ ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест), относятся в основном к метаболизму сахаров (сахароза, глюкозо-6-фосфат, эритроновая кислота, раффиноза) и липидов (моностеарин, моноолеин). Для выявления метаболических путей, подвергнутых наибольшим изменениям в процессе накопления нейтральных липидов, проведено обогащение по метаболическими путям в соответствии с их топологическим анализом по данным базы KEGG для всех выявленных метаболитов с $VIP > 1$ и $p < 0.05$ (двухвыборочный односторонний t-тест) с использованием Metaboanalyst 5.0. Наибольшим изменениям в

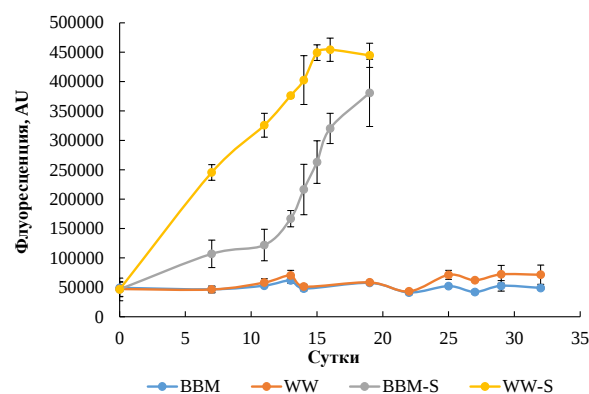
Общее количество НЖК и МНЖК у *P. kessleri* IC-11 было достоверно ниже ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) в стационарной фазе роста, чем в экспоненциальной при культивировании во всех средах, добавление солей в концентрации 30 г л^{-1} увеличивало общее содержание НЖК и МНЖК до $45.5 \pm 0.7\%$.

Метаболическое профилирование биомассы штамма *P. kessleri* IC-11 проводили при культивировании в среде WW с добавлением 30 г л^{-1} солей (WW-S). В качестве сравнения использовали биомассу, полученную при культивировании на среде BBM-S в аналогичных условиях. Выявлено, что накопление биомассы при культивировании в среде WW было меньше, чем в среде BBM (Рисунок 4А). Анализ состава биомассы показал, что штамм *P. kessleri* IC-11 интенсивно накапливал общие липиды ($p < 0.001$, двухвыборочный односторонний t-тест) в стационарной фазе роста при добавлении 30 г л^{-1} солей в среды BBM и WW (до $W_{\text{л}}$ 33.3 ± 1.3 и $31.0 \pm 1.8\%$, соответственно), тогда как содержание углеводов в этот период оставалось относительно низким ($W_{\text{у}}$ 12.1 ± 2.6 и $10.3 \pm 0.4\%$, соответственно). Исследование динамики накопления нейтральных липидов и углеводов (Рисунок 15Б, В) выявило наличие феномена переключения метаболизма с синтеза углеводов на синтез нейтральных липидов при добавлении солей в культуральную среду. При культивировании *P. kessleri* IC-11 в среде BBM-S наблюдалось небольшое снижение потребления NO_3^- (на $23.6 \pm 1.2\%$), в то время как в среде BBM полное снижение NO_3^- было достигнуто к концу культивирования. Показатель ХПК в конце культивирования в среде WW снизился на $44.7 \pm 2.89\%$, а добавление солей уменьшило этот показатель только на $11.46 \pm 0.43\%$. Снижение качества очистки воды при использовании WW-S можно отчасти объяснить низким уровнем накопления биомассы *P. kessleri* IC-11 в этих условиях.

А.



Б.



В.

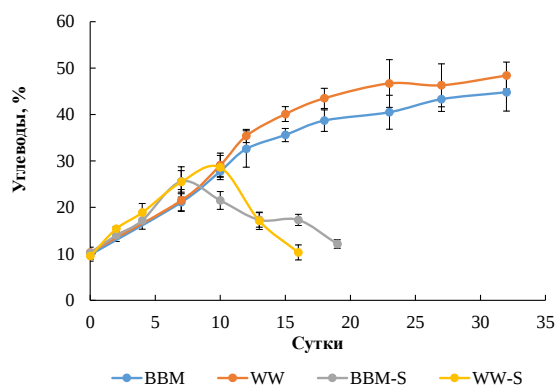


Рисунок 4 – Состав биомассы *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе при культивировании в средах BBM и WW: (А) Биомасса, (Б) Нейтральные липиды, (В) Углеводы.

ГХ-МС анализ экстрактов клеток микроводоросли *P. kessleri* IC-11 в экспоненциальной и стационарной фазах роста на четырех средах (BBM и WW без и с добавлением 30 г л⁻¹ солей) и последующий PCA анализ выявил, что на две основных компоненты приходится 54.4% вариальности выборки, метаболиты при культивировании на средах без и с 30 г л⁻¹ солей образуют два отдельных кластера. PLS-DA анализ выявил статистически значимые отличия между экспоненциальной и стационарной фазами роста. Для метаболитов с VIP > 1 и $p < 0.05$ была построена метаболическая карта при культивировании *P. kessleri* IC-11 на средах BBM (Рисунок 6) и WW (Рисунок 7). Выявлено, что концентрация метаболитов, связанных с метаболизмом галактозы, увеличивалась в стационарной фазе роста (галактоза – в 2.4, сахароза – в 1.2, раффиноза – в 4.8 раза) на WW и снижалась на BBM (кроме сахарозы). Для среды BBM снижение концентрации аргинина (входит в цикл мочевины) наблюдалось в стационарной фазе.

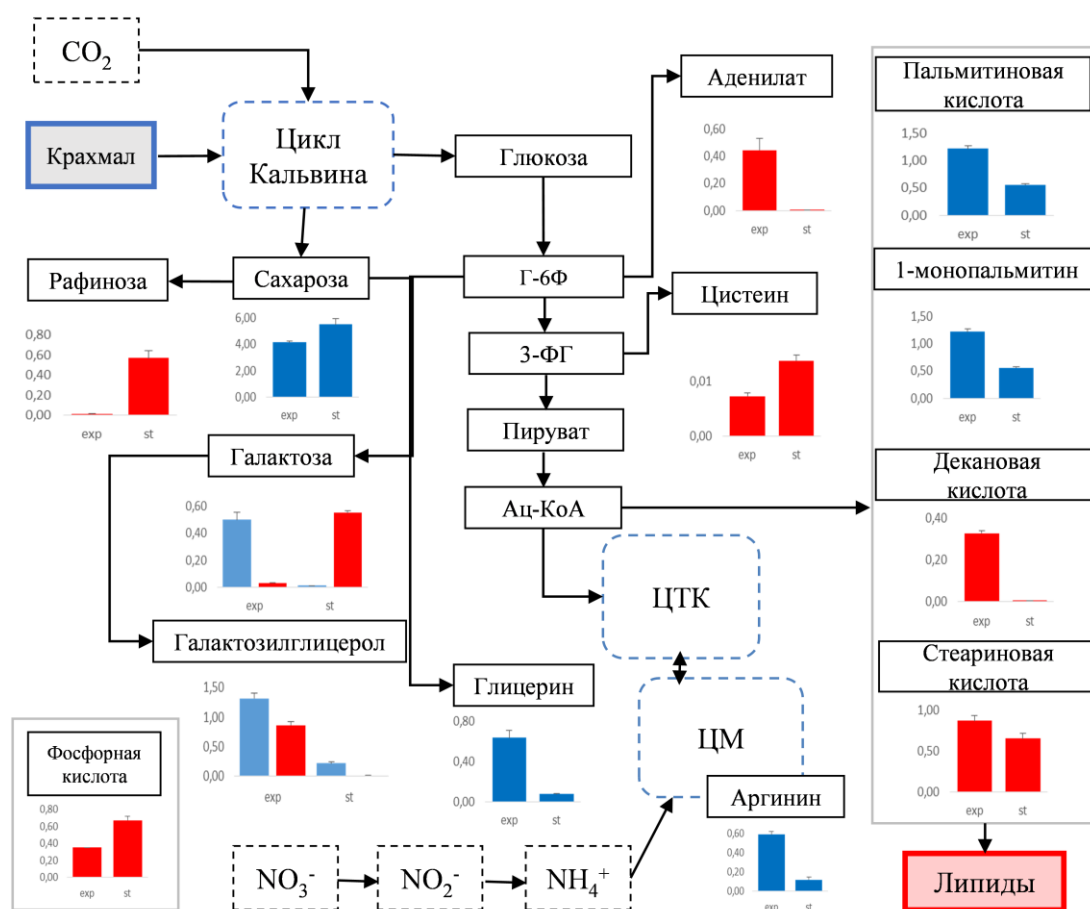


Рисунок 6 – Схема метаболизма *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе на среде BBM. Условные обозначения: Красными столбцами отмечена среда BBM-S, синими – BBM. Exp – экспоненциальная фаза роста, st – стационарная

Анализ метаболизма на среде BBM-S (Рисунок 6) выявил увеличение концентрации галактозы и раффинозы (в 17.3 и 43.3 раза, соответственно) в стационарной фазе роста по сравнению со средой BBM. Отмечалось увеличение концентрации цистеина (в 1.9 раза) в среде BBM-S. По сравнению со средой BBM, в среде WW-S (Рисунок 7) во время накопления липидов отмечено выраженное снижение концентрации аденилата, как части пуринового метаболизма,

что указывает на переключение процесса накопления энергии в стационарной фазе с синтеза высокоэнергетических нуклеотидов на синтез липидов.

Наибольшие изменения при культивировании на среде WW (Рисунок 7) наблюдались в метаболизме аргинина и пролина (индекс воздействия > 0.1 , содержание пролина в стационарной фазе уменьшилось в 72 раза), а также в цикле лимонной кислоты (содержание лимонной кислоты в стационарной фазе уменьшилось в 5.1 раза). Наиболее заметное увеличение концентрации моносахаридов (сахароза, раффиноза, галактоза), как при культивировании в среде WW, так и в WW-S, было отмечено в стационарной фазе роста. Эти метаболиты можно рассматривать как индикаторы процесса переключения метаболизма на синтез нейтральных липидов, происходящего в солевой среде.

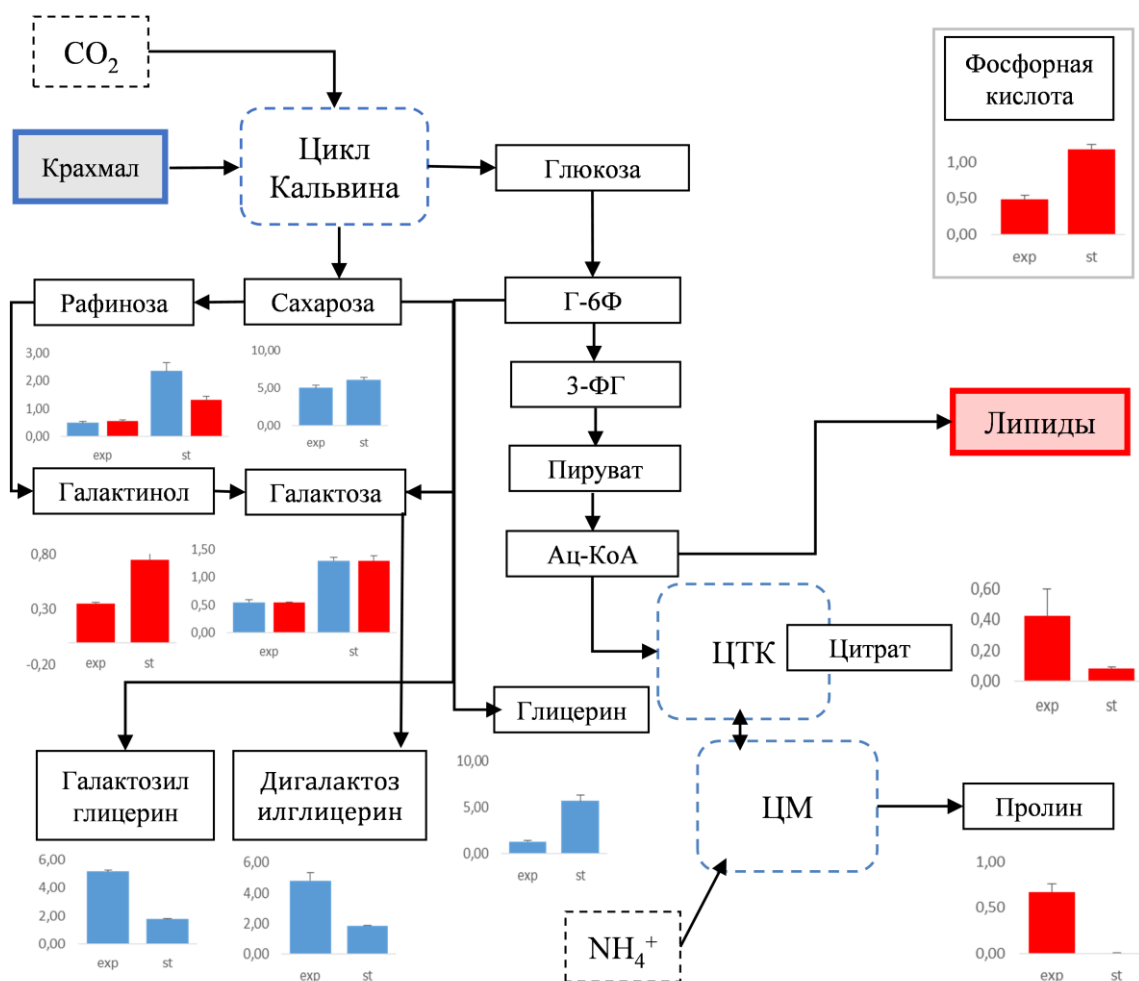


Рисунок 7 – Схема метаболизма *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе на среде WW. Красными столбцами отмечена среда WW-S, синими – WW. Эксп – экспоненциальная фаза роста, st – стационарная

3.6 Сравнительная характеристика штаммов микроводорослей, исследованных в работе

Штамм *C. vulgaris* A1123 обладал сравнимым уровнем накопления липидов со штаммами, описанными в литературе. Штаммы *C. vulgaris* A1123, *S. abundans* A1175, *C. sorokiniana* A1135 обладали наибольшим содержанием НЖК, при этом *S. abundans* A1175 обладал наибольшим

суммарным содержанием НЖК и МНЖК ($72.8 \pm 5.8\%$) при культивировании на среде ВВМ. Штаммы *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76, обладали меньшим уровнем накоплением липидов по сравнению с другими штаммами (среда ВВМ), однако большим уровнем НЖК при культивировании в WW. *S. abundans* A1175 обладал сходными характеристиками по накоплению липидов с аналогичными (среда ВВМ), при этом он содержит больше C18:0 и меньше C18:1, что позволит получать на его основе более устойчивое к окислению биотопливо с большей энергетической емкостью. Штаммы *P. kessleri*, описанные в литературе, в основном обладали высоким уровнем накопления липидов, в отличие от исследованных в данной работе. Штамм *C. sorokiniana* IPPAS C-1 по своим показателям продукции углеводов и липидов сравним с показателями аналогичных штаммов, а также обладает высоким уровнем накопления биомассы. Штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 пригодны для получения как углеводов, так и липидов (с повышенным содержанием ПНЖК) на среде ВВМ. Штамм *S. abundans* A1175 применим для получения липидов с высоким содержанием НЖК и МНЖК и относительно высоким содержанием углеводов на среде ВВМ.

При сравнении штаммов, исследованных в работе при культивировании на среде WW, относящихся к *C. sorokiniana*, *Micractinium* sp. и *P. kessleri*, выявлено, что они обладают меньшей эффективностью накопления биомассы и липидов по сравнению с аналогичными штаммами, описанными в литературе. Суммарное содержание НЖК и МНЖК при культивировании исследованных штаммов на WW превышало аналогичное значение при культивировании на ВВМ. Выявлено, что при культивировании на средах ВВМ и WW у всех исследованных в работе штаммов не происходит накопления C18:3, в отличие от аналогичных штаммов, описанных в литературе. Солевой стресс вызывал накопление липидов у *P. kessleri* IC-11, однако в меньшем количестве, чем у аналогичных штаммов. У протестированных штаммов микроводорослей был обнаружен эффект переключения метаболизма на синтез липидов в экспоненциальной фазе роста.

В целом, все протестированные в работе штаммы (*C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44, *Micractinium* sp. IC-76 и *P. kessleri* IC-11) обладали высокой способностью очистки вод от NH_4^+ , NO_3^- и PO_4^{3-} , при этом мало влияли на ХПК среды WW. Таким образом, указанные штаммы целесообразно применять для очистки сточных вод с низким уровнем ХПК или использовать для вторичной или третичной очистки сточных вод.

3.7 Нарabотка биомассы микроводорослей в лабораторной установке

Наработку биомассы проводили в лабораторной установке объемом 110 л ($0.2 \text{ м} \times 1.5 \text{ м} \times 1.0 \text{ м}$). Показано, что общее содержание липидов в биомассе *Micractinium* sp. IC-44 составило $11.5 \pm 0.5\%$ в стационарной фазе роста, что сравнимо с со штаммом *Micractinium* sp. IC-76 ($11.3 \pm 1.2\%$). Двумя основными жирными кислотами, присутствующими в биомассе на всех фазах роста, были C16:0 и C18:2. Содержание НЖК и МНЖК у *Micractinium* sp. IC-76 в стационарной фазе роста составило $44.1 \pm 1.3\%$, у *Micractinium* sp. IC-44 – $48.4 \pm 4.3\%$, что позволяет

использовать их биомассу, наработанную в установке, для получения МЭЖК. Содержание углеводов у *P. kessleri* IC-11 составило $34.3 \pm 2.3\%$ (глюкоза - 76 %, галактоза - 17 %, ксилоза - 6 % и манноза - 1 %). Биомасса этого штамма может использоваться для получения химических веществ, в том числе путем каталитической переработки в муравьиную кислоту [Gromov, 2020].

Глава 4. Получение ферментных препаратов для применения в реакциях гидролиза и переэтерификации органических веществ

4.1 Получение ферментов, применяемых в реакциях гидролиза органических веществ

Выделение чистых культур термофильных липолитических микроорганизмов (10 шт.) проводили из образцов компоста, отобранных в Новосибирской области и Республике Тыва при 37 – 65 °C на среде LB с 1% трибутирином. Для клонирования использована выделенная бактерия *Ureibacillus thermosphaericus* UT1, как обладающая значительной способностью к росту при высокой температуре (65 °C) и белки которой не были охарактеризованы, у которой был выбран ген (estUT1), гомологичный последовательности эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* (WP016838941.1).

Сравнение аминокислотных последовательностей estUT1 с последовательностями белков семейства XIII (идентичность 41 – 47%, схожесть 61 – 65%) выявило наличие уникального

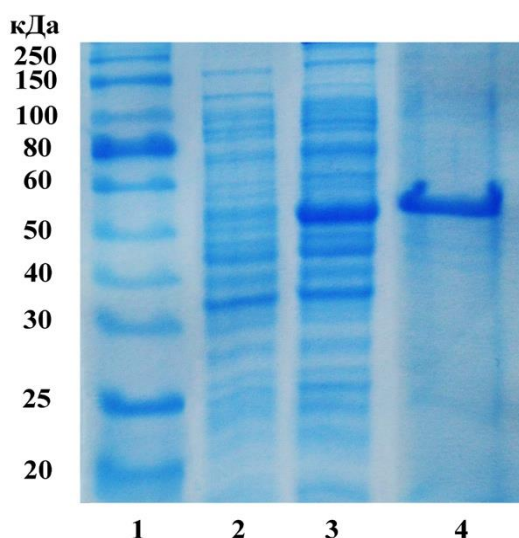


Рисунок 8 – Анализ экспрессии эстеразы estUT1-TrxA в клетках *E. coli* BL21(DE3) методом SDS-PAGE [Samoylova, 2018]. 1 – маркер молекулярного веса белков; 2 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b(+); 3 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1; 4 – очищенная с помощью аффинной хроматографии нерастворимая фракция белка (estUT1-TrxA) после растворения и рефолдинга телец включения

консервативного мотива GVSLG. Согласно классификации по Hitch 2019 г [Hitch, 2019], estUT1, относится к XIII семейству липолитических ферментов. Для клонирования кодирующей последовательности estUT1 использовали вектор pET32b(+), что позволяет получать эстеразу, соединенную с дополнительным доменом, состоящим из белка TrxA *E.coli* (фермент estUT1-TrxA), что повышает растворимость целевого белка [LaVallie, 1993]. Последовательная очистка фермента привела к получению белка с удельной активностью 12.5 ЕА мг⁻¹ (выход 18%). SPS-PAGE анализ полученного белка (Рисунок 8) показал наличие белка с массой ~52 кДа (estUT1-TrxA). Показано, что estUT1 относится к суперсемейству α/β -гидролаз, в его

состав входят семь β -слоев и восемь α -спиралей, активный центр формируют Ser93, Asp192 и

His222. Сайт-направленный мутагенез кодонов, кодирующих каталитическую триаду фермента, выявил отсутствие липолитической активности у мутантных форм (относительная активность estUT1-S93A-Mut, estUT1-D192N-Mut и estUT1-H222L-Mut составила 2.2 ± 0.8 , 0.9 ± 0.2 и $1.7 \pm 0.3\%$, соответственно). Анализ свойств estUT1 приведен на Рисунке 9. Выявлено, что фермент специфичен к короткоцепочечным остаткам жирных кислот (C_2 , C_4) с максимальной специфичностью к C_2 (K_M 0.098 ± 0.013 мМ), однако отличается по этому параметру от других представителей XIII семейства. pH-оптимум estUT1 находится при pH 8.0, фермент стабилен в течение 1 ч при 50 °C при pH 5.0 – 9.0 (сохраняет более 95% от начальной активности). Выявлено, что температурный оптимум этой эстеразы находится при 70 – 80 °C, что превышает типичный оптимум термостабильных эстераз, находящийся при 40 – 60 °C [Brod, 2010]. EstUT1 сохраняла свыше 69% от первоначальной активности при 50 – 70 °C через 6 ч инкубации ($t_{1/2}$ при 60 °C около 15 ч) и близка по этому параметру к эстеразе *Bacillus* sp. 4 [Ateşlier, 2006].

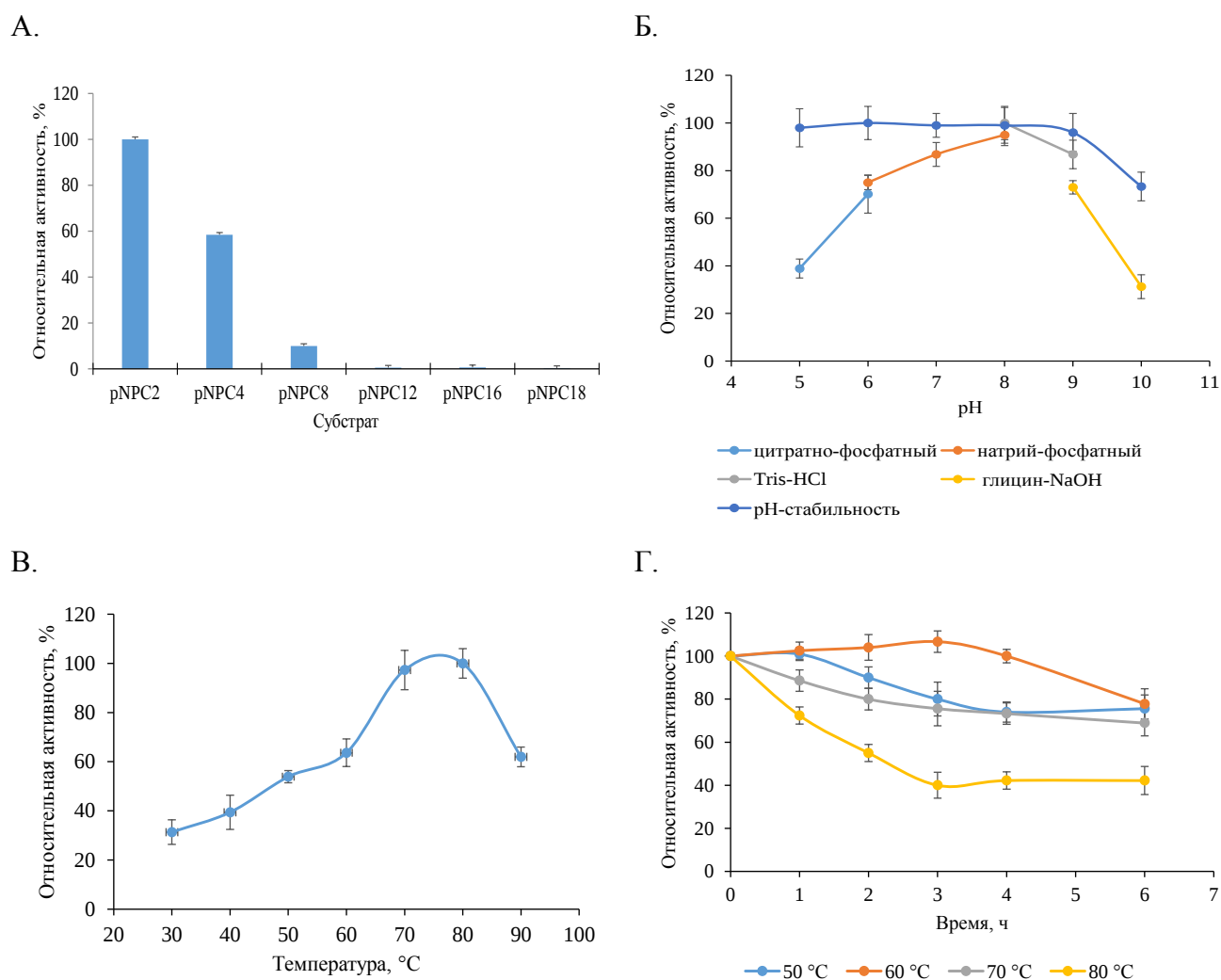


Рисунок 9 – Анализ свойств эстеразы EstUT1. (А) Специфичность, (Б) Активность и стабильность при различных pH, (В) Активность при различных температурах, (Г) Термостабильность

Изопропанол, *n*-бутанол и ацетонитрил практически не влияли на активность эстеразы в концентрации 10 – 30%, в отличие от этанола, метанола, гексана, ацетона и ДМФА, которые достоверно повышали относительную активность фермента свыше 110% ($p < 0.05$, парный двухвыборочный *t*-тест). Достоверно снижали активность estUT1 такие растворители, как ДМСО и хлороформ (в концентрации 30%) до 65.2 ± 1.9 и $41.6 \pm 2.3\%$ активности, соответственно. CuSO_4 и MgSO_4 достоверно ($p < 0.05$) ингибировали его активность, которая в этих условиях составила 30 – 45 и 37 – 38% (для 1 и 10 мМ солей), соответственно. Наоборот, FeSO_4 в концентрации 10 мМ достоверно ($p < 0.05$) активировал estUT1 ($152.5 \pm 2.4\%$). Показано, что поверхностно-активные вещества (Твин 20, Твин 80 и Тритон X-100) достоверно ($p < 0.05$) снижали активность estUT1. Наибольшим влиянием на estUT1 обладал Тритон X-100 (относительная активность $21.7 \pm 3.4\%$), при этом 10 мМ SDS оказывал на фермент лишь небольшое влияние ($85.8 \pm 2.2\%$). Присутствие 10 мМ PMSF снижало активность эстеразы до $11.9 \pm 1.1\%$, что является следствием его взаимодействия с остатком серина в активном центре фермента. Таким образом, высокая стабильность фермента в различных условиях позволяет применять его в различных процессах, связанных с гидролизом сложноэфирных соединений с коротким радикалом.

Для увеличения синтеза рекомбинантной эстеразы в клетках *E. coli* в работе применена коэкспрессия с белками-шаперонами, что позволяет повысить растворимость целевого белка [de Marco, 2007]. Обнаружено, что коэкспрессия estUT1-TrxA с шаперонами *E. coli* KJE, ClpB и ELS повысила удельную активность estUT1 в растворимой фракции белка в лизате клеток штамма-продуцента до 200.7 ± 15.5 ЕА мг^{-1} по сравнению с клетками, не экспрессирующими белки фолдинга (22.6 ± 1.7 ЕА мг^{-1}).

Показано, что синтез estUT1 в *E. coli* осуществляется только при наличии домена TrxA, слитого с estUT1 [Сорокина, 2019]. Выявлено, что estUT1 без домена TrxA обладает большей активностью при 70 °С (3.13 ± 0.17 и 10.4 ± 10.6 ЕА мг^{-1} с TrxA и без TrxA, соответственно). Также показано увеличение термостабильности estUT1 без домена TrxA: при инкубации при 70 °С в течение 1 ч относительная активность повысилась от 45.2 ± 1.7 до $65.8 \pm 2.5\%$, а при 90 °С – от 35.4 ± 1.9 до $57.3 \pm 2.9\%$. Анализ влияния дополнительного домена TrxA на свойства estUT1 выявил, что несмотря на снижение удельной активности фермента и термостабильности, а также увеличение K_m , остальные свойства (оптимум температурной и pH активности) остались на прежнем уровне, что позволяет использовать фермент estUT1-TrxA в биокаталитических реакциях.

4.2 Получение ферментных препаратов

Липаза *G. stearothermophilus* G3 обладает специфичностью к pNPC16, а также оптимумом активности при 50 °С и pH 8.0 – 9.0. Приготовление иммобилизированной липазы БКЛ проводили методом ковалентной иммобилизации фермента с удельной активностью 483.2 ЕА г^{-1} [Сорокина, 2013] на активированном силикагеле АСКГ. Относительная активность липазы IcD составила 8.7%, а удельная активность БКЛ – 23.6 ЕА г^{-1} .

Для приготовления ферментного препарата на основе эстеразы estUT1 был использован фермент estUT1-TrxA с удельной активностью 200.7 ± 15.5 ЕА мг⁻¹, полученный путем коэкспрессии с комбинацией шаперонов *E. coli* KJE, ClpB и ELS и выделенный из растворимой фракции белка в лизате клеток. Для оптимизации процесса приготовления estUT1-TrxA методом ПСФА был использован метод RSM и получена модель, описывающая влияние параметров реакции (время реакции 1 – 8 ч, концентрация сульфата аммония 30 – 80%, глутарового альдегида 25 – 150 мМ и БСА 0.01 – 0.2 мМ) на относительную активность ПСФА (IcD). По данным экспериментов были определены коэффициенты уравнения полной регрессионной модели и их статистическая значимость, разработана полиномиальная модель второго порядка, описываемая следующим уравнением:

$$\begin{aligned} \text{IcD}_{\text{пр}} = & 66.18 + 4.74A + 6.70B + 7.78C + 13.84D + 3.28AB + 2.12AC + 0.50AD + 0.45BC \\ & + 1.13BD - 0.47CD - 23.67A^2 - 10.69B^2 - 7.42C^2 + 7.32D^2, \end{aligned} \quad (1)$$

где $\text{IcD}_{\text{пр}}$ – прогнозируемая относительная активность ПСФА, A – время реакции, B – концентрация сульфата аммония, C – концентрация глутарового альдегида и D – концентрация БСА.

Значимыми факторами для приготовления ПСФА-estUT1-TrxA являются время реакции и концентрация БСА ($p < 0.0001$). Регрессионный анализ статистической значимости модели RSM показал, что F-фактор равен 33.36, $p < 0.0001$, что говорит о высокой статистической значимости модели. Оптимальными условиями для приготовления ПСФА-estUT1-TrxA с $\text{ImD}_{\text{пр}}$ 91.3% являлись: 65.1% сульфата аммония, 120.6 мМ глутарового альдегида, 0.2 мМ БСА, 5.1 ч реакции, экспериментальное значение степени иммобилизации составило $90.6 \pm 2.7\%$ ($P = 0.95$).

Для применения в процессах переэтерификации липидов микроводорослей использовалась коммерческая термостабильная липаза бактерии *Burkholderia cepacia*, которая характеризуется высокой устойчивостью к метанолу. В качестве ферментного препарата, предназначенного для применения в переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76, использовались ПСФА, поскольку такой тип ферментных препаратов менее изучен в реакции переэтерификации липидов микроводорослей. В работе проведено приготовление ферментного препарата КатА на основе *B. cepacia* методом ПСФА, его активность составила 0.143 ± 0.005 ЕА г⁻¹, относительная активность - 97.5% [Piligaev, 2018].

Глава 5. Комплексные подходы к переработке компонентов биомассы в востребованные продукты

Схема работ по получению востребованных продуктов из возобновляемой биомассы в данном исследовании приведена на Рисунке 10. Многообразие подходов позволяет с наибольшей эффективностью перерабатывать различные виды биомассы и ее компоненты в вещества, востребованные в промышленности.

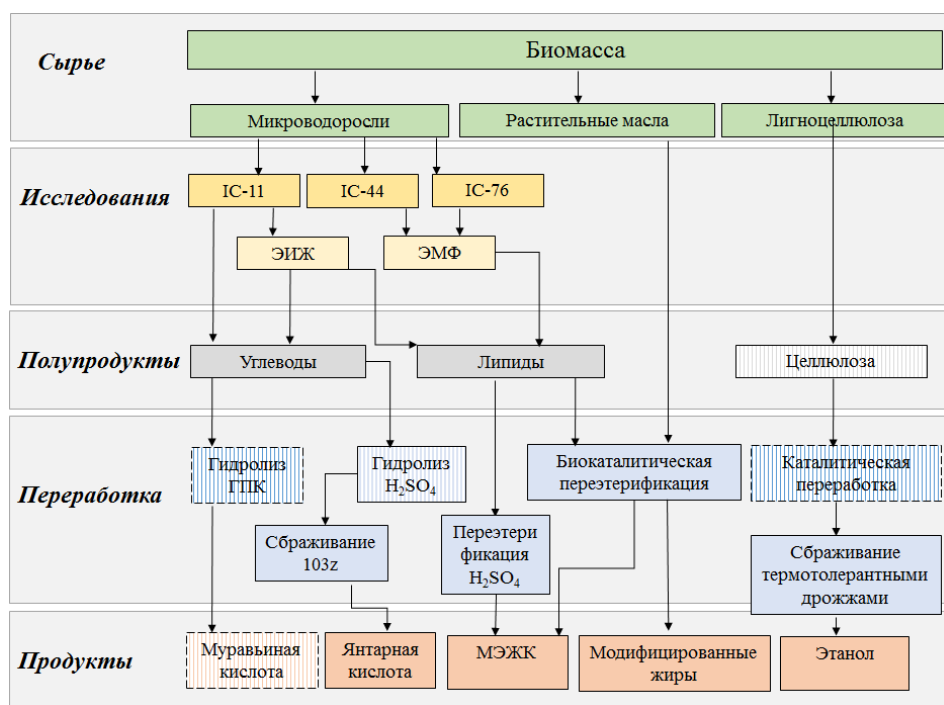
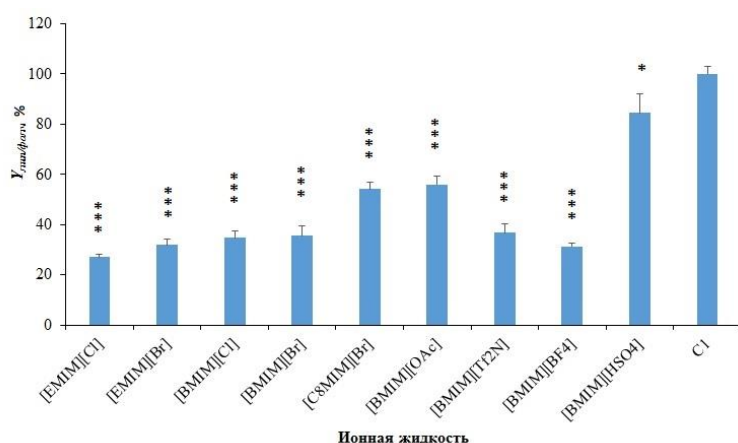


Рисунок 10 – Схема работ по переработке возобновляемого сырья в востребованные продукты. Условные обозначения: ЭИЖ – экстрагирование ионными жидкостями, ЭМФ – экстрагирование методом Фолча. Номерами обозначены штаммы, использованные в работе. Продукты, получаемые вне этой работы, отмечены штрихом

6.1 Переработка биомассы микроводорослей с высоким содержанием липидов и углеводов

Для определения оптимального пути получения МЭЖК и янтарной кислоты предложена комплексная схема переработки липидсодержащей биомассы *Micractinium* sp. IC-44 (Рисунок 10), партия которой была получена ранее в лабораторной установке (Глава 4). Выявлено (Рисунок 11А), что эффективность экстрагирования липидов из биомассы *Micractinium* sp. IC-44 с использованием ИЖ была значительно ниже, чем по методу Фолча ($p < 0.001$, двухвыборочный односторонний t-тест) для всех ИЖ, кроме [BMIM][HSO₄] ($p < 0.05$). При использовании этой ИЖ выход липидов относительно выхода липидов, полученных методом Фолча, составил $Y_{\text{липид}}/\text{Фолч} = 84.5 \pm 7.6\%$. Максимальный выход МЭЖК ($Y_{\text{МЭЖК}}/\text{Фолч} = 42.0 \pm 4.3\%$) наблюдался после прямой перэтерификации (Рисунок 11Б) с использованием [BMIM][HSO₄] в присутствии 2% H₂SO₄, что значительно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) превышало выход МЭЖК, полученный после экстрагирования по Фолчу и последующей перэтерификации кислотой ($27.1 \pm 2.4\%$) или прямой кислотной перэтерификации биомассы без использования ИЖ ($31.6 \pm 1.7\%$) (Рисунок 11Б). Остаточную биомассу, полученную после прямой перэтерификации биомассы в присутствии [BMIM][HSO₄], гидролизовали 2% H₂SO₄ в автоклаве при 130 °С в течение 90 мин. Гидролизат нейтрализовали аммиаком и очищали на смоле AmberChrom 50WX4 для удаления ингибиторов, затем сбраживали *A. succinogenes* 130Z (Рисунок 12). Выход янтарной кислоты в этой работе по окончании сбраживания гидролизата составил $67.0 \pm 5.0\%$ от общего количества моносахаридов через 34 ч, что несколько меньше, чем другие биотехнологические способы, используемые для получения этого вещества. Такой подход иллюстрирует возможность получения двух востребованных продуктов (МЭЖК и янтарной кислоты) из биомассы микроводорослей.

А.



Б.

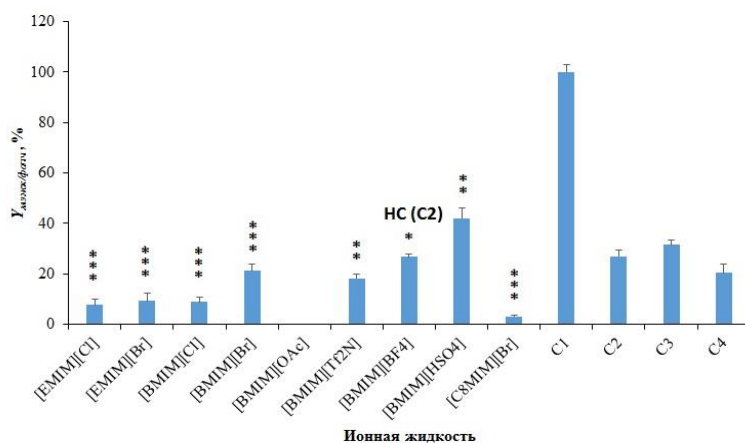


Рисунок 11 – Анализ эффективности экстракции и прямой переэтерификации липидов биомассы *Micractinium* sp. IC-44 ионными жидкостями (А) Относительный выход липидов после экстракции ИЖ, (Б) Влияние ионных жидкостей на выход МЭЖК при прямой переэтерификации биомассы. C1 – экстракция липидов по Фолчу (принята за 100%). C2 - Экстракция липидов по Фолчу с последующей переэтерификацией H₂SO₄; C3 - Прямая переэтерификация биомассы метанолом и H₂SO₄ (без ИЖ). C4 - экстракция липидов [BMIM][HSO₄] с последующей переэтерификацией H₂SO₄. **p* < 0.05; ****p* < 0.01; *****p* < 0.001 двухвыборочный односторонний t-тест. НС - указывает на статистически незначимые отличия от соответствующего контроля (*p* > 0.05)

В качестве альтернативного способа переработки липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 использовали биокаталитический подход с использованием ферментного препарата КатА. Для оптимизации реакции переэтерификации липидов применяли метод RSM. В реакции переэтерификации варьировали следующие параметры: температура (30 – 60 °С), количество КатА (5.75 – 20.0%), молярное соотношение метанол : липиды (4.75:1 – 10:1) и концентрацию воды (0 – 5.0%) [Piligaev, 2018]. Наибольший Y_{МЭЖК} по данным предварительных экспериментов составил 92.5% (при концентрации КатА 5.75%, температуре 37.5 °С, концентрации воды 3.75% и молярном соотношении метанол : липиды 4.75:1). На основании проведенных предварительных экспериментов была разработана полиномиальная модель второго порядка. По данным регрессионного анализа концентрация воды не оказывала значимого (*p* = 0.3534) влияния на выход МЭЖК, этот фактор был исключен из модели. Уравнение 2, описывающее оптимизированную модель, приведено ниже:

$$Y_{np2} = 83.69 + 2.41A - 6.30B - 4.54D + 0.13AB - 0.43AD + 0.81BD - 2.78 \times A^2 - 5.05B^2 - 0.13D^2, \quad (2)$$

где Y_{np2} – прогнозируемый выход МЭЖК в реакции переэтерификации в соответствии с оптимизированной моделью, описываемой Уравнением 2, А – количество КатА, В – температура и D – соотношение метанол : липиды.

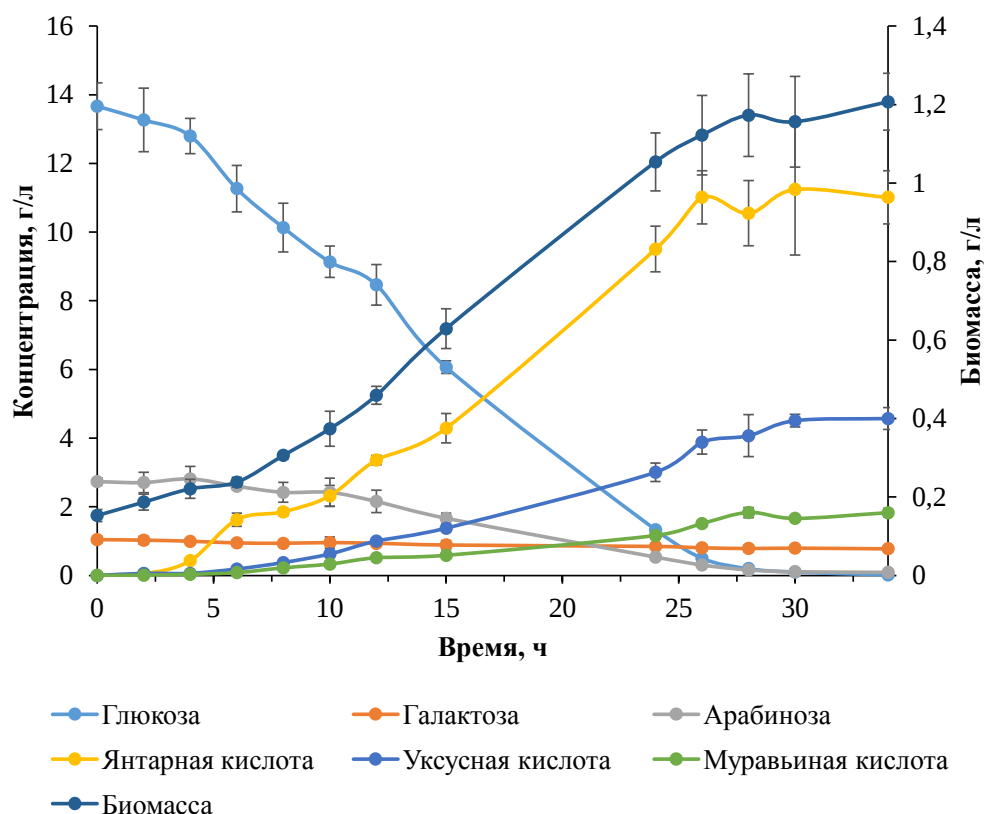


Рисунок 12 – Культивирование *A. succinogenes* 130Z на гидролизате остаточной биомассы *Micractinium* sp. IC-44, полученном после прямой переэтерификации липидов в присутствии [BMIM][HSO₄]

Регрессионный анализ оптимизированной модели реакции переэтерификации выявил, что качество модели увеличилось за счет увеличения значения F -критерия с 13.49 до 21.7. По данным улучшенной модели, оптимальными условиями реакции, обеспечивающими наибольший $Y_{пр2}$ являлись: 39.8 °С, концентрация Ката 12.3%, соотношение метанол : липиды 1:3.5, концентрация воды 2.3%. Экспериментальная проверка полученной модели (Уравнение 2) в оптимальных условиях показала, что $Y_{МЭЖК}$ составляет $92.1 \pm 0.7\%$, что согласуется с $Y_{пр2}$ (92.6%, $P = 0.99$), что позволяет использовать эту модель для предсказания $Y_{МЭЖК}$ при переэтерификации липидов *Micractinium* sp. IC-76 с метанолом в присутствии Ката.

Оценка операционной стабильности Ката в оптимальных условиях показала, что через четыре цикла эксплуатации (один цикл – 24 ч) активность составляет $45.7 \pm 4.8\%$ при начальной активности (первый цикл) $92.9 \pm 0.8\%$. Таким образом, Ката может быть использован для получения МЭЖК из липидов микроводорослей при относительно низкой температуре реакции и концентрации Ката, однако для его эффективного применения в этом процессе необходима дополнительная очистка сырья перед проведением реакции.

5.2 Биокаталитическая переработка растительных масел для получения метиловых эфиров жирных кислот и модифицированных жиров

Для анализа эффективности применения ферментного препарата БКЛ в реакциях переэтерификации был проведен последовательный подбор параметров реакций. Выявлено, что наибольший выход МЭЖК, равный 44%, достигается в реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом в следующих условиях: количество БКЛ 20%, температура реакции 40 °С, мольное соотношение метанол : масло 3:1, содержание *трет*-бутанола 4 мл, содержание воды 4%. Анализ операционной стабильности БКЛ в этих условиях показал, что $t_{1/2}$ составляет 477 ч, после двадцати циклов (1 цикл – 24 ч) реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом его активность составляет 52.3% от исходной, а выход МЭЖК – 22.9% [Самойлова, 2015]. При анализе эффективности применения БКЛ в реакции переэтерификации гидрированного соевого масла и подсолнечного масла для получения модифицированных пищевых жиров выявлено, что иммобилизованный ферментный препарат обладает высокой операционной стабильностью в оптимальных условиях эксплуатации (10% БКЛ, молярное соотношение гидрированное соевое масло : подсолнечное масло 1:3, 70 °С, 1 цикл 24 ч). Через 120 ч эксплуатации (5 циклов) БКЛ сохранил 56.4% от своей первоначальной активности (ID 28.8%), расчетное $t_{1/2}$ составило 121 ч. Анализ продуктов реакции переэтерификации (2 ч реакции в оптимальных условиях) показал, что концентрация насыщенных жиров снижалась при переэтерификации. Обнаружены следующие триацилглицериды: SOS (2.9%), OLO (5.1%), SLL (8.7%), SOL (6.5%), SOO (10.6%) [Самойлова, 2016]. Наблюдалось снижение содержания ненасыщенных триацилглицеридов (LLL, LLP и LOL), что способствует стабильности продуктов реакции переэтерификации к окислению на воздухе [Neff, 1994].

Сравнение полученных результатов с литературными данными показывает, что иммобилизованный препарат БКЛ является менее эффективным для применения в реакциях переэтерификации масел (по сравнению с коммерческим препаратом Lipozyme TL), однако обладает высокой стабильностью. Низкая активность иммобилизованного фермента может быть связана как с низкой активностью ферментного препарата, использованного для иммобилизации, так и с диффузионными ограничениями самого биокатализатора [Bhardwaj, 2017].

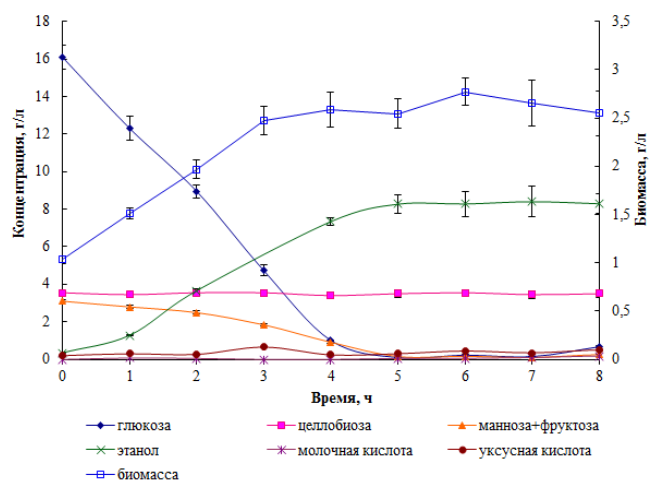
5.3 Сбраживание продуктов каталитического гидролиза целлюлозы для получения этанола

В качестве альтернативного способа получения химических веществ из лигноцеллюлозы в последнее время применяют гетерогенные кислотные катализаторы на углеродной основе, что позволяет получать не только глюкозу, но также продукт ее последующей дегидратации – 5-ГМФ [Громов, 2014]. Глюкоза, как один из основных продуктов реакции гидролиза целлюлозы, может служить основным субстратом для получения востребованных веществ путем сбраживания, включая этанол [Ha, 2011]. Для снижения энергопотребления процесса сбраживания ранее было предложено использование термотолерантных дрожжей, таких как *K. marxianus* [Castro, 2014] и *O. polymorpha* [Ryabova, 2003], что снижает стоимость охлаждения культуральной жидкости [Pasha, 2009], а также уменьшает рост сопутствующей микрофлоры.

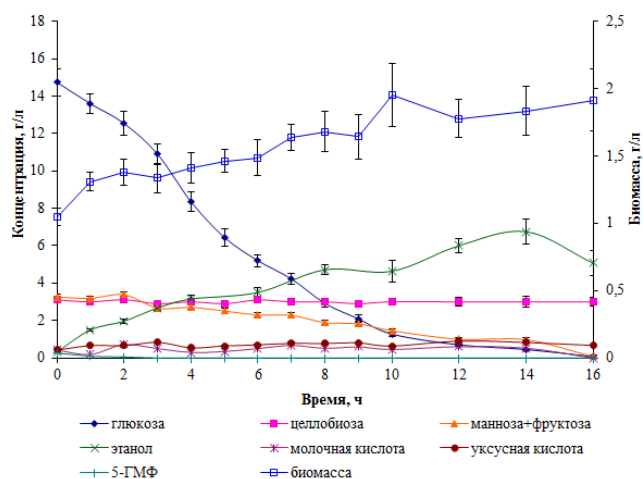
В качестве субстрата для сбраживания дрожжами в работе использовали механически активированную микрокристаллическую целлюлозу, гидролизованную с использованием углеродного материала Сибунит-4-окс в условиях, при которых наблюдался максимальный выход глюкозы 23.1 ± 1.5 мол.%, выход 5-ГМФ при этом составил 8.0 ± 1.4 мол.% [Sorokina, 2017]. 5-ГМФ экстрагировали из смеси изобутанолом, как наименее токсичным для клеток растворителем и упаривали до получения раствора с концентрацией (г л⁻¹): целлобиоза - 3.0 ± 0.1 ; глюкоза - 15.0 ± 1.0 ; манноза - 2.0 ± 0.1 ; фруктоза - 1.3 ± 0.1 ; 5-ГМФ - 0.3 ± 0.1 ; муравьиная кислота - 0.4 ± 0.0 ; гликолевая кислота - 1.4 ± 0.2 ; молочная кислота - 0.6 ± 0 ; винная кислота - 0.3 ± 0.1 ; изобутанол - 0.1 ± 0 . Далее проводили выделение термотолерантных дрожжей, растущих при температурах выше 40 °С. Идентификация полученных чистых культур по последовательностям 18S рРНК показала, что большинство из них принадлежит к видам *K. marxianus* (9 штаммов), а также к *Clavispora lusitaniae* (1 штамм) и *Pichia kudriavzevii* (1 штамм). Помимо выделенных штаммов, в этом исследовании также использовался термотолерантный штамм дрожжей *O. polymorpha* CBS4732, который ранее не применялся для сбраживания гидролизатов биомассы. Выявлено, что все штаммы дрожжей способны расти при 42 °С на средах, содержащих углеводы, входящих в состав гидролизата (в концентрации 20.0 г л⁻¹), за исключением среды с целлобиозой, при культивировании на которой накопление биомассы снижалось. При повышении температуры до 45 – 48 °С накопление биомассы оставалось высоким только для штаммов *K. marxianus* C1 (до 48 °С) [Сорокина, 2017] и *O. polymorpha* CBS4732 (до 45 °С), оптимальной температурой являлась 42 °С. Анализ устойчивости выделенных штаммов дрожжей к ингибиторам сбраживания выявил, что 5-ГМФ, фурфурол, уксусная и муравьиная кислота обладают наибольшим влиянием на прирост их биомассы. Штамм *K. marxianus* C1 обладает наибольшей чувствительностью к фурфуролу с IC₅₀ 0.67 ± 0.02 г л⁻¹ ($p < 0.05$). *O. polymorpha* CBS4732 имеет самую высокую чувствительность к уксусной кислоте (IC₅₀ 0.39 ± 0.03 г л⁻¹), при этом обладает наибольшей устойчивостью к производным фурана (фурфуролу - IC₅₀ 1.25 ± 0.10 г л⁻¹ и 5-ГМФ - IC₅₀ 2.44 ± 0.18 г л⁻¹).

Для подготовки гидролизата к сбраживанию проводили его нейтрализацию до pH 4.75. Показано, что наибольший прирост биомассы наблюдался при использовании NH₄OH. Выявлено, что оба штамма дрожжей продуцируют этанол на средах, содержащих гидролизат целлюлозы (YNB-H) с относительно высокими выходом, но меньшим, чем при культивировании в модельной среде, по составу сахаров идентичной гидролизату (YNB-M) (Рисунок 13, Таблица 1). Скорость накопления этанола, а также удельная скорость роста для обоих штаммов были меньше, чем на модельной среде. У обоих штаммов обнаружен относительно высокий теоретический выход этанола при культивировании на среде YNB-H по сравнению с YNB-M ($Y_e 72.0 \pm 5.7\%$ для *K. marxianus* C1 и $75.2 \pm 4.3\%$ для *O. polymorpha* CBS4732), а также

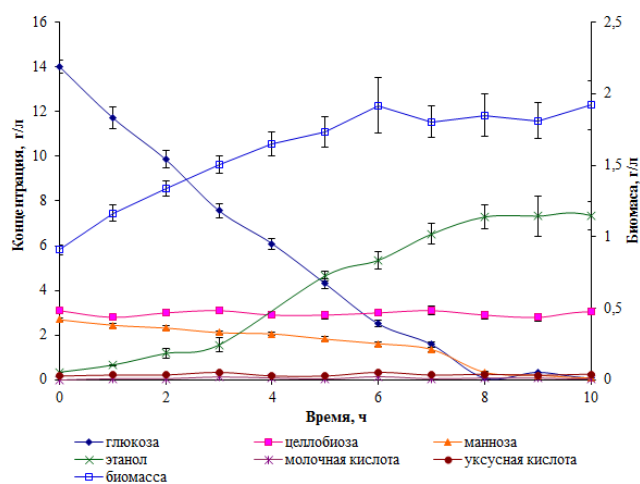
А.



Б.



В.



Г.

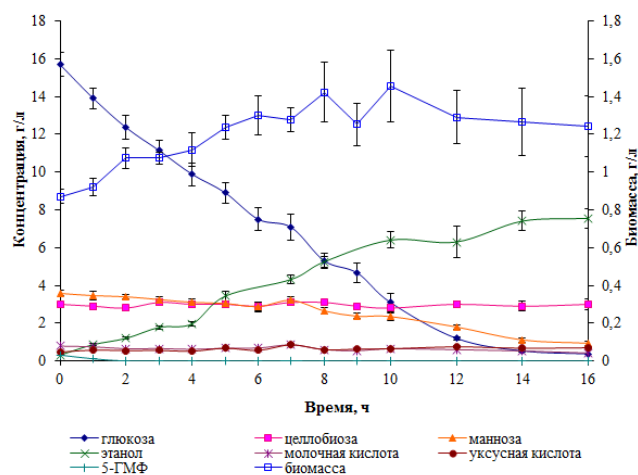


Рисунок 13 – Культивирование дрожжей *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-H и YNB-M. (А) Культивирование *K. marxianus* C1 на среде YNB-M, (Б) Культивирование *K. marxianus* C1 на среде YNB-H, (В) Культивирование *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-M, (Г) Культивирование *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-H

Таблица 2 – Анализ состава культуральной жидкости и параметры культивирования штаммов дрожжей *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 на средах YNB-M и YNB-H

Параметр/компонент	Эксперимент			
	S1 ^а	S2 ^б	S3 ^в	S4 ^г
Глюкоза ^д , г л ⁻¹	16.1 ± 0.6	14.7 ± 0.7	14.0 ± 0.3	15.7 ± 0.6
Маноза и фруктоза ^д , г л ⁻¹	3.1 ± 0.2	3.3 ± 0.2	2.7 ± 0.2	3.6 ± 0.2
Этанол ^е , г л ⁻¹	8.4 ± 0.2	6.8 ± 0.3	7.4 ± 0.3	7.6 ± 0.5
Вес биомассы ^е , г л ⁻¹	2.7 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.3 ± 0.2
V _е ^е , г л ⁻¹ ч ⁻¹	1.69 ± 0.10	0.41 ± 0.02	1.10 ± 0.05	0.53 ± 0.02
Y _{е/сс} ^е , г г ⁻¹	0.44 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.39 ± 0.03
Y _{б/сс} ^е , г г ⁻¹	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.1	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.00
Y _е ^е , % (от теоретического)	84.0 ± 4.2	72.0 ± 5.7	84.5 ± 5.0	75.2 ± 4.3
μ, ч ⁻¹	0.29 ± 0.01	0.06 ± 0.0	0.12 ± 0.01	0.07 ± 0.0

^а Культивирование *K. marxianus* C1 на среде YNB-M в течение 7 ч.

^б Культивирование *K. marxianus* C1 на среде YNB-H в течение 14 ч.

^в Культивирование *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-M в течение 10 ч.

^г Культивирование *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-H в течение 16 ч.

^д Состав исходной культуральной среды.

^е Состав культуральной среды в конце эксперимента.

способность снижать концентрацию 5-ГМФ в среде. Применение такого подхода демонстрирует альтернативный способ получения этанола из целлюлозосодержащего сырья.

Глава 6. Применение ферментного препарата ПСФА-estUT1-TrxA в реакции гидролиза малатиона

6.1 Анализ свойств ПСФА-estUT1-TrxA

При анализе свойств ПСФА-estUT1-TrxA выявлено отсутствие изменений в температурном оптимуме по сравнению с estUT1-TrxA. Время полуинаktivации ПСФА-estUT1-TrxA при 60 °C составило 22.5 ч, что превышает аналогичное значение для неиммобилизованного фермента. Кинетические исследования показали высокую каталитическую эффективность фермента в отношении гидролиза малатиона ($835.5 \pm 58.7 \text{ с}^{-1} \text{ mM}^{-1}$). Оптимум pH для обеих форм фермента не изменился и составил 8.0, при этом ПСФА-estUT1-TrxA обладал достоверно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) более высокой относительной активностью при pH 7.0 ($92.4 \pm 7.6\%$) и pH 9.0 ($90.3 \pm 4.7\%$). Также было обнаружено достоверное увеличение стабильности фермента ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) в диапазоне pH 5.0 – 7.0 и pH 9.0 – 10.0 по сравнению с estUT1-TrxA ферментом без изменения pH-оптимума. Выявлено, что активность ПСФА-estUT1-TrxA по сравнению с estUT1-TrxA после инкубации с 10 mM PMSF, дитиотреитолом, β -меркаптоэтанолом, 1% SDS и Твин-20 достоверно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) увеличивалась в 1.9, 1.2, 1.2, 1.5 и 1.6 раза, соответственно.

6.2 Применение ПСФА-estUT1-TrxA для гидролиза малатиона в различных средах

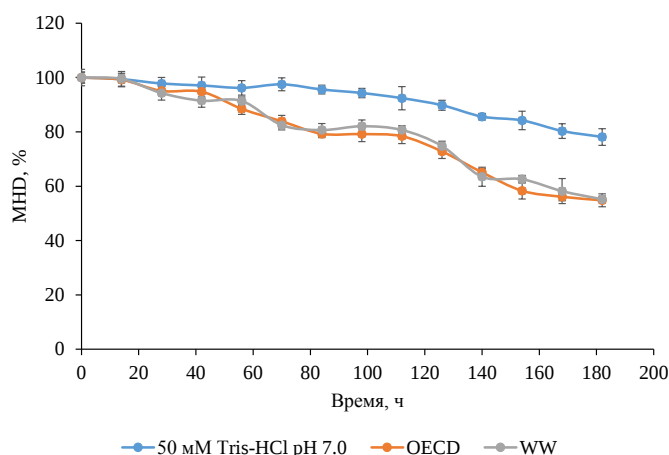


Рисунок 14 – Операционная стабильность ПСФА-estUT1-TrxA в реакции гидролиза малатиона.

Поскольку ПСФА-estUT1-TrxA способен с высокой эффективностью гидролизовать малатион, он был применен для гидролиза этого соединения в среде WW, моделирующую сточные воды, загрязненные этим пестицидом. Возможность многократного применения ПСФА-estUT1-TrxA была протестирована для реакции гидролиза малатиона (27.5 мг л^{-1}) при 37 °C в различных средах (Рисунок

14). Выявлено, что ПСФА-estUT1-TrxA обладает высокой стабильностью во всех исследованных

средах: 50 мМ Трис – HCl pH 7.0 ($t_{1/2}$ 30.7 $\pm$ 3.0 сут), OECD ($t_{1/2}$ 14.1 $\pm$ 0.4 сут) и WW ($t_{1/2}$ 14.8 $\pm$ 0.6 сут), обеспечивая степень гидролиза малатиона свыше 55% после 25 циклов реакции (350 ч) при 37 °C.

6.3 Оценка эффективности применения ПСФА-estUT1-TrxA для гидролиза малатиона

Сравнение биокаталитического подхода и применения микроорганизмов для биodeградации малатиона показывает, что в отличие от способа, использованного в этой работе, микробиальное биоразложение малатиона (на 50 – 80%) занимает от нескольких часов до 5 суток (*B. licheniformis* ML-1 [Khan, 2016]). В этой работе была успешно продемонстрирована способность ПСФА-estUT1-TrxA гидролизовать инсектицид малатион из среды WW. Эффективность удаления малатиона составила 99.4 $\pm$ 2.8% через 14 ч эксплуатации [Samoylova, 2018], что превосходит параметры карбоксиэстеразы D1CarE5 бактерии *A. tengchongensis* (удаляет 89% через 100 мин из Tris-HCl pH 7.0) [Xie, 2013]. Таким образом, применение ПСФА-estUT1-TrxA позволило эффективно гидролизовать малатион, что делает его перспективным для применения в процессах биodeградации инсектицидов, в том числе для очистки сточных вод.

Заключение

В работе продемонстрированы подходы комбинированной переработке компонентов биомассы в востребованные вещества, а также к гидролизу и переэтерификации химических веществ с использованием биокатализа. Выделен ряд перспективных штаммов микроводорослей, предназначенных для применения в качестве сырья для получения биодизельного топлива, отвечающего современным стандартам качества, а также для получения востребованных веществ (янтарной и муравьиновой кислот). Получены ферментные препараты, предназначенные для получения модифицированных жиров и МЭЖК, а также для применения в процессах водоочистки от инсектицида малатиона. Результаты работы могут быть востребованы для применения как в смежных работах по получению веществ с использованием микробиального синтеза, так и в разработке аналогичных процессов, сочетающих каталитические и биотехнологические подходы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что выделенные в ходе работы штаммы *Scenedesmus abundans* A-1175 и *Micractinium* sp. IC-44 имеют более высокое содержание насыщенных жирных кислот по сравнению с другими исследованными штаммами и могут быть использованы для получения биодизельного топлива.
2. Установлено, что при культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах в процессе накопления нейтральных липидов наибольшим изменениям у *Micractinium* sp. подвержены биохимические циклы, связанные с метаболизмом крахмала и углеводов. У *P. kessleri*, преимущественно продуцирующей углеводы, накопление нейтральных липидов индуцируется путем солевого стресса, что сопровождается накоплением эквивалентов энергии в цикле лимонной кислоты в экспоненциальной фазе, а также с окислением пролина в стационарной фазе роста.

3. С использованием комплексного подхода к получению биодизельного топлива и янтарной кислоты из биомассы микроводорослей *Micractinium* sp. достигнут их выход свыше $84.5 \pm 7.6\%$ и $67.0 \pm 5.0\%$ соответственно, что позволяет увеличить глубину переработки биомассы микроводорослей и получать востребованные продукты.
4. Впервые клонирована в *E. coli* термостабильная эстераза estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* UT1, показано, что она обладает высокой стабильностью в широком диапазоне условий. Показано, что ферментный препарат на основе поперечно сшитых агрегатов этой эстеразы обладает высокой операционной стабильностью (время полуинактивации 462 ч) и эффективностью (степень гидролиза малатиона $99.5 \pm 1.4\%$) при гидролизе инсектицида малатиона в стерилизованных муниципальных сточных водах, что превосходит другие методы биоочистки.
5. Получен ферментный препарат на основе ковалентно иммобилизированной рекомбинантной термостабильной липазы *G. stearothermophilus* G3 на мезопористом силикагеле, обладающий высокой операционной стабильностью, но средней эффективностью в реакциях переэтерификации смеси подсолнечного масла и гидрированного соевого масла (для получения модифицированных пищевых жиров), а также смеси подсолнечного масла с метанолом (для получения биодизельного топлива).
6. Показана возможность получения этанола путем сбраживания продуктов каталитического гидролизата целлюлозы с использованием термотолерантных дрожжей *Kluyveromyces marxianus* C1 и *Ogataea polymorpha* CBS4732, с выходом 72.0 ± 5.7 и $75.2 \pm 4.3\%$ (от теоретического), соответственно, что близко к показателям, получаемых при использовании мезофильных дрожжей при сбраживании кислотных гидролизатов целлюлозы.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

Статьи:

1. **Сорокина К.Н.**, Самойлова Ю.В., Пармон В.Н. Термостабильная эстераза EstUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus*: влияние дополнительного процессируемого домена TrxA на свойства фермента // Катализ в промышленности. - 2019. - Т. 19, № 5. - С. 399-407.
2. **Sorokina K. N.**, Samoylova Y. V., Gromov N. V., Ogorodnikova O. L., Parmon V. N. Production of biodiesel and succinic acid from the biomass of the microalga *Micractinium* sp. IC-44 // Bioresource Technology. – 2020. – Т. 317. – С. 124026.
3. **Sorokina K. N.**, Samoylova Y. V., Parmon V. N. Comparative analysis of microalgae metabolism on BBM and municipal wastewater during salt induced lipid accumulation // Bioresource Technology Reports. – 2020. – Т. 11. – С. 100548.
4. Gromov N. V., Medvedeva T. B., **Sorokina K. N.**, Samoylova Y. V., Rodikova Y. A., Parmon V. N. Direct conversion of microalgae biomass to formic acid under an air atmosphere with soluble and solid Mo–V–P heteropoly acid catalysts // ACS Sustainable Chemistry & Engineering. – 2020. – Т. 8, № 51. – С. 18947-18956.

5. Самойлова Ю.В., **Сорокина К.Н.**, Пилигаев А.В., Пармон В.Н. Применение бактериальных термостабильных липолитических ферментов в современных биотехнологических процессах: обзор // Катализ в промышленности. – 2018. – V. 18. – N 6. – P. 61-73.
6. Пилигаев А.В., **Сорокина К.Н.**, Самойлова Ю.В., Пармон В.Н. Подходы к получению биомассы микроводорослей с высоким содержанием липидов и их биокаталитической переработке в биодизельное топливо: обзор // Катализ в промышленности. – 2019. – V. 19. – N 2. – P. 149-162.
7. Piligaev A. V., **Sorokina K. N.**, Samoylova Y. V., Parmon V. N. Lipid production by microalga *Micractinium* sp. IC-76 in a flat panel photobioreactor and its transesterification with cross-linked enzyme aggregates of *Burkholderia cepacia* lipase // Energy Conversion and Management. – 2018. – T. 156. – C. 1-9.
8. Piligaev A. V., **Sorokina K. N.**, Shashkov M. V., Parmon V. N. Screening and comparative metabolic profiling of high lipid content microalgae strains for application in wastewater treatment // Bioresource Technology. – 2018. – T. 250. – C. 538-547.
9. Samoylova Y. V., **Sorokina K. N.**, Romanenko M. V., Parmon V. N. Cloning, expression and characterization of the esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* which belongs to a new lipase family XVIII // Extremophiles. – 2018. – T. 22, № 2. – C. 271-285.
10. Samoylova Y. V., **Sorokina K. N.**, Piligaev A. V., Parmon V. N. Preparation of Stable Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of a *Ureibacillus thermosphaericus* Esterase for Application in Malathion Removal from Wastewater // Catalysts. – 2018. – T. 8, № 4. – C. 154.
11. **Sorokina K. N.**, Taran O. P., Medvedeva T. B., Samoylova Y. V., Piligaev A. V., Parmon V. N. Cellulose biorefinery based on a combined catalytic and biotechnological approach for production of 5-HMF and ethanol // ChemSusChem. – 2017. – T. 10, № 3. – C. 562-574.
12. Самойлова Ю. В., Пилигаев А. В., **Сорокина К. Н.**, Розанов А. С., Пельтек С. Е., Новиков А. А., Альмяшева Н. Р., Пармон В. Н. Применение иммобилизированной рекомбинантной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 для получения метиловых эфиров жирных кислот // Катализ в промышленности. – 2015. – T. 15, № 6. – C. 90-96.
13. Громов Н.В., Таран О.П., **Сорокина К.Н.**, Мищенко Т.И., Шивакумар У., Пармон В.Н. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлозы и гемицеллюлоз) в ценные продукты. Часть 1. Методы активации биомассы // Катализ в промышленности. – 2016. – V. 16. – N 1. – P. 74-83.
14. **Сорокина К.Н.**, Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Шивакумар У., Пармон В.Н. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлозы и гемицеллюлоз) в ценные продукты Часть 2. Подходы, применяемые в биотехнологической переработке поли- и моносахаридов в ценные продукты, востребованные химической промышленностью // Катализ в промышленности. – 2017. – V. 17. – N 1. – P. 70-77.

15. **Сорокина К.Н.**, Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Шивакумар У., Пармон В.Н. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлозы и гемицеллюлоз) в ценные продукты Часть 3. Продукты, получаемые путем биотехнологической переработки поли- и моносахаридов биомассы // Катализ в промышленности. – 2017. – V. 17. – N 1. – P. 78-85.
16. Самойлова Ю.В., **Сорокина К.Н.**, Пармон В.Н. Перспективы применения ферментативной переэтерификации масел для получения модифицированных жиров // Катализ в промышленности. – 2016. – V. 16. – N 3. – P. 57-63.
17. Самойлова Ю. В., Пилигаев А. В., **Сорокина К. Н.**, Пармон В.Н. Применение иммобилизированной рекомбинантной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* в реакции переэтерификации подсолнечного и гидролизованного соевого масла // Катализ в промышленности. – 2016. № 5. – С. 66-74.
18. Piligaev A. V., **Sorokina K. N.**, Bryanskaya A. V., Peltek S. E., Kolchanov N. A., Parmon V. N. Isolation of prospective microalgal strains with high saturated fatty acid content for biofuel production // Algal Research. – 2015. – T. 12. – С. 368-376.
19. **Сорокина К.Н.**, Розанов А.С., Брянская А.В., Пельтек С.Е. Выделение и исследование свойств бактерий термальных источников Северного Прибайкалья, обладающих липолитической активностью // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – V. 17. – N 4-1. – P. 651-658.
20. **Сорокина К.Н.**, Нуриддинов М.А., Розанов А.С., Иванисенко В.А., Пельтек С.Е. Компьютерный анализ структуры липаз бактерий рода *Geobacillus* и выявление мотивов, влияющих на их термостабильность // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – V. 17. – N 4-1. – P. 666-674.
21. **Сорокина К.Н.**, Яковлев В.А., Пилигаев А.В., Кукушкин Р.Г., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А., Пармон В.Н. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики // Катализ в промышленности. – 2012. – V. – N 2. – P. 63-72.

Монографии:

1. Пармон В.Н., Яковлев В.А., **Сорокина К.Н.**, Чесноков В.В., Булушев Д.А., Яшник С.А., Громов Н.В., Дубинин Ю.В., Федоров А.В., Самойлова Ю.В., Чичкань А.С., Анисимов О.А., Болотов В.А., Голубь Ф.С., Грибовский А.Г., Черноусов Ю.Д., Шамирзаев В.Т., Болтенков В.В., Таран О.П., Медведева Т.Б. Новые физические и каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы для решения задач экологически чистой и ресурсосберегающей энергетики Монография, Издательско-полиграфический центр НГУ. 2020. 394 с. ISBN 9785443711188.
2. **Сорокина К.Н.**, Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Тулупов А.А., Пармон В.Н. Применение биотехнологии для переработки липидов растительного происхождения в ценные продукты и их влияние на здоровье человека Монография, Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск : ИПЦ НГУ. 2017. 150 с. ISBN 9785443706023.

Патенты:

1. **Сорокина К.Н.**, Таран О.П., Медведева Т.Б., Пармон В.Н. Способ получения 5-гидроксиметилфурфурола и этанола из целлюлозы // Патент РФ RU2636004C1, опубликован 17.11.2017 г.
2. **Сорокина К.Н.**, Пармон В.Н. Штамм дрожжей *Kluyveromyces marxianus* ВКПМ Y-4290, применяемый для получения этанола на каталитических гидролизатах целлюлозы // Патент РФ RU2626544C1, опубликован 28.07.2017 г.
3. Розанов А.С., Пельтек С.Е., **Сорокина К.Н.** Штамм бактерии *Escherichia coli* XL1-blue/pQS-G3, продуцент термостабильной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 // Патент РФ RU2540873C1, опубликован 10.02.2015 г.
4. **Сорокина К.Н.**, Пилигаев А.В., Брянская А.В., Пельтек С.Е. Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* для получения липидов в качестве сырья для производства моторного топлива // Патент РФ RU2508398C1, опубликован 27.02.2014 г.
5. Новиков А.А., Котелев М.С., Семенов А.П., Гуцин П.А., Иванов Е.В., **Сорокина К.Н.**, Розанов А.С., Винокуров В.А. Биокатализатор для переэтерификации жиров и способ его получения // Патент РФ RU2528778C2, опубликован 20.09.2014 г.