

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ КАТАЛИЗА ИМ. Г.К. БОРЕСКОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант
академик РАН, профессор,
доктор химических наук,
Пармон Валентин Николаевич

Новосибирск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Выделение и изучение свойств микроводорослей, продуцирующих липиды и углеводы ..	16
1.1.1 Выделение штаммов микроводорослей, продуцирующих липиды	16
1.1.2 Выделение и анализ свойств штаммов микроводорослей, продуцирующих углеводы ..	19
1.1.3 Влияние стрессовых факторов на состав биомассы микроводорослей	22
1.1.3.1 Влияние состава среды и внешних факторов	22
1.1.3.2 Влияние солей на накопление липидов микроводорослями.....	26
1.1.4 Анализ метаболизма штаммов микроводорослей в процессе накопления липидов	30
1.2 Подходы к получению биомассы микроводорослей	36
1.3 Комплексная переработка биомассы микроводорослей в востребованные продукты	37
1.3.1 Получение биодизельного топлива из биомассы микроводорослей	37
1.3.1.1. Экстрагирование липидов органическим растворителями	39
1.3.1.2 Экстрагирование и переэтерификация липидов ионными жидкостями.....	40
1.3.1.3 Переэтерификация липидов микроводорослей в присутствии катализаторов и	
иммобилизованных ферментов.....	42
1.3.2 Получение востребованных химических веществ из биомассы микроводорослей с	
применением комплексных биотехнологических подходов	46
1.3.2.1 Этанол и бутанол.....	47
1.3.2.2 Водород и органические кислоты.....	48
1.4 Применение микроводорослей в процессах водоочистки	49
1.5 Выделение и свойства бактериальных липолитических ферментов	52
1.6 Применение иммобилизованных липолитических ферментов в процессах получения	
востребованных веществ из растительных масел и в процессах водоочистки.....	57
1.6.1 Иммобилизованные ферменты, применяемые для получения биодизельного	
топлива	57
1.6.2 Иммобилизованные липазы для получения модифицированных жиров	59
1.6.3 Применение биокаталитических подходов к очистке сточных вод.....	61
1.7 Комплексная биотехнологическая переработка целлюлозы в востребованные вещества ..	62
1.8 Целесообразность получения биотоплива и других продуктов путем переработки	
различных компонентов биомассы.....	65
1.8.1 Липиды микроводорослей.....	65
1.8.2 Растительные масла	67
1.8.3 Крахмал и другие углеводы	69
1.8.4 Целлюлоза.....	70
1.9 Заключение по обзору литературы.....	72
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	74
2.1 Материалы	74
2.2 Методы	77
2.2.1 Выделение и культивирование штаммов микроводорослей.....	77
2.2.2 Получение и исследование свойств липолитических ферментов	79
2.2.2.1 Клонирование и исследование свойств эстеразы estUT1.....	79
2.2.2.2 Исследование свойств рекомбинантной липазы G3.....	84
2.2.3 Получение и исследование свойств иммобилизованных ферментов в реакциях	
гидролиза и переэтерификации	84
2.2.3.1 Ферментный препарат КатА	84
2.2.3.2 Иммобилизованный ферментный препарат БКЛ.....	86
2.2.3.3 Ферментный препарат ПСФА-estUT1-TrxA.....	88
2.2.4 Переработка биомассы микроводорослей в МЭЖК и янтарную кислоту	91

2.2.5 Переработка продуктов каталитического гидролиза целлюлозы в этанол	92
2.2.6 Аналитические методы	94
2.2.7 Статистические методы	102
ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ	
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ.....	104
3.1 Выделение штаммов микроводорослей из природных источников	104
3.2 Предварительный отбор штаммов микроводорослей по способности накапливать нейтральные липиды и углеводы.....	106
3.3 Поиск и исследование свойств штаммов с повышенным содержанием моновенасыщенных и насыщенных жирных кислот	111
3.4 Исследование влияния отдельных факторов на процесс накопления нейтральных липидов и углеводов у штаммов микроводорослей.....	119
3.4.1 Исследование свойств микроводорослей при культивировании в среде WW у штаммов с высоким уровнем накопления нейтральных липидов.....	119
3.4.2 Анализ метаболических профилей микроводорослей с высоким содержанием липидов при культивировании в среде WW	125
3.5 Исследование влияния стрессовых факторов на способность к индукции накопления нейтральных липидов у микроводорослей, продуцирующих углеводы	131
3.5.1 Выбор модельного штамма для оценки влияния стрессовых условий на способность синтезировать нейтральные липиды	132
3.5.2 Оценка влияния концентрации солей и дефицита соединений азота в среде на состав биомассы <i>P. kessleri</i> IC-11	135
3.5.3 Метаболическое профилирование биомассы <i>P. kessleri</i> IC-11 в процессе культивирования на средах BBM и WW при солевом стрессе.....	138
3.5.3.1 Анализ данных метаболического профилирования биомассы <i>P. kessleri</i> IC-11 при солевом стрессе	141
3.6 Сравнительная характеристика штаммов микроводорослей, исследованных в работе	148
3.6.1 Сравнение кинетических параметров культивирования штаммов микроводорослей и их биохимических свойств	148
3.6.1.1 Культивирование в среде BBM.....	150
3.6.1.2 Культивирование в среде WW	152
3.6.1.3 Культивирование штаммов на средах с высоким содержанием солей.....	153
3.6.2 Сравнительный анализ состава жирных кислот в биомассе штаммов микроводорослей	154
3.6.2.1 Состав биомассы при культивировании в среде BBM	154
3.6.2.2 Сравнение состава жирных кислот микроводорослей при культивировании в средах BBM и WW	155
3.6.2.3 Культивирование на средах с высоким содержанием солей	157
3.6.3 Сравнительный анализ эффективности применения исследуемых штаммов микроводорослей в процессах водоочистки.....	158
3.7. Нарботка биомассы микроводорослей в лабораторной установке	162
ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕАКЦИЯХ	
ГИДРОЛИЗА И ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ.....	168
4.1 Получение ферментов, применяемых в реакциях гидролиза органических веществ	168
4.1.1 Выделение термофильных бактерий с липолитической активностью	168
4.1.2 Получение продуцента термостабильной эстеразы <i>Ureibacillus thermosphaericus</i> и изучение ее свойств.....	170
4.1.3 Изучение подходов к увеличению экспрессии термостабильной эстеразы <i>Ureibacillus</i> <i>thermosphaericus</i> и оценка их влияния на активность фермента	179
4.1.3.1 Коэкспрессия эстеразы с шаперонами	179
4.1.3.2 Оценка влияния дополнительного процессируемого домена TrxA на свойства estUT1	180

4.2 Получение ферментных препаратов.....	185
4.2.1 Приготовление и свойства иммобилизированной липазы БКЛ	186
4.2.2 Приготовление ферментного препарата ПСФА-estUT1-TrxA.....	186
4.2.3 Приготовление ферментного препарата Ката	191
ГЛАВА 5. КОМПЛЕКСНЫЕ ПОДХОДЫ К ПЕРЕРАБОТКЕ КОМПОНЕНТОВ БИОМАССЫ В ВОСТРЕБОВАННЫЕ ПРОДУКТЫ	193
5.1 Переработка биомассы микроводорослей с высоким содержанием липидов и углеводов	194
5.1.1 Получение метиловых эфиров жирных кислот и янтарной кислоты из биомассы микроводорослей.....	194
5.1.1.1 Сравнительный анализ эффективности экстрагирования липидов из биомассы микроводоросли <i>Micractinium</i> sp. IC-44.....	196
5.1.1.2 Прямая переэтерификация биомассы микроводоросли <i>Micractinium</i> sp. IC-44....	197
5.1.1.3 Сбраживание гидролизата остаточной биомассы микроводоросли <i>Micractinium</i> sp. IC-44 для получения янтарной кислоты.....	199
5.1.2 Применение ферментного препарата Ката для получения метиловых эфиров жирных кислот из липидов микроводоросли <i>Micractinium</i> sp. IC-76	201
5.1.3 Сравнение эффективности подходов к переработке биомассы микроводорослей для получения востребованных продуктов	206
5.1.3.1 Получение метиловых эфиров жирных кислот.....	206
5.1.3.2 Получение органических кислот	210
5.2 Биокаталитическая переработка растительных масел для получения метиловых эфиров жирных кислот и модифицированных жиров	211
5.2.1 Применение БКЛ для получения метиловых эфиров жирных кислот	211
5.2.2 Применение БКЛ для получения модифицированных пищевых жиров	213
5.2.3 Сравнение эффективности применения БКЛ в биокаталитической переработке растительных масел	216
5.3 Сбраживание продуктов каталитического гидролиза целлюлозы для получения этанола	219
5.3.1 Подготовка гидролизатов целлюлозы к сбраживанию.....	220
5.3.2 Выделение штаммов термотолерантных дрожжей.....	221
5.3.3 Анализ устойчивости штаммов дрожжей к ингибиторам брожения	226
5.3.4 Культивирование термотолерантных дрожжей на среде с каталитическим гидролизатом микрокристаллической целлюлозы	227
5.3.5 Оценка эффективности получения этанола с использованием каталитических гидролизатов целлюлозы.....	232
ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ПСФА-ESTUT1-TRXA В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА МАЛАТИОНА	236
6.1 Анализ свойств ПСФА-estUT1-TrxA	236
6.2 Применение ПСФА-estUT1-TrxA для гидролиза малатиона в различных средах	239
6.3 Оценка эффективности применения ПСФА-estUT1-TrxA для гидролиза малатиона.....	240
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	242
ВЫВОДЫ	249
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	250
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	299

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

[BMIM][CF₃SO₃] – 1-бутил-3-метилимидазолийтрифторметансульфонат

[BMIM][Cl] – 1-бутил-3-метилимидазолий хлорид

[C₂MIM][OAc] – этаноат 1-этил-3-метилимидазолия

[EMIM][ESO₄] – этилсульфат 1-этил-3-метилимидазолия

[EMIM][MeSO₄] – метилсульфат 1-этил-3-метилиммидазолия

[MMIM][DMP] – метилфосфат 1,3-диметилимидазолия

[P4444][For] – формиат тетрабутилфосфония

[TMAm][Cl] – хлорид тетраметиламмония

3-ФГ – 3-фосфоглицерат

5-ГМФ – 5-гидроксиметилфурфурол

А-КГ – альфа-кетоглутарат

Ац-КоА – ацетилкоэнзим А

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Г-6-Ф – глюкозо-6-фосфат

ГХ-МС – газовая хроматомасс-спектрометрия

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотеитол

ЕА – единица активности

ЖК – жирные кислоты

ИЖ – ионные жидкости

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

Малатион – *O,O*-диметил-*S*-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфат

МИ-1Ф – миоинозитол-1-фосфат

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот

НЖК – насыщенные жирные кислоты

ОАА – оксалоацетат

Об. – объем

ОП – оптическая плотность

ПАВ – поверхностно-активные вещества
 Паратион – *O,O*-диэтил-*O*-(4-нитрофенил)тиофосфат
 ПГК – пироглутаминовая кислота
 ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
 ПСФА – поперечно сшитые ферментные агрегаты
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 C14:0 – миристиновая кислота
 C16:0 – пальмитиновая кислота
 C16:1 – пальмитолеиновая кислота
 C18:0 – стеариновая кислота
 C18:1 – олеиновая кислота
 C18:2 – линолевая кислота
 C18:3 – линоленовая кислота
 C18:4 – стеаридоновая кислота
 C20:0 – арахидоновая кислота
 C20:5 – эйкозапентаеновая кислота
 ТАГ – триацилглицериды
 ТГФ – тетрагидрофуран
 ТЖК – транс-изомеры жирных кислот
 ФП – ферментный препарат
 ХПК – химическое потребление кислорода
 ЦМ – цикл мочевины
 ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
 ЭДТА – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
 ЭИЖ – экстрагирование ионными жидкостями
 ЭМФ – экстрагирование методом Фолча
 ЭПК – эйкозапентаеновая кислота
 APCI – химическая ионизация при атмосферном давлении
 APX – аскорбатпероксидаза
 DGAT – диацилглицерин ацилтрансферазы
 DGDG – дигалактозилдиацилглицерол
 dNTPs – дезоксинуклеотидтрифосфаты
 ECN – эквивалентное углеродное число
 ESI – ионизация электрораспылением
 Exp. – экспоненциальная фаза роста
 FDR – коэффициент ложного обнаружения

IC₅₀ – концентрация вещества, вызывающей снижение прироста биомассы на 50%

ID – степень переэтерификации

ImD – степень иммобилизации

MGDG - моногалактозилдиацилглицерол

MGO - многослойный оксид графена

MGO-AP - MGO, функционализированный 3-аминопропилтриэтоксисиланом

MGO-AP-GA - MGO, функционализированный 3-аминопропилтриэтоксисиланом и глутаровым альдегидом

MHD – степень гидролиза малатиона

MSTFA – *N*-метил-*N*-(триметилсилил) трифторацетамид

MWW – муниципальные сточные воды

NeoDGAT2 – диацилглицерин ацилтрансфераза 2

NeoLPAAT1 – пластидная 1-ацилглицерин-3-фосфат-О-ацилтрансфераза

PCA – метод главных компонент

PDH2 – пируватдегидрогеназа

PLS-DA – метод дискриминантного анализа на основе частных наименьших квадратов

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

*p*NP – *n*-нитрофенол

*p*NPC12 – *n*-нитрофенил додеканоат

*p*NPC16 – *n*-нитрофенил пальмитат

*p*NPC18 – *n*-нитрофенил стеарат

*p*NPC2 – *n*-нитрофенил ацетат

*p*NPC4 – *n*-нитрофенил бутират

*p*NPC8 – *n*-нитрофенил октаноат

RSM – метод поверхности отклика

SDS – додецилсульфат натрия

SQDG – сульфохиновосилдиацилглицерол

St. – стационарная фаза роста

TEV – протеаза вируса гравировки табака

TG₁ – концентрация триацилглицеридов

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

TrxA – тиоредоксин A

VIP – важность независимой переменной в проекции

W – массовая доля

Y – выход

ВВЕДЕНИЕ

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. Основными достоинствами использования подобного вида сырья являются экологичность [1], низкое энергопотребление процессов производства на его основе [2], а также снижение выбросов CO_2 [3]. В качестве возобновляемого сырья используются разнообразные виды биомассы, преимущественно пищевого (пшеница, кукуруза, подсолнечник, рапс), но также и непищевого назначения (древесная лигноцеллюлоза, микроводоросли, энергетические травы) [4]. Для повышения глубины переработки биомассы необходимо использовать так называемую комплексную биопереработку сырья, совмещающую традиционные химические и каталитические подходы с современными биотехнологическими. Развитие этого направления связано с различными отраслями знания, включающими как химию, катализ, химическую технологию, так и микробиологию, генетическую инженерию, биоинформатику, генетику и биотехнологию [4], [5]. Новые технологии комплексной переработки биомассы позволяют получать широкий спектр востребованных продуктов на основе возобновляемого сырья, а также снизить стоимость их получения [6].

Микроводоросли являются перспективным непищевым источником биомассы из-за их высокой скорости воспроизводства (до 70 т га^{-1} биомассы в год при использовании открытых прудов), при том, что у биомассы тополя она составляет $10\text{--}13 \text{ т га}^{-1}$ в год [3]. Важным свойством микроводорослей является то, что они не требуют для выращивания земель или значительных затрат пресной воды (для этого могут использоваться водные ресурсы с высоким содержанием солей или сточные воды), а также то, что они могут поглощать значительное количество CO_2 [7]. Биомасса микроводорослей является источником липидов и углеводов, которые служат сырьем для получения альтернативных моторных топлив (биодизельного топлива и биоэтанола [8]), а также химических веществ (водорода, пропиленгликоля, биокислот [9]). Основными направлениями исследования в данной области являются: (1) поиск новых эффективных штаммов микроводорослей, продуцирующих липиды и углеводы; (2) изучение факторов, влияющих на синтез липидов и углеводов в клетках микроводорослей; (3) исследование возможности применения отдельных штаммов микроводорослей в процессах водоочистки; (4) поиск эффективных подходов к переработке липидов микроводорослей в биодизельное топливо и химические вещества (в том числе в янтарную кислоту); (5) масштабирование процесса получения биомассы микроводорослей. Поэтому для разработки новых процессов, основанных

на использовании биомассы микроводорослей, в настоящее время актуально проведение исследований по всем перечисленным направлениям.

Растительные масла являются еще одним источником возобновляемого сырья для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) как компонентов биодизельного топлива. Несмотря на то, что его производство связано преимущественно с использованием гомогенных кислотных и гетерогенных катализаторов [10], разрабатываются альтернативные способы получения с использованием иммобилизованных ферментов. В основном для этого применяются термостабильные липазы, обеспечивающие выход метиловых эфиров жирных кислот свыше 90%, в том числе продуцируемые штаммами, относящимся к видам *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* [11]. Помимо получения МЭЖК иммобилизованные липазы на практике используются в процессах получения модифицированных пищевых жиров с низким содержанием транс-жиров, обладающих отрицательным влиянием на здоровье человека [12]. В настоящее время в мире в основном применяются коммерческие иммобилизованные ферментные препараты: Lipozyme TL (на основе термостабильной липазы *T. lanuginosus*) и Lipozyme RM (на основе термостабильной липазы *R. miehei*) [13]. В связи с этим актуальна разработка альтернативных отечественных препаратов, в том числе для снижения их стоимости. В основном для получения МЭЖК и модифицированных жиров используются иммобилизованные грибные термостабильные липазы. 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 и устойчивостью к метанолу [14], точно также как и липаза бактерии *Burkholderia cepacia* [15]. Исследования в области создания новых иммобилизованных липолитических ферментов проводят по следующим направлениям: (1) получение новых термостабильных липаз, в том числе бактериального происхождения, и изучение их свойств; (2) разработка и применение новых иммобилизованных препаратов этих ферментов в процессах получения МЭЖК и модифицированных жиров.

Смежным направлением исследований является применение термостабильных липолитических ферментов, к которым в том числе относятся эстеразы, в процессах гидролиза органических веществ со сложноэфирной связью с коротким радикалом. В частности, эстеразы широко применяются для селективного гидролиза хиральных соединений [16], а также в тонком органическом синтезе как катализаторы отдельных реакций [17]. 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 сточных вод не всегда позволяет добиться высокого уровня удаления отдельных соединений, например пестицидов. Использование для

этих целей липолитических ферментов позволит увеличить как скорость, так и эффективность гидролиза таких соединений. С целью получения препаратов иммобилизованных липолитических ферментов, применяемых для гидролиза органических соединений, актуально проведение исследований по следующим направлениям: (1) поиск природных продуцентов термостабильных липолитических ферментов; (2) клонирование и изучение их свойств, а также повышение их экспрессии в клетках продуцентов; (3) разработка иммобилизованных липолитических ферментов и изучение их свойств в реакции гидролиза различных соединений, в том числе фосфорганических инсектицидов.

Целлюлоза как источник углеводов применяется в биотехнологических процессах получения биотоплива второго поколения (биоэтанола) из сырья непищевого назначения [18]. В последнее время также были разработаны альтернативные химические процессы получения востребованных веществ из целлюлозы, включая: 5-гидроксиметилфурфурол (5-ГМФ), фурфурол, левулиновая кислота, этиленгликоль [19]. В связи с этим актуальна разработка комплексного процесса переработки целлюлозы с использованием ее каталитического гидролиза, направленного на получение 5-ГМФ (как сырья для получения компонентов биотоплива и биопластиков), и глюкозы, как побочного продукта реакции [20]. Глюкоза может использоваться как субстрат для сбраживания микроорганизмами с целью получения этанола. Для сбраживания целесообразно применять термотолерантные дрожжи, что позволяет уменьшить затраты на процесс и снизить контаминацию побочной микрофлорой [21]. Актуальными направлениями исследований по этому направлению работ являются: (1) поиск и изучение свойств новых штаммов термотолерантных дрожжей; (2) отбор штаммов термотолерантных дрожжей с высокой способностью продуцировать этанол на средах, содержащих каталитические гидролизаты целлюлозы, а также обладающих высокой устойчивостью к ингибиторам сбраживания; (3) разработка процесса получения этанола с использованием отобранных штаммов дрожжей. Разработка комплексного процесса, сочетающего как каталитический, так и биотехнологический подход, позволит повысить глубину переработки целлюлозы и получить продукты, востребованные промышленностью.

Таким образом, комплексный подход позволит разработать научную основу процессов получения широкого спектра веществ из возобновляемой биомассы с использованием биотехнологии (биотоплива, янтарной кислоты, модифицированных пищевых жиров, ферментных препаратов), 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

Впервые выделены и охарактеризованы новые штаммы микроводорослей, продуцирующие нейтральные липиды и углеводы, а также обладающие высоким уровнем накопления биомассы. Впервые выделен штамм *Scenedesmus abundans* A-1175, который имеет высокое содержание мононенасыщенных и насыщенных липидов, что в дальнейшем позволит 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 гидролизovaných 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 5.0 - 9.0, 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 КатаА 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Выделение и изучение свойств микроводорослей, продуцирующих липиды и углеводы

1.1.1 Выделение штаммов микроводорослей, продуцирующих липиды

Существенной проблемой, связанной с получением биотоплива из микроводорослей, является поиск оптимального источника сырья, а именно, штаммов, пригодных для получения топлива высокого качества. Наиболее важными компонентами биомассы, используемыми для его получения, являются липиды и углеводы, накопление которых в клетках микроводорослей индуцируется под действием стрессовых условий (в том числе при снижении концентрации соединений азота и фосфора, изменении освещенности и увеличении концентрации солей в среде). Кроме того, эти же вещества активно применяются для получения различных химических продуктов. Для выбора оптимального штамма-продуцента липидов или углеводов необходимо наличие у него ряда характеристик, в том числе: высокой скорости накопления биомассы и содержания целевого вещества, нетребовательность к условиям культивирования, устойчивое накопление биомассы в присутствии побочной микрофлоры в процессе культивирования. В связи с этим актуален поиск новых штаммов микроводорослей, удовлетворяющих этим требованиям [22]. Кроме того, для получения биотоплива высокого качества, соответствующего стандартам ASTM D6751 и EN 14214, необходимо использование растительных липидов с высоким суммарным содержанием насыщенных жирных кислот (НЖК) и моновенасыщенных жирных кислот (МНЖК). Высокая насыщенность липидов предупреждает образование перекисных соединений, поскольку полиненасыщенные жирные кислоты являются восприимчивыми к полимеризации и образованию смол. В свою очередь, высокое содержание эфиров насыщенных ЖК приводит к увеличению цетанового числа [23], что значительно улучшают свойства текучести биодизельного топлива при пониженных температурах [24].

Для поиска микроводорослей с высоким содержанием насыщенных жирных кислот в работе [25] были выделены штаммы, относящиеся к р. *Chlorella*. Установлено, что наибольшее содержание липидов наблюдается в биомассе штаммов *Chlorella vulgaris* sp-1 и *Scenedesmus obliquus* sp-21, равное 28.7 и 29.8% от массы клеток, соответственно. Анализ жирнокислотного состава клеток показал, что наибольшая массовая доля насыщенных и моновенасыщенных жирных кислот обнаружена у штамма *S. obliquus* sp-21 – 61.9%. В работе [26] был проведен анализ свойств термотолерантных диатомовых микроводорослей, способных накапливать биомассу при 35 °С, что важно для культивирования в условиях резких перепадов температур при выращивании микроводорослей в прудах и открытых фотобиореакторах. Показано, что

Cyclotella sp. HB162 обладает самым высоким содержанием липидов, равным 0.46 г л^{-1} (23.7% по сухому веществу). Наибольшее содержание липидов (246.4 мг г^{-1} биомассы) было обнаружено у *Fistulifera* sp. HB236, а штамм *Nitzschia palea* HB170 обладал наибольшим уровнем накопления биомассы (0.33 г л^{-1}), но относительно низким содержанием липидов (105.9 мг г^{-1} биомассы), при этом у *N. palea* HB170 и *Fistulifera* sp. HB236 выявлено отсутствие изменения состава биомассы в процессе культивирования при температурах до 35°C . Содержание НЖК и МНЖК у штаммов составляло 84-91 % (от общих липидов) и 90-94% (от триацилглицеридов). Для пресноводной зеленой микроводоросли *Scenedesmus abundans* было показано [27], что ее липиды содержат свыше 80% жирных кислот C_{16} - C_{18} , которые являются основой для получения биодизельного топлива. Липиды этой водоросли в основном содержат НЖК (47.83%), МНЖК (26.38%) и ПНЖК (25.20%), что делает его перспективным продуцентом высококачественных липидов для получения биодизельного топлива.

Помимо выделения новых штаммов микроводорослей с высоким содержанием НЖК и МНЖК, интересен подход с модификаций известных штаммов, обладающих низким содержанием этих жирных кислот. В работе [28] проведен УФ-мутагенез штаммов микроводорослей *Isochrysis* sp. и *Nannochloropsis maritima*. Выявлено, что мутант *Isochrysis* sp. Бс характеризовался высоким уровнем НЖК (52.3%), большим количеством МНЖК (29.3%), более низким уровнем ПНЖК (18.4%) и значительным увеличением содержания C_{16} - C_{18} (в 1.3 раза по сравнению с исходным штаммом) в биомассе.

Другим подходом к увеличению содержания НЖК и МНЖК в биомассе микроводорослей является изменение условий их культивирования, в том числе путем воздействия стрессовых факторов [29]. В частности, для штамма *C. vulgaris* UMT-M1 [30] было показано, что при его выращивании в темноте в течение трех суток происходило увеличение содержания НЖК в биомассе с 34.0 до 41.4%, но при этом наблюдалось снижение содержания МНЖК с 36.7 до 29.8%. Содержание пальмитиновой кислоты ($\text{C}_{16:0}$) увеличилось с 23.2 до 28.9%, тогда как содержание олеиновой кислоты ($\text{C}_{18:1}$) снизилось с 35.4 до 28.8%. Содержание общих липидов снизилось с 20.4 до 18.7%, при этом концентрация биомассы оставалась неизменной. В работе [31] сравнивали биохимический состав микроводоросли *Tetraselmis* sp. KY114885 при различных режимах культивирования (фотоавтотрофного и миксотрофного). В миксотрофных условиях при культивировании на среде с 5 г л^{-1} глюкозы показано увеличение выхода липидов и крахмала, а также доли МНЖК, при этом количество НЖК и ПНЖК уменьшалось. Аналогично в другом исследовании [32] было показано, что выделенные штаммы микроводорослей, относящиеся к *C. vulgaris*, *Scenedesmus dimorphus*, *S. obliquus*, *Selenastrum* sp. и *Chlorococcum humicola*, продуцирующие большое количество липидов, при культивировании на среде BG-11 обладали высокой скоростью накопления липидов. В частности, для *C. vulgaris*

этот показатель составил 1.86 ± 0.1 г л⁻¹, что превышало аналогичное значение при культивировании на сточных водах (1.14 ± 0.3 г л⁻¹ при содержании липидов $35.1 \pm 1.0\%$). Выявлено, что штаммы *S. dimorphus* и *S. obliquus* имеют высокое содержание насыщенных жирных кислот (63.67 и 63.60% соответственно). При этом *C. vulgaris* обладает высоким суммарным содержанием МНЖК и НЖК (81.28%), а также низким содержанием ПНЖК (18.72%), что делает его перспективным для получения высококачественного биодизельного топлива.

В ряде работ липиды штаммов микроводорослей с высоким содержанием НЖК и МНЖК подвергались переэтерификации с метанолом с целью оценки качества получаемого биодизельного топлива. Для штамма *Desmodesmus* sp. I-AU1 [33] проведена оценка возможности его применения для получения МЭЖК в фотоавтотрофных условиях в среде с пониженным содержанием соединений азота (0.375 г л⁻¹ NaNO₃ в среде BG11), максимально достигнутая концентрация биомассы при этом составила 0.745 г л⁻¹, содержание липидов – 36.14% при удельной скорости накопления биомассы 0.20 сут⁻¹. Выявлено, что количество НЖК составило 31.02%, МНЖК (преимущественно C18:1) составляет 25.64% (суммарно 56.66%), что является высоким показателем по сравнению с аналогичными штаммами *Desmodesmus*. Выявлено, что биотопливо из липидов этого штамма соответствует требованиям стандартов ASTM D6751 и EN 14214, а также обладает низкой плотностью (0.88 г см⁻³) и кинематической вязкостью (2.81 мм² с⁻¹), цетановое число составило 43.47, а устойчивость к окислению – 5.96 ч. В работе [34] проведена оценка тридцати новых штаммов микроводорослей для последующего применения в качестве сырья для производства биодизельного топлива. Выявлено, что штамм *C. vulgaris* KP2 обладает самым большим содержанием липидов (28.56% от массы сухих клеток) и самой большой скоростью накопления липидов (4.56 мг л⁻¹ сут⁻¹) при недостатке соединений азота в культуральной среде. Биомасса этого штамма преимущественно содержала следующие жирные кислоты: C18:1 (37.56%), C16:0 (23.16%), стеариновую C18:0 (23.07), линолевую C18:2 (7.00%) и линоленовую C18:3 (3.12%), а процентное содержание НЖК, МНЖК и ПНЖК составляло 49.26, 38.73 и 10.12% от общего количества жирных кислот, соответственно. Анализ свойств МЭЖК, полученных из липидов с высоким суммарным количеством НЖК и МНЖК в биомассе (87.99%) выявил низкое значение йодного числа (59 г на 100 г МЭЖК), увеличение окислительной стабильности (до 14.24 ч) и цетанового числа (до 58.73) у биодизельного топлива, полученного из биомассы, выращенной в условиях недостатка соединений азота в среде. Биотопливо, полученное из микроводоросли *Fasciculochloris boldii* [35] с содержанием липидов $26.8 \pm 1.1\%$ с высокой долей НЖК (71.2%), обладало достаточным показателем цетанового числа (63.3) и низким йодным числом (38.9). Таким образом, не все штаммы микроводорослей обладают высоким содержанием липидов с высоким уровнем НЖК и МНЖК, однако при изменении

режима культивирования (в том числе, при использовании миксотрофных условий), возможно добиться увеличения уровня этих жирных кислот и получить биодизельное топливо, соответствующее международным стандартам качества.

1.1.2 Выделение и анализ свойств штаммов микроводорослей, продуцирующих углеводы

Микроводоросли используются в основном для получения биомассы с высоким содержанием нейтральных липидов до (60–70%). Некоторые штаммы способны накапливать значительное количество углеводов (40–50%), что делает возможным их применения как сырья для последующего сбраживания микроорганизмами или химической (каталитической) переработки с получением востребованных веществ. В частности, микроводоросли накапливают эндо- и экзополисахариды, последние могут выделяться в культуральную среду или оставаться связанными с клеточной стенкой.

Отдельные штаммы микроводорослей обладают высокой способностью к синтезу углеводов, например, *Chlorella* sp. MI (57.8 ± 16.6) и *Desmodesmus* sp. FG (53.5 ± 14.2) [36]. Большинство микроводорослей продуцируют углеводы в ответ на возникновение стрессовых условий. Например, в работе [37] были изучены две микроводоросли - *Nannochloropsis gaditana* (морская), и *Parachlorella kessleri* (пресноводная). Выявлено, что *N. gaditana* накапливала значительно меньше углеводов, чем *P. kessleri*. После этого было обнаружено, что наибольшая скорость накопления углеводов у *N. gaditana* при недостатке соединений азота в среде составила 3.4×10^{-3} кг м⁻² сут⁻¹ при снижении концентрации NO₃⁻ в среде на 56%. *P. kessleri* продемонстрировала потенциал для применения в качестве углеводсодержащего сырья для получения биоэтанола путем их последующего сбраживания дрожжами.

Снижение концентрации соединений азота и фосфора в среде оказывает наиболее выраженное влияние на накопление углеводов микроводорослями. В частности, у штамма *Coccomyxa* sp. ITRSTKM4 [38] при уменьшении концентрации в среде соединений азота, фосфора и серы обнаружено снижение содержания биомассы и хлорофилла в клетках, что компенсировалось стабильной эффективностью фотосистемы II и повышенным содержанием липидов в клетках. Максимальное содержание липидов (~ 41%) и скорость их накопления (22.0 ± 2.2 мг л⁻¹ сут⁻¹) были достигнуты при дефиците всех трех типов соединений. Однако только снижение содержания соединений серы в среде приводило к увеличению содержания углеводов в клетках *Coccomyxa* sp. ITRSTKM4 (до 33%). В работе [39] проводили культивирование штамма *Desmodesmus* sp. в среде, лимитированной по нитратам и с использованием дымовых газов, что увеличивало накопление углеводов в микроводорослях ($32.44 \pm 0.45\%$ и 327.65 ± 23.39 мг л⁻¹), а

также наблюдалось небольшое увеличение содержания липидов ($41.54 \pm 1.13\%$ и 419.57 ± 31.52 мг л⁻¹). Теплотворная способность биомассы при этом составляла 21.97–23.17 МДж кг⁻¹. Тем не менее, на примере зеленой водоросли *Picocystis salinarum* было показано [40], что чрезмерное снижение соединений азота в среде (до 9.375 мг л⁻¹) оказывало положительное влияние на накопление липидов (до 33.87% по сухому веществу), при этом наблюдалось снижение содержания углеводов (30.98% по сухому веществу) и белка (1.89% по сухому веществу).

Помимо изменения состава культуральной среды, на накопление углеводов у микроводорослей также оказывает влияние уровень освещенности культуры. Для подтверждения этого факта штамм термотолерантной микроводоросли *Chlorella thermophila* подвергали воздействию различных световых режимов в пилотном панельном фотобиореакторе (объемом 50 л) [41]. Выявлено, что самое высокое содержание каротиноидов (0.69%) и углеводов (38%) в биомассе было отмечено в режиме постоянного освещения. Высокий уровень накопления биомассы (16.4 мг л⁻¹) с содержанием белка (10.5 мг л⁻¹) и углеводов (0.76 мг л⁻¹) был достигнут в режиме непрерывной освещенности, равной 4500 лк. В работе [42] проведена оценка влияния освещенности с использованием различных светодиодов (белые, красные и синие диоды со интенсивностью освещения 850 мкмоль м⁻² сут⁻¹) на параметры культивирования *Chlorella* sp. AE10 при недостатке соединений азота и фосфора в среде. Недостаток соединений азота и фосфора в среде отрицательно сказался на скорости прироста его биомассы. Скорость накопления биомассы составляла 1.90 г л⁻¹ сут⁻¹ при освещении лампами белого света. Недостаток соединений фосфора в среде способствовал накоплению углеводов при освещении всеми тремя типами светодиодов, максимальное содержание углеводов составило 75.9% при использовании красного света. Содержание насыщенных жирных кислот увеличилось с 37.51% при освещении светом синей области спектра до 77.44% при снижении концентрации соединений азота в среде. Аналогично для микроводоросли *C. vulgaris* [43] было выявлено, что интенсивность освещения и количество CO₂ в подаваемой газовой смеси являются факторами, которые существенно влияют на накопление биомассы.

В работе [44] было показано, что статические магнитные поля влияют на метаболизм микроорганизмов и применяются для увеличения накопления биомассы микроводорослей и отдельных соединений, в том числе углеводов. Показано, что при этом увеличивалось содержание крахмала в биомассе *Chlorella fusca*, при том, что содержание глюкозы уменьшилось, а фукозы, арабинозы, рамнозы, галактозы и глюкуроновой кислоты, наоборот, увеличилось.

Для индукции накопления углеводов в биомассе микроводорослей также использовали различные добавки и измерение pH среды. На примере микроводоросли *Scenedesmus acuminatus* [45] анализировали влияние низкой концентрации нитратов и фосфатов в среде, а также добавки магния, лизина и начального pH культуральной среды на накопление биомассы и углеводов.

Показано, что добавление магния и лизина стимулировало накопление биомассы, в частности лизин (0.5 г л^{-1}) увеличивал скорость накопления углеводов с 13.4 ± 1.8 до $38.4 \pm 2.4 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ (при pH среды 9.0). Доказанное влияние увеличения концентрации лизина в среде на параметры роста микроводорослей открывает новые возможности для изучения отходов переработки картофеля и соевого шрота в качестве недорогих источников лизина. Такой подход направлен на увеличение накопления углеводов в микроводорослях и повышения рентабельности производства биоэтанола из их биомассы.

В качестве других веществ, использовавшихся для ускорения роста биомассы, использовали мио-инозитол, который является низкомолекулярным клеточным регулятором и, наряду с витаминами группы В, необходим для роста клеток и для протекания других внутриклеточных процессов. В частности, у растений мио-инозитол является вторичным посредником в процессах, индуцируемых под действием гормонов ауксинов в растениях и стимулирующих их рост [46]. Для микроводоросли *Chlorella sorokiniana* показано, что содержание углеводов в клетках водорослей увеличивается с ростом концентрации мио-инозитола в среде, в то время как содержание белка снижается [47]. Помимо мио-инозитола в качестве стимулятора роста также использовали ацетилсалициловую кислоту и кофеин, которые увеличивали содержание белка свыше 66% у *S. obliquus* [48].

Исследования в области процессов накопления углеводов в биомассе микроводорослей при культивировании в сточных водах, как наиболее дешевом субстрате для культивирования, пока являются ограниченными. В одной из последних работ по этой теме [49] было показано, что при удлинении световой фазы до 24 ч увеличение содержания белка в биомассе составило 15% при культивировании в сточных водах, а углеводов возросло на 6.5% при культивировании в среде, имитирующей сточные воды, что свидетельствует о влиянии продолжительности освещения на содержание углеводов в биомассе. Поскольку состав сточных вод довольно сложен, а также в нем присутствуют различные соединения, которые могут негативно влиять на жизнедеятельность клеток микроводорослей, в работе [50] была проведена оценка влияния концентрации хлора, использующегося в процессах водоочистки, на накопление крахмала микроводорослями. Было показано, что содержание хлора 2.0 мг л^{-1} является предельным для эффективного накопления биомассы и углеводов у микроводорослей.

1.1.3 Влияние стрессовых факторов на состав биомассы микроводорослей

1.1.3.1 Влияние состава среды и внешних факторов

В работе [51] описан новый вид микроводоросли *Nephrochlamys yushanlensis*, у которого содержание липидов в биомассе составляло 58.64% при культивировании в среде, дефицитной по соединениям азота. При этом значительное увеличение содержания триацилглицеридов (ТАГ) происходило в условиях обеднения среды по соединениям фосфора и азота (до 23.69% и 21.74%, соответственно), по сравнению с контролем (16.90%). Основными жирными кислотами, обнаруженными в биомассе, были олеиновая (49.8-64.1%), пальмитиновая (21.1-22.7%) и линолевая (8.6-10.3%). Недостаток соединений фосфора привел к появлению линоленовой (1.5-4.1%) и стеариδοновой 18:4 (1.0-1.8%) жирных кислот. Выявлено, что суммарное содержание НЖК и МНЖК увеличивалось до 88.9% от общего количества жирных кислот в условиях дефицита соединений азота в среде, что позволяет предположить, что этот штамм может использоваться для получения биодизельного топлива высокого качества. Для биомассы микроводоросли *Isochrysis galbana* при снижении концентрации соединений азота в среде [52], наоборот, показано высокое содержание углеводов в биомассе, равное 47%, а также низкая концентрация белка. Количество ПНЖК увеличивалось в пять раз при содержании в среде 72 мг л⁻¹ NaNO₃ по сравнению со средой с низкой концентрацией этого соединения. Напротив, концентрация НЖК при полном отсутствии соединений азота у этой микроводоросли была больше (75.79%), чем в случае исходной среды (36.63%). Другой результат получен для микроводоросли *Tisochrysis lutea* [53], которая при культивировании в среде f/2 с ацетатом натрия при недостатке соединений азота преимущественно накапливала МНЖК и ПНЖК (в том числе содержащие жирные кислоты с четырьмя ненасыщенными связями). Таким образом, снижение соединений азота в среде не только вызывало накопление липидов у микроводорослей, но также разнонаправленно влияло на их жирнокислотный состав, что делает необходимым поиск штаммов, способных накапливать преимущественно липиды с высоким содержанием НЖК для получения биотоплива, соответствующего существующим стандартам.

При анализе влияния комбинации стрессовых факторов на накопление липидов микроводорослей выявлено, что у штамма микроводоросли *Auxenochlorella protothecoides* KP7 при недостатке соединений азота и щелочном pH среды наблюдалось увеличение содержания ТАГ (до 81.25% от общих липидов) и крахмала, при этом снижалось содержание хлорофилла и белка. Основными жирными кислотами у *A. protothecoides* KP7 были C18:1 (57.5%), C18:2 (19.5%), C16:0 (12.5%) и C18:3 (5.6%), а процентное содержание НЖК, МНЖК и ПНЖК

составляло 16.3, 58.4 и 25.1%, соответственно. Кроме того, воздействие комбинации стрессовых факторов позволило получить на основе этих липидов МЭЖК, характеризующиеся низким йодным числом (97.64 г I_2 на 100 г), высокой окислительной стабильностью (7.29 ч) и высоким цетановым числом (55.26) [54]. На примере микроводоросли *Tetrademus obliquus* SAG 276-3a аналогично было показано двукратное увеличение накопления биомассы при добавлении в среду для культивирования 0.16% цитрата и 0.08% бикарбоната натрия по сравнению с контролем. Увеличение содержания липидов в 4.5 раза также наблюдалась при добавлении в культуральную среду 0.16% ацетата и 0.16% цитрата натрия. Анализ состава МЭЖК, полученных из липидов *T. obliquus* SAG 276-3a, показал преобладание метиловых эфиров НЖК и МНЖК. Анализ свойств образцов биодизельного топлива показал, что они соответствуют индийским, американским и европейским стандартам качества биодизельного топлива [55]. Таким образом, использование среды для культивирования с пониженным содержанием соединений азота вместе с карбонатно-бикарбонатным буфером, является перспективным для увеличения содержания липидов (в том числе ТАГ) в биомассе микроводорослей.

Влияние соединений железа на процесс культивирования микроводорослей было исследовано на примере микроводоросли *A. protothecoides* [56]. Выявлено, что эта микроводоросль способна расти при концентрации Fe^{2+} вплоть до 21.6 мМ. Наибольшее количество НЖК (78.5%) наблюдалось при добавлении в среду 1.15 мМ $FeCl_2$, а наибольшее накопление биомассы - при 1.08 мМ $Fe_2(SO_4)_3$. Качество получаемого биодизельного топлива соответствовало стандартам, если сырье было получено из биомассы, выращенной при добавлении в среду 0.2 -14.4 мМ $Fe_2(SO_4)_3$. В работе [57] было показано, что низкие концентрации Fe^{3+} (0-0.002 мМ) способствовали накоплению биомассы штаммом *C. sorokiniana*, в то время как высокие концентрации (0.01 мМ) снижали этот показатель. Добавление как Fe^{3+} , так и Zn^{2+} в среду для культивирования увеличивало содержание липидов у *C. sorokiniana* (до 64.91%), тогда как добавление Mn^{2+} оказывало меньшее влияние на их накопление. Основными жирными кислотами, обнаруженными в биомассе, были пальмитиновая и стеариновая, линолевая кислота присутствовала в меньшем количестве. Ионы Fe^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} изменяли соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с одинаковой длиной углеродной цепи, но не влияли на их содержание в биомассе. В целом, можно сделать вывод, что получение высококачественных липидов может быть достигнуто путем изменения концентрации соединений железа в среде при культивировании микроводорослей.

Использование комбинации стрессовых факторов, связанных со снижением концентрации питательных веществ и добавлением солей металлов в среду, оказалось эффективным для повышения содержания липидов в биомассе микроводорослей. Для штамма *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 было показано, что снижение концентрации соединений

азота в среде и добавление солей марганца в первую очередь снижает скорость роста клеток, в то время как снижение концентрации соединений фосфора и железа приводит к ее увеличению. При этом уменьшение концентрации соединений фосфора в среде снижало содержание липидов в биомассе, а уменьшение содержания азотистых соединений, напротив, увеличивало количество липидов. При снижении концентрации солей железа и марганца наблюдалось образование большого количества ПНЖК, таких как эйкозапентаеновая кислота 20:5(n-3). Уменьшение концентрации соединений фосфора способствует накоплению в биомассе МНЖК (C18:1 и C16:1), в то время как уменьшение концентрации соединений азота в среде способствует образованию НЖК, в том числе миристиновой (C14:0), C16:0 и C18:0 [58].

Помимо состава культуральной среды, ряд внешних факторов также может оказывать влияние на состав биомассы микроводорослей. В том числе показано, что содержание НЖК значительно увеличилось при возрастании интенсивности освещения при культивировании *Chlorococcum oleofaciens* KF584224.1, в то время как количество МНЖК и ПНЖК снизилось. Свойства биодизельного топлива, полученного из *C. oleofaciens*, при культивировании при интенсивности освещения 50 мкмоль м⁻² с⁻¹, соответствовали стандартам качества биодизельного топлива (EN 14214 и ASTM D6751). При этом более высокая интенсивность освещения (до 400 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹) улучшала качество получаемого биодизельного топлива [59]. Наоборот, в работе [60] выявлено, что наибольший суточный прирост биомассы микроводоросли *Eustigmatos magnus* и содержание липидов достигались при непрерывном освещении и максимальной интенсивности света, также наблюдалось увеличение содержания олеиновой кислоты и снижение содержания НЖК и МНЖК.

Как и в случае влияния состава культуральной среды на накопление липидов, комбинация внешних воздействий также изменяет состав биомассы микроводорослей. Температура культивирования - один из основных факторов, сказывающийся на росте и накоплении липидов микроводорослей. Результаты показали, что удельная скорость роста, накопление биомассы и содержание липидов микроводорослей снижались с повышением температуры [61]. Содержание НЖК у *Tetraselmis suecica* FIKU032 и *Nannochloropsis* sp. FIKU036 снижается с повышением температуры, в отличие от ПНЖК. Кроме того, штамм *Chaetoceros* sp. FIKU035 с оптимумом накопления биомассы при 40 °C обладал наибольшей скоростью накопления липидов при 25 °C (66.73 ± 1.34 мг л⁻¹ сут⁻¹) и 30 °C (61.35 ± 2.89 мг л⁻¹ сут⁻¹). Кроме того, свойства биодизельного топлива (цетановое число, кинематическая вязкость и плотность), полученного из биомассы этого вида микроводоросли, соответствовали стандартам качества биодизельного топлива. В другом исследовании оценивалось влияние концентрации нитратов (37.1–78.8 мг л⁻¹), температуры (20–36 °C) и интенсивности света (140–364 мкмоль м⁻² с⁻¹) на накопление биомассы *Pseudoneochloris marina* и ее биохимический состав [62].

Максимальная скорость накопления биомассы ($0.26 \text{ г л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) была достигнута при $74.1 \text{ мг л}^{-1} \text{ NO}_3^-$, 28°C и $252\text{--}364 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Содержание белка снижалось с увеличением освещенности и составляло $236 \pm 18 \text{ мг г}^{-1}$ при 20°C и $140 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Количество НЖК, МНЖК и ПНЖК было оценено как $46.1 \pm 1.5\%$, $10.6 \pm 1.7\%$ и $43.3 \pm 1.0\%$ от общего содержания жирных кислот. Состав жирных кислот характеризовался наличием C16:0, C18:2, C18:3 и C18:1. Наименьшее отношение $\omega 6:\omega 3$ составило 1.6 ± 0.1 и наблюдалось в экспериментах при самой низкой температуре.

Для применения в открытых прудах перспективно использование термотолерантных штаммов микроводорослей, которые легко адаптируются к суточным перепадам температур. Два термотолерантных штамма *Micractinium* sp. и *Scenedesmus* sp. выращивали в режиме 16 ч световая фаза (30°C) и 8 ч темновая фаза (16°C) [63]. Оба штамма обладают способностью накапливать биомассу при $10 - 50^\circ \text{C}$. Обнаружено, что скорость накопления липидов в этих условиях у *Micractinium* sp. и *Scenedesmus* sp. составила 6 и $7 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, соответственно. Содержание насыщенных жирных кислот у *Micractinium* sp. увеличивается с повышением температуры. Наибольшая скорость накопления липидов у этого штамма, равная $85.4 \pm 2 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, была получена при снижении концентрации соединений фосфора во время фазы экспоненциального роста, при этом количество олеиновой кислоты увеличивалось в восемь раз.

Помимо воздействия температуры и света, на состав биомассы микроводорослей также оказывает влияние обработка ультразвуком. В работе [64] применяли комбинированный подход с использованием пониженной концентрации соединений азота и фосфора с одновременной ультразвуковой стимуляцией клеток для увеличения концентрации биомассы и содержания липидов у микроводоросли *Desmodesmus intermediatus* Z8. В этом случае показано увеличение фракции липидов C₁₆ - C₁₈ и НЖК на 20.28% и 50.29%, соответственно.

Абсцизовая, жасмоновая и салициловая кислота участвуют в регуляции многих физиологических процессов у растений. Для индукции накопления липидов у *C. vulgaris* в работе [65] исследовано влияние этих регуляторов роста на накопление липидов. Выявлено, что жасмоновая кислота в концентрации 0.5 мг л^{-1} вызывала накопление липидов в биомассе (49%) у микроводоросли *C. vulgaris* ZF, что в два раза выше, чем в исходных условиях, при этом скорость накопления липидов увеличивалась на 127%. Скорость накопления липидов увеличивалась на 123% при добавлении 1.0 мг л^{-1} абсцизовой кислоты, на 100% при добавлении 10 мг л^{-1} салициловой кислоты. Приведенные выше результаты предполагают, что три фитогормона в физиологических концентрациях играют решающую роль в индукции накопления липидов у микроводорослей.

1.1.3.2 Влияние солей на накопление липидов микроводорослями

Ранее было выявлено, что солевой стресс является эффективным способом повышения накопления липидов клетками микроводорослей. Для *C. sorokiniana* SDEC-18 показано, что солевой стресс способствует перераспределению потоков соединений углерода внутри клеток микроводорослей и превращению крахмала в липиды. При добавлении 20 г л^{-1} NaCl в среду BG11 скорость накопления липидов составила $19.66 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, что в 2.16 раза больше, чем в исходной среде BG11 [66]. В целом микроводоросли обладают способностью к накоплению биомассы при концентрации солей до $20\text{--}30 \text{ г л}^{-1}$, при этом в работе [67] показана способность *C. vulgaris* расти при концентрации солей 45 г л^{-1} .

Состав солей, применяемых для индукции накопления липидов у микроводорослей, оказывал влияние в том числе и на насыщенность липидов в их биомассе. В работе [68] сравнивали влияние солевого стресса (с использованием NaCl, KCl и LiCl) на накопление липидов микроводорослью *Chlamydomonas reinhardtii* 137с. Добавление в среду NaCl увеличило содержание НЖК до 70.2%, добавление KCl незначительно увеличило количество НЖК (до 47.05%), при этом содержание ПНЖК составило 45.77%. Показано, что при добавлении NaCl увеличивается экспрессия пируватдегидрогеназы (PDH2), ацетил-КоА карбоксилазы, генов MAT и KAS2. Изменение синтеза жирных кислот было связано со сверхэкспрессией MAT, отвечающего за синтез малонил-ACP, участвующего в синтезе липидов. В отношении других солей было показано, что у *Scenedesmus vacuolatus* добавление 70 mM CaCl_2 в среду увеличивает содержание липидов в биомассе на 253% [69]. В работе [70] изучали влияние комбинации двух солей (NaCl и CaCl_2) на накопление липидов у *C. reinhardtii*. Микроводоросль сначала культивировали в среде без солей, затем добавляли NaCl ($50\text{--}200 \text{ mM}$) и CaCl_2 (100 mM). Использование комбинации 100 mM NaCl и 100 mM CaCl_2 привело к максимальному накоплению липидов (73.4%), скорость их накопления составила $10.9 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, что в 3.5 и 2.1 раза больше, чем в исходной среде, соответственно. В этих условиях показано увеличение активности глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, ацилтрансферазы лизофосфатидной кислоты и диацилглицерол ацилтрансферазы, которые участвуют в накоплении липидов у *C. reinhardtii*. Следовательно, использование комбинации 100 mM NaCl и 100 mM CaCl_2 является потенциально многообещающей стратегией для повышения содержания липидов в биомассе микроводорослей.

Анализ состава жирных кислот липидов микроводорослей показал, что при солевом стрессе у подавляющего большинства микроводорослей увеличивается содержание НЖК. Например, для коричневой микроводоросли *Amphora* sp. показано, что в условиях повышенной солености среды доля C_{16} жирных кислот составляет 75%, а НЖК (в том числе $\text{C}_{16:0}$ 27.41%) -

41.31% [71]. Для *A. protothecoides* было показано, что увеличение содержания НЖК в биомассе до 43.9% достигается при добавлении 5 г л⁻¹ NaCl. При этом при использовании комбинации солей магния и натрия наибольшее содержание линолевой кислоты (35.2%) было обнаружено при добавлении 0.3 мг л⁻¹ Mg²⁺ с 2.5 г л⁻¹ NaCl, а наибольшее содержание биомассы - при 18.5 мг л⁻¹ Mg²⁺ с 5.0 г л⁻¹ NaCl [72]. В работе [73] для повышения содержания липидов с высокой насыщенностью использован двухфазный способ культивирования *C. vulgaris*. На первом этапе *C. vulgaris* выращивали на синтетической среде для получения максимальной концентрации биомассы. Эффективность удаления веществ составила 80.5% (ХПК), 70% (общий азот) и 78% (общий фосфор). На втором этапе индуцировали накопление липидов путем добавления NaCl. Оптимальными условиями для относительно высокой скорости накопления липидов (до 80 мг л⁻¹ сут⁻¹) являлись 2.6 мг л⁻¹ NaNO₃ и 6.3 г л⁻¹ NaCl, что также позволило увеличить количество НЖК на 27.3%. Хотя солевой стресс вызывает преимущественно увеличение НЖК, для микроводоросли *C. vulgaris* UMT-M1 [74], выделенной из образца, отобранного в мангровых зарослях, растущих в условиях высокой солености (до 30 промилле), показано высокое содержание ПНЖК, в том числе коротко-, средне- и длинноцепочечных жирных кислот (в том числе арахидоновой C20:0) в сочетании с высоким уровнем C18:1 и C18:2 в стационарной фазе роста. При этом накопление в клетках C18:3 обнаруживалось при переходе из стационарной фазы в новую фазу роста. Наибольшее содержание липидов было зарегистрировано в биомассе при солености 15 промилле (63.5%) без влияния на скорость накопления биомассы.

Для индукции синтеза липидов в работе [75] была использована комбинация стрессовых факторов, в которой сравнивали влияние двух условий – высокой солености и дефицита соединений азота в среде при культивировании *Dunaliella tertiolecta*. Показано, что максимальное содержание углеводов (59.4%) и скорость накопления углеводов (65.23 мг л⁻¹ сут⁻¹) достигались при отсутствии солей в среде, наибольшее содержание липидов (39%) - при 3.7 г л⁻¹ солей. При этом недостаток NaNO₃ в среде увеличивал содержание липидов с 38.4% до 53.14%, что говорит о том, что влияние солености среды на синтез липидов было более существенным, чем других факторов. Анализ биохимического статуса микроводорослей при солевом стрессе проведен в работе [76], в которой изучали влияние комбинации стрессовых факторов на накопление липидов микроводорослью *Scenedesmus* sp. Результаты показали, что при культивировании на среде, содержащей NaCl (100 mM), NaNO₃ (0 mM) и K₂HPO₄ (0.22 mM), микроводоросль накапливала большое количество липидов (385.4 ± 34.2 мкг м г⁻¹), биомассы (537.0 ± 22.3 мкг мл⁻¹), хлорофилла а (6.2 ± 0.08 мкг мл⁻¹) и пальмитиновой кислоты (32.6%). Показано накопление стресс-индуцируемого биомаркера (H₂O₂), концентрация которого была максимальной для той же комбинации стрессовых факторов (10.854 ммоль H₂O₂ г⁻¹). В другом исследовании увеличение солености в среде путем добавления 500 mM NaCl при культивировании *C. vulgaris* YH703

привело к увеличению содержания липидов с 12.7 до 24.5%. При этом также было отмечено увеличение уровня биомаркеров стресса, таких как: перекись водорода, аскорбатпероксидаза (APX) и пролин. Таким образом было выявлено, что *C. vulgaris* YH703 является штаммом, устойчивым к окислительному стрессу при высокой концентрации солей в среде [77]. Помимо снижения активности антиоксидантных систем клетки при солевом стрессе для других микроводорослей обнаружено изменение морфологии клеток и увеличение их размера на 33.52% (для *C. humicola*) и 27.79% (для *C. vulgaris*) при добавлении в среду для культивирования 100 мМ NaCl. Показано снижение содержания C, S, Fe, Mg, Si, Mn и Zn на 14-54% в биомассе обеих микроводорослей. Кроме того, было обнаружено, что *C. humicola* обладает более высоким содержанием липидов, чем *C. vulgaris* при солевом стрессе. Активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионредуктазы была увеличена в 2.5-5 раза у обеих водорослей по сравнению с контролем. Повышенный уровень аскорбата натрия, цистеина и пролина в биомассе обеих водорослей в этих условиях указывает на выработку стрессовых маркеров [78]. Для пресноводной микроводоросли *S. obliquus* XJ002 было показано, что стресс, вызванный добавлением NaCl в среду, приводил к повреждению реакционного центра фотосистемы II и подавлял перенос электронов на его донорной и акцепторной сторонах [79]. Наибольшее содержание липидов (32.26%) было обнаружено в клетках, культивируемых в присутствии 0.2 М NaCl, что примерно в 2.52 раза больше, чем у клеток, выращенных в среде без NaCl (12.82%).

В работе [80] изучали влияние температуры и солености среды на состав биомассы галофильной диатомовой водоросли *Amphora* sp. MUR258, способной расти в диапазоне температур 24–35 °C и при высокой солености среды (7–12% NaCl). Максимальная удельная скорость роста (0.607 ± 0.017 сут⁻¹) была достигнута при использовании 7% NaCl и 35 °C, а самая низкая (0.433 ± 0.087 сут⁻¹) - при 9% NaCl и 25 °C. Максимальное содержание липидов у *Amphora* sp. MUR 258 ($57.69 \pm 2.039\%$) достигается при 7% NaCl и 25 °C, а самое низкое ($34.43 \pm 3.955\%$) - при 12% NaCl и 35 °C. Независимо от условий роста, преобладающими жирными кислотами *Amphora* sp. MUR 258 являлись C16:0, C18:0, C16:1 и C18:1, а также эйкозапентаеновая кислота C20:5. При этом в другом исследовании при анализе свойств термотолерантного штамма *Chlorella pyrenoidosa* M18, растущего при 45 °C, обнаружено, что при его культивировании в среде с морской водой в открытом пруду он демонстрировал высокую скорость накопления липидов, равную 51 мг л⁻¹ сут⁻¹, что почти в два раза больше, чем в пресной воде. Количество углеводов в биомассе в этих условиях составило 32%. Кроме того, воздействие высокой солености привело к увеличению содержания хлорофилла [81].

Анализ влияния светового режима культивирования в комбинации с солевым стрессом выявил, что у *Dunaliella tertiolecta* [75] при выращивании в темноте в условиях низкой солености (3.7 промилле) наблюдается максимум накопления липидов в биомассе (39%), при этом

максимальное содержание углеводов (59.4%) достигается только в условиях более высокой солености. Содержание липидов и углеводов увеличивалось с 38.4 до 53.14% и с 28 до 45%, соответственно, при недостатке NaNO_3 в среде, и было менее выражено, чем при солевом стрессе.

При анализе влияния миксотрофного культивирования в сочетании с солевым стрессом на состав и накопление биомассы микроводорослей выявлено, что накопление биомассы повышается в миксотрофных условиях, но снижается при наличии солевого стресса. Содержание липидов при этом увеличивалось с повышением солености в миксотрофных условиях у *C. vulgaris* (23.0% в 0.0214 М NaCl), когда накопление биомассы было минимальным. Это исследование также показало, что *C. vulgaris* быстро адаптируется к солевому стрессу [82]. В исследовании [83] изучали комбинированное влияние NaCl, глюкозы и глицерина на состав биомассы *C. vulgaris* SAG 211–12. Максимальное количество C16:0 (40.67%) было получено в среде с добавлением 0.9% NaCl, 0.3% глюкозы и 0.3% глицерина, тогда как C18:0 (22.16%) - в присутствии 2.5% NaCl, 0.6% глюкозы и 0.6% глицерина. Согласно этому же исследованию, наибольшее содержание крахмала (22.08%) было достигнуто в присутствии 2.0% NaCl, 0.3% глюкозы и 0.3% глицерина. В работе [84] рассмотрено влияние солевого стресса на смешанные культуры микроводорослей, в которых преобладали *C. vulgaris* и *Scenedesmus armatus*, при культивировании в сточных водах в присутствии различных концентраций NaCl (до 100 мМ). Содержание липидов и углеводов составило 38.4% и 36.2%, соответственно, в присутствии 50 мМ NaCl. Однако содержание белка резко снижалось до 12.8% при увеличении концентрации NaCl. Разные виды микроводорослей по-разному реагировали на солевой стресс. Относительно высокая устойчивость микроводорослей в присутствии солей в среде показана в работе [67], где обнаружена способность *C. vulgaris* расти при концентрации солей 45 г л⁻¹. Солевой стресс снизил скорость роста водорослей в сточных водах до 0.003 сут⁻¹ на 1 мСм см⁻¹ и скорость потребления питательных веществ. При этом содержание липидов повысилось с 11.5% до 16.1%.

Для получения более эффективных штаммов-продуцентов, обеспечивающих больший уровень накопления биомассы в солевых условиях, использовали адаптивную лабораторную эволюцию в условиях высокой солености, для *Schizochytrium* sp. с целью улучшения его антиоксидантных свойств и уровня накопления липидов. Штамм *Schizochytrium* sp. ALE150, который был получен через 150 дней эксперимента, достиг концентрации биомассы 134.5 г л⁻¹ и липидов 80.14 г л⁻¹, что на 32.7 и 53.31% больше, чем у исходного штамма, соответственно [85]. Более того, ALE150 показал в целом более высокую общую антиоксидантную активность и более низкий уровень активных форм кислорода, чем исходный штамм. Транскриптомный анализ выявил активацию экспрессии генов, связанных с антиоксидантными ферментами и центральным углеродным метаболизмом, а также изменение метаболических потоков в направлении синтеза жирных кислот и поликетидсинтазы. В работе [86] был проведен

радиационный мутагенез *Chlamydomonas* sp. JSC4, в результате получены штаммы, которые растут в присутствии 7% морской соли. Транскрипционный анализ выявил нарушение переключения биосинтеза с крахмала на синтез липидов, что привело к замедлению метаболизма крахмала и снижению содержания липидов в устойчивом к солям штамме *Chlamydomonas* sp. JSC4. При этом снизилась агрегация клеток и не наблюдалось значительных изменений в их морфологии, что указывает на его высокую устойчивость штамма к солевому стрессу. Эти результаты свидетельствуют о том, что именно солевой стресс важен для активации механизмов накопления липидов в микроводорослях.

1.1.4 Анализ метаболизма штаммов микроводорослей в процессе накопления липидов

Получение биодизельного топлива с использованием биомассы микроводорослей играет ключевую роль в удовлетворении будущих глобальных потребностей в энергии. Понимание метаболизма микроводорослей в отношении накопления липидов необходимо для создания эффективных штаммов-продуцентов липидов. В ряде исследований показано, что биосинтез углеводов (в особенности крахмала) у микроводорослей тесно связан с процессом накопления липидов, а снижение уровня крахмала в клетках приводит к увеличению накопления липидов. Однако внутриклеточные механизмы, контролирующие перераспределение метаболических потоков от процессов накопления крахмала до накопления липидов у микроводорослей, остаются неясными.

На примере микроводоросли *Chlamydomonas* sp. JSC4 ранее был впервые продемонстрирован механизм внутриклеточного переключения синтеза крахмала на синтез липидов под влиянием высокой солености среды. Показаны изменения в экспрессии генов, связанных с синтезом липидов (ацетил-КоА карбоксилаза, пируватдекарбоксилаза, ацетальдегиддегидрогеназа, ацетил-КоА синтаза и пируват:ферредоксин оксидоредуктаза) и генов, связанных с катаболизмом крахмала (фосфорилаза крахмала) [87]. Другая микроводоросль *Ettlia oleoabundans* в стрессовых условиях (при снижении концентрации соединений азота в среде) накапливает как крахмал, так и липиды. Секвенирование РНК показало, что участвующие в синтезе и катаболизме крахмала гены демонстрируют иную динамику экспрессии, чем гены биосинтеза липидов. Быстрое увеличение количества мРНК генов, связанных с процессами синтеза крахмала у *E. oleoabundans* сопровождалось увеличением количества мРНК генов, кодирующих ферменты, участвующих в гидролизе крахмала. Напротив, повышенная экспрессия генов жирных кислот и синтез ТАГ инициировались позже и происходили постепенно.

Экспрессия генов десатуразы жирных кислот снижалась при дефиците соединений азота, что соответствует увеличению уровня МНЖК и НЖК в ее биомассе [88].

Солевой стресс вызывает не только увеличение содержания ТАГ, но и изменяет состав клеточных мембран. Выявлено, что при концентрациях NaCl до 20 г л⁻¹ у *Micractinium* sp. XJ-2 накопление ТАГ в основном зависит от процесса фотосинтетической фиксации углерода, метаболизма углеводов и ремоделирования мембранных липидов, а также наблюдается увеличение фосфатидилэтаноламина. Обнаружено, что ремоделирование липидов мембран микроводорослей под действием солевого стресса основано на следующих процессах: увеличение количества фосфолипидов с уменьшением количества гликолипидов и удлинении длинноцепочечных жирных кислот [89]. Аналогично при анализе метаболизма микроводорослей с высоким содержанием липидов при дефиците соединений азота в среде у *C. protothecoides* (содержание липидов - 57%), арктической микроводоросли *Coccomyxa subllipsoidea* (63.84%) и морской микроводоросли *Nannochloropsis oculata* (59.95%) было выявлено, что фосфатидилхолин является маркером накопления липидов. Блокирование синтеза фосфатидилхолина увеличило содержание липидов на 138.74%, 145.24%, 100%, соответственно для перечисленных микроводорослей и на 168% для *C. reinhardtii*. Содержание жирных кислот C₁₆-C₁₈ у исследуемых штаммов превышало 76%. Эти метаболические биомаркеры могут являться универсальными мишенями для направленного увеличения накопления липидов при изучении регуляторных механизмов биосинтеза липидов в микроводорослях [90].

Увеличение концентрации соли в среде индуцирует глобальное изменение метаболизма у микроводорослей, в том числе связанного с ключевыми биохимическими циклами. Показано, что солевой стресс индуцировал увеличение экспрессии дигидролипоилдегидрогеназы (этот фермент участвует в образовании ацетил-КоА и связан с накоплением ТАГ в микроводорослях) у *Chlamydomonas nivalis* (в 1.1 раза), в то время как у *C. reinhardtii* его уровень остался неизменным. У *C. nivalis* при солевом стрессе наблюдалось снижение экспрессии гена, кодирующего UDP-сульфохиновозу (в 1.77 раза), которая участвует в метаболизме сульфохиновозилдиацилглицерина, и цитратсинтазы (в 2.7 раза), которая также участвует в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК). Было показано, что снижение экспрессии генов, кодирующих эти ферменты, приводит к увеличению накопления ТАГ [91]. Известно, что НАДФ⁺, образующийся в ЦТК, также используется для синтеза жирных кислот, из которых в последствии синтезируются ТАГ. Анализ метаболизма микроводоросли *Chlorococcum sphacosum* GD при солевом стрессе в процессе накопления липидов показал повышение экспрессии генов биосинтеза жирных кислот (*ACC*, *KASII*, *KAR*, *HAD*, *FATA*), а гены, связанные с катаболизмом, подвергались репрессии. Таким образом, накопление липидов тесно связано с метаболическими путями синтеза жирных кислот [92]. У микроводоросли *P. kessleri*, выращенной в условиях

солевого стресса, наблюдалось значительное увеличение размера клеток и содержания липидных капель в цитоплазме. Анализ транскриптома показал, что экспрессия генов, кодирующих лизофосфолипид ацилтрансферазу (LPLAT) и фосфолипазу A2, активировалась при солевом стрессе и сопровождалась накоплением C18:1 и C18:2. Липидные капли играют важную роль в устойчивости микроводорослей к солевому стрессу, участвуя в использовании компонентов клетки для модификации и изменения морфологии мембран [93].

Анализ генов, экспрессия которых активируется в ответ на солевой стресс, показал снижение активности антиоксидантных систем клеток микроводорослей. Анализ транскриптома *Dunaliella* показывает, что липидный и азотный метаболизм, структурные белки аппарата фотосинтеза, шаперон-опосредованная аутофагия и гены, связанные с активными формами кислорода, являются ключевыми элементами реакции на солевой стресс. Также предполагается наличие связи между Ca^{2+} -опосредованной передачей сигнала, накоплением липидов и активных форм кислорода в условиях солевого стресса [94]. В совокупности показано, что активные формы кислорода, NO, MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа), гены, связанных с биосинтезом липидов, и антиоксидантные системы участвуют в биосинтезе липидов у *Monoraphidium* sp. QLY-1 при комбинированном действии фульвово́й кислоты и солевого стресса [95].

В другом исследовании было показано, что в условиях стресса при добавлении солей кадмия в среду у *Auxenochlorella protothecoides* UTEX 2341 вырабатывается большое количество глутатиона, обладающего антиоксидантными свойствами, при этом содержание липидов значительно увеличивается. Это исследование впервые показало, что глутатион может активировать синтез ТАГ у микроводоросли *A. protothecoides*, что приводит к внутриклеточному накоплению ТАГ и глутатиона при индуцированном кадмием стрессе. Анализ сайтов взаимодействия с транскрипционными факторами показал, что транскрипционные факторы ABI5, MYB, REL и NF-YB могут дополнительно регулировать экспрессию диацилглицерол ацилтрансферазы посредством глутатионилирования/деглутатионилирования, что приводит к увеличению содержания ТАГ. Анализ липидома показал, что ТАГ участвует в синтезе липидов, регулируя уровни насыщенности их жирных кислот. Следовательно, накопление ТАГ и глутатиона может увеличить стрессоустойчивость микроводорослей под действием индуцированного кадмием стресса [96]. При дефиците азотистых соединений в среде у *Scenedesmus quadricauda* CASA CC202 наблюдаются биохимические изменения в митохондриях из-за индуцированного окислительным стрессом образования активных форм кислорода, а также возрастает активность пероксидазы и каталазы (23.16 и 0.79 ЕА мл⁻¹) по сравнению с контролем (20.2 и 0.19 ЕА мл⁻¹). Выявлено, что в этих условиях повышается внутриклеточная концентрация связанных со стрессом непротеиногенных аминокислот (гамма-аминомасляная кислота, глутамат и аргинин) и их энергетических эквивалентов (НАДФН и АТФ) [97].

Помимо солевого стресса, на накопление липидов оказывает влияние снижение концентрации соединений азота и фосфора в среде. Анализ метаболизма *N. gaditana* при запасании липидов показал, что снижение концентрации соединений азота связано с подавлением синтеза белка и фотосинтетической активности клеток. Накопление липидов также сопровождалось увеличением синтеза диацилглицерол ацилтрансферазы (DGAT), липаз и белков, связанных с липидными каплями. Снижение концентрации соединений фосфора обладало сравнительно меньшим влиянием на клеточный метаболизм, некоторые из экспрессируемых генов при этом были связаны с ремоделированием дыхательного метаболизма [98]. Анализ влияния низкой концентрации соединений фосфора в среде на синтез липидов был изучен на основе микроводоросли *N. oceanica*. При уменьшении концентрации соединений фосфора в среде было выявлено снижение внутриклеточного содержания белка (на 58%) и значительное увеличение липидов (в 4.4 раза), включая ТАГ, уровень углеводов и накопление биомассы при этом изменялись незначительно. Анализ транскриптома этой микроводоросли в стрессовых условиях выявил, что снижение активности цикла Кальвина (C₃-путь) компенсировалось активацией C₄-пути для фиксации CO₂, что способствовало накоплению биомассы. Стресс снижал потребление соединений азота клетками и усиливал катаболизм белка, а углеводистые соединения поступали в ЦТК для обеспечения синтеза липидов. Нарушение катаболизма ТАГ за счет подавления определенных липаз способствовало увеличению внутриклеточной концентрации ТАГ в стрессовых условиях [99].

Режим освещения, связанный с чередованием световой и темновой фаз, является важным фактором культивирования микроводорослей в открытых системах, но зачастую неблагоприятно влияет на накопление липидов. Высоколипидный мутант *Chlamydomonas* sp. KOR1 в темновой фазе с пониженной фиксацией CO₂ демонстрировал катаболизм углеводов с одновременным повышением содержания липидов и каротиноидов, что обусловлено мутацией гена *ISA1*, кодирующего изоамилазу. Анализ метаболических потоков показал, что во время световой фазы наблюдается повышение метаболического потока от CO₂ через синтез промежуточных соединений, что приводит к увеличению образования крахмалоподобных частиц, которые затем эффективно перераспределяются в следующей темновой фазе. Это исследование демонстрирует, что мутации в ферменте изоамилаза могут улучшить синтез липидов за счет ускоренного переключения метаболизма с синтеза углеводов на синтез липидов и каротиноидов при изменении режима освещения [100].

Помимо режима освещения, для культивирования микроводорослей в открытых прудах необходимо использовать штаммы с высокой адаптивностью к резким перепадам температур. На примере галотолерантной микроводоросли *Scenedesmus* sp. NREL 46B-D3, которая обладает оптимумом накопления биомассы при 25 °C, показано, что воздействие температурного стресса

изменяет метаболизм жирных кислот и увеличивает синтез аминокислот. Анализ экспрессии генов показывает, что многие гены биосинтеза жирных кислот сверхэкспрессируются под действием специфических транскрипционных факторов, активируемые при холодовом стрессе [101]. В работе [102] изучали влияние повышенной температуры на состав липидов и экспрессию генов, связанных с метаболизмом липидов, в процессе культивирования микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum*. Повышение температуры привело к увеличению липидов в ее пластидах, в том числе: моногалактозилдиацилглицерола (MGDG), дигалактозилдиацилглицерола (DGDG) и сульфохиновосилдиацилглицерола (SQDG). Параллельно наблюдалось снижение содержание нейтральных липидов в биомассе. Анализ экспрессии генов выявил активацию экспрессии гена, кодирующего MGDG-синтазу, и снижение экспрессии гена диацилглицерол ацилтрансферазы (DGAT), ключевого фермента в синтезе ТАГ.

Некоторые микроводоросли могут расти и накапливать липиды при щелочных pH среды. Для штамма *Chlorella* sp. BLD при культивировании при pH 10.0 был продемонстрирован высокий уровень накопления биомассы (0.97 г л^{-1}). При этом биохимический состав *Chlorella* sp. BLD значительно изменился (содержание липидов увеличилось на 39%, а содержание белка снизилось на 19.5%) по сравнению со средой с pH 7.5. С помощью анализа транскриптома обнаружено, что пути, связанные с метаболизмом углерода (фотосинтез, гликолиз и ЦТК), подвергаются регуляции в щелочных условиях. Была обнаружена экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты, связанных с метаболизмом углеводов, таких как: рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа, амилаза, пируваткиназа, малатдегидрогеназа, цитратсинтаза, ацетил-КоА С-ацетилтрансфераза, β -кетоацил-АДФ-синтаза и DGAT. Регуляция этих генов на уровне транскрипции в ответ на защелачивание среды приводит к переключению метаболического потока углерода с крахмала и белка на метаболизм клеточной стенки, синтез кислот и накопление липидов [103].

Увеличение синтеза ТАГ с использованием генетической инженерии у микроводорослей достигается за счет увеличения экспрессии ключевых ферментов, ответственных за накопление предшественников в синтезе ТАГ или мутаций в регуляторных элементах метаболизма липидов, в том числе транскрипционных факторов [104]. Для увеличения содержания ТАГ важны два ключевых фермента их биосинтеза: пластидная 1-ацилглицерол-3-фосфат-О-ацилтрансфераза (*NeoLPAAT1*) и локализованная в эндоплазматическом ретикулуме диацилглицерол ацилтрансфераза 2 (*NeoDGAT2*). Содержание нейтральных липидов в рекомбинантной микроводоросли *Neochloris oleoabundans* (со сверхэкспрессией *NeoLPAAT1* и *NeoDGAT2*) увеличивалось в два раза без изменения уровня накопления биомассы. У трансформанта было обнаружено значительно увеличение накопления липидов, чем у микроводоросли дикого типа: общее содержание липидов ($73.72 \pm 4.17\%$) увеличилось в 1.6 раз,

содержание ТАГ ($50.63 \pm 6.15\%$) увеличилось в 2.1 раза. Состав жирных кислот трансформанта по сравнению со штаммом дикого типа также изменился: количество C16:0 увеличилось с 20% до 26%, тогда как содержание C18:0 снизилось с 14% до 7%. Результаты показывают возможность целенаправленной генетической инженерии генов в метаболических путях, локализованных в различных органеллах, ответственных за синтез липидов у микроводорослей [105].

Влияние соединений-предшественников в синтезе ТАГ и энергетических эквивалентов на уровень накопления липидов у микроводорослей было продемонстрировано путем гетерологичной экспрессии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы *N. oceanica* в клетках *Chlorella pyrenoidosa*. При этом выявлено увеличение синтеза НАДФН в 2.19 раз, что привело к 3.09-кратному увеличению содержания нейтральных липидов в рекомбинантном штамме [106]. Ранее обнаружено, что повышенная концентрация CO₂ при культивировании увеличивает уровень липидов и накопление биомассы у *Phaeodactylum tricornutum*, при этом увеличивается активность окислительного этапа пентозофосфатного шунта. Результаты показали, что сверхэкспрессия гена, кодирующего глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, увеличивает содержание НАДФН, количество липидов (до 38%), накопление биомассы и количество ПНЖК (в том числе C20:5) [107]. Доступность ацетил-КоА играет фундаментальную роль в синтезе мембранных и запасаемых липидов. В работе [108] получена рекомбинантная микроводоросль *P. tricornutum* с повышенным уровнем синтеза ТАГ, достигнутого за счет редактирования гена, кодирующего тиоэстеразу Hotdog-fold, участвующую в гидролизе ацил-КоА (*ptTES1*), методом TALEN. Эта пластидная тиоэстераза может гидролизовать сложные эфиры как со средне-, так и длинноцепочечными жирными кислотами, но имеет наибольшую активность в отношении длинноцепочечных насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот. Инактивация гена *ptTES1* привела к 1.7-кратному увеличению содержания ТАГ в биомассе. Также было отмечено изменение профиля жирных кислот, включая увеличение содержания C16:0 и C16:1 и уменьшение C20:5 жирных кислот. При снижении концентрации соединений азота в среде содержание ТАГ увеличилось до 4.8 мг л⁻¹. Это исследование подтвердило роль *ptTES1* в метаболизме свободных жирных кислот в пластидах *P. tricornutum*. В работе [109] у *N. oleoabundans* выявлено, что содержание ТАГ в биомассе увеличивалось в 1.8–3.2 раза, уровни насыщенных жирных кислот C16:0 увеличились вдвое до 49%, тогда как C18:0 снизились втрое до 6% за счет сверхэкспрессии *NeoDGAT2*.

Другой подход к увеличению содержания липидов у микроводорослей – использование инсерционного мутагенеза. Для *N. oceanica* таким образом были получены мутанты с высоким содержанием липидов. Мутант HLM23 содержал делецию в гене *APET ALA2*-подобного фактора транскрипции, за счет чего синтез нейтральных липидов у него был больше на 40%, а также

наблюдалась увеличение фотосинтетической активности и высокий уровень накопления биомассы. Кроме того, анализ транскриптома выявил повышенную регуляцию генов, связанных с биосинтезом пластидных жирных кислот, гликолизом и циклом Кальвина-Бенсона у HLM23 [104].

Режим культивирования также оказывает влияние на состав биомассы микроводорослей. Штамм *Chlorella* sp., выделенный из сточных вод на севере Швеции, может расти как в гетеротрофных, так и фотоавтотрофных условиях, и имеет большее содержание липидов в первом случае. Выявлено, что внутриклеточная концентрация глутамина и лизина была в семь раз больше в гетеротрофных условиях, чем в фотоавтотрофных, содержание α -кетоглутарата было выше при культивировании в гетеротрофных условиях в среде с глюкозой. Внутриклеточная концентрация мальтозы в гетеротрофных условиях при культивировании на среде с глицерином была больше, чем в фотоавтотрофных условиях. Концентрация 3-гидроксимасляной кислоты также была выше в гетеротрофных условиях [110].

Таким образом, существует множество стрессовых факторов, влияющих на синтез липидов и углеводов у микроводорослей, основными из которых являются недостаток соединений азота и фосфора. Высокая соленость среды, температура, изменение режима освещения и его интенсивность также влияют как на содержание липидов в биомассе, так и на их состав. Показано, что генетическая инженерия микроводорослей может служить эффективным инструментом для создания штаммов-продуцентов липидов. Пока что малоизучены отдельные аспекты метаболизма и регуляции генов, участвующих в синтезе липидов у микроводорослей, однако полученные данные говорят об актуальности таких исследований.

1.2 Подходы к получению биомассы микроводорослей

Биомассу микроводорослей с требуемыми характеристиками получают в основном с использованием фотобиореакторов, к которым относятся: барботажно-эрлифтные, барботажно-колонные, тубулярные и панельные. В тубулярных фотобиореакторах глубина проникновения света составляет менее 50%, что ограничивает их размер. При культивировании в колонном барботажном фотобиореакторе достигается невысокий уровень синтеза липидов по сравнению с культивированием в колбах, что было показано в работе [111], в которой использован фотобиореактор колонного типа для выращивания биомассы *C. vulgaris*. Применение таких фотобиореакторов целесообразно при масштабировании процесса получения биомассы

микроводорослей (их высота может составлять до 22.5 м при диаметре 20-50 см), однако культура подвергается фотоингибированию из-за наличия сильно- и неосвещаемых зон в фотобиореакторе [112].

Панельные фотобиореакторы наиболее часто применяются для культивирования микроводорослей в малом масштабе из-за высокой освещенности и возможности культивирования при высокой плотности клеток. С использованием панельного фотобиореактора объемом 60 л при культивировании на среде BG11 была получена биомасса *C. zoofingiensis* ($0.058 \text{ г л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) с содержанием липидов 33.8% [113]. При культивировании *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 в панельном фотобиореакторе объемом 110 л в этой же среде скорость накопления липидов составила $0.36 \text{ г л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ при их содержании 32% [114]. На примере микроводоросли *N. gaditana* [115] было показано, что культивирование в панельном фотобиореакторе приводит к получению биомассы, где содержание различных жирных кислот изменяется в ряду ПНЖК > МНЖК > НЖК. Солевой стресс при культивировании микроводорослей в фотобиореакторах увеличивает содержание липидов более чем в четыре раза, однако количество этих жирных кислот не зависит от изменения солености в культуральной среде [116].

1.3 Комплексная переработка биомассы микроводорослей в востребованные продукты

1.3.1 Получение биодизельного топлива из биомассы микроводорослей

Сокращение запасов нефти привело к глобальному энергетическому кризису. Спрос на энергию во всем мире растет, особенно во многих быстро развивающихся странах, таких как, например, Китай. Значительное количество продовольственных культур, включая сахарный тростник, кукурузу, пшеницу, сою, масличную пальму и подсолнечник, используют для получения биотоплива первого поколения, производства которого недостаточно для удовлетворения растущего спроса на моторное топливо [117]. Производство биотоплива, сырьем для получения которого являются сельскохозяйственные культуры, также требует использования больших площадей пахотных земель [118]. Следовательно, биомасса микроводорослей имеет большой потенциал для промышленного применения в качестве источника возобновляемого моторного топлива. Показано, что микроводоросли имеют высокую скорость воспроизводства и могут расти круглый год. Высокое содержание липидов в биомассе микроводорослей (до 20-80%) превосходит аналогичный показатель для сельскохозяйственных культур [10]. Сравнительная характеристика содержания липидов, продуктивности, затрачиваемых площадей и воды у разных источников биомассы приведена в Таблице 1 [119]. Для выращивания микроводорослей

требуется меньше воды и площадей, чем для других масличных культур. Биодизельное топливо, получаемое из биомассы микроводорослей, отличается биоразлагаемостью и малой токсичностью [120]. Микроводоросли можно культивировать в условиях, непригодных для возделывания сельскохозяйственных культур – в морской воде, сточных водах и на непахотных землях [121]. Таким образом, производство биомассы микроводорослей не конкурирует с производством продуктов питания и снижает негативное воздействие на окружающую среду.

По сравнению с сельскохозяйственными культурами крупномасштабное производство биомассы микроводорослей, как правило, связано с более высокими затратами и техническими сложностями, поскольку для них необходимо обеспечивать соблюдение определенных условий культивирования. Кроме того, промышленное культивирование микроводорослей сопряжено с потреблением большого количества CO_2 , воды и питательных веществ, в частности соединений азота и фосфора, входящих в состав растительных удобрений, специально разработанных для отдельных видов микроводорослей. Производство биотоплива из микроводорослей состоит из пяти основных этапов, включающих: выращивание микроводорослей с последующим сбором

Таблица 1 – Сравнение микроводорослей с другими источниками биомассы как сырья для производства биодизельного топлива [119]

Культура	Среднее содержание липидов (% по сухому веществу)	Продуктивность по маслу (л га^{-1} в год)	Используемая площадь (м^2 на кг биодизельного топлива в год)	Затраты воды (м^3 на тонну масла)
Соя	18	636	18	4200
Рапс	41	974	12	4300
Подсолнечник	40	1070	11	6800
Масличная пальма	36	5366	2	5000
Микроводоросли	50	97800	0.1	591-3276

биомассы, сушку, экстракцию целевых соединений и их переработку в биотопливо. В настоящее время исследования направлены на упрощение процесса переработки биомассы микроводорослей для сокращения количества стадий процесса или использования новых подходов для повышения экономической целесообразности процесса. Например, используется прямая переэтерификация биомассы (*in situ*) [122] или ее гидротермальное ожижение [123], что исключает необходимость в применении достаточно энергоемкой стадии сушки. Также применяют подходы с осаждением биомассы с использованием нетрадиционных методов, как альтернативу химической коагуляции и флокуляции: электрокоагуляцию, биофлокуляцию, осаждение, центрифугирование, микро/ультрафильтрацию [124], разрушение клеток микроводорослей в водных суспензиях с помощью импульсного электрического поля и

сверхзвукового потока жидкости через наноканалы в специальной камере [125]. Нарботанную биомассу используют для получения биотоплива.

1.3.1.1. Экстрагирование липидов органическим растворителями

Клетки микроводорослей состоят из клеточных стенок, полисахаридов, а также липидов и неорганических веществ. Основной проблемой извлечения липидов из клеток в данном случае является разрушение клеточной стенки без существенных энергозатрат. Часто применяемыми в настоящее время методами разрушения клеток микроводорослей являются механические (гомогенизация, обработка ультразвуком) [126], немеханические (температура, давление), химические методы (воздействие кислотами, поверхностно-активными веществами, ферментами), обработка микроволнами [127] и воздействие импульсным электрическим полем [128]. Основным методом извлечения липидов микроводорослей из разрушенных клеток является экстрагирование органическими растворителями, для чего в основном используют комбинацию полярных (метанол, хлороформ) и неполярных (*n*-гексан) растворителей. Часто экстрагирование проводят по методу Фолча (метанол-хлороформная экстракция, хлороформ:метанол 3:1 об./об.). Ранее было показано, что ряд органических растворителей, включая ацетон, бензол, *n*-гексан, метанол, хлороформ, дихлорметан, эффективно экстрагируют липиды. Одной из существенных проблем, связанной с использованием полярных растворителей, является совместная экстракция липидов с хлорофиллом, что требует дополнительной стадии очистки липидного экстракта. Кроме того, *n*-гексан не может проникнуть через мембрану, состоящую из фосфолипидов, которые связываются с белками, поэтому перед экстракцией требуется дополнительное воздействие для разрушения клеток. В целом, эффективность экстракции липидов с использованием органических растворителей составляет до 70% и выше [129].

Дополнительная обработка экстрагируемой смеси ультразвуком позволяет увеличить выход липидов из биомассы микроводоросли *C. vulgaris* FACHB-8, а в сочетании с добавлением флотирующих полимерных микросфер с поверхностным покрытием позволяет получить выход липидов до 18.75%, что больше, чем при экстрагировании с растворителем с помощью ультразвука (<10%). При использовании такого подхода содержание ПНЖК в полученных липидах было ниже, а степень НЖК выше по сравнению с экстрагированием по методу Дайера (хлороформ:метанол:вода 2:2:1.8 об./об./об.) [130]. Применение комбинированного способа экстрагирования с использованием давления и обработкой этанолом (90%) оказалось

эффективным при экстрагировании липидов *Isochrysis* sp. по сравнению с методом Фолча (выход липидов составил 41.5%). Снижение концентрации этанола при экстрагировании привело к снижению количества ТАГ и свободных жирных кислот, при этом увеличилась концентрация диацилглицеридов, моноацилглицеридов и фосфолипидов [131]. Сравнение эффективности экстрагирования липидов из *Chlorella* sp. с использованием комбинированного подхода, сочетающего экстрагирование растворителями, обработку ультразвуком и микроволнами, было проведено в работе [132]. Последний способ показал самый высокий выход липидов $37.9 \pm 0.13\%$ при использовании метанола в качестве растворителя.

Одним из самых энергозатратных этапов производства биодизельного топлива является сушка биомассы, необходимая для проведения последующего экстрагирования растворителями, не смешивающимися с водой. Для исключения этой стадии в работе [133] продемонстрировано, что разрушение клеток, по-видимому, является основным этапом экстракции при использовании малорастворимых в воде растворителей. Экстракция липидов из суспензии разрушенных микроводорослей была более эффективной, чем из высушенной биомассы, а присутствие воды увеличивало селективность извлечения НЖК. Выход экстракции 50% был достигнут при разрушении 84% клеток через 10 мин, а содержание НЖК было увеличено до 72% от экстрагированных липидов. Оптимальными растворителями в этом случае являются метил-*трет*-бутиловый эфир и циклопентилметиловый эфир.

1.3.1.2 Экстрагирование и переэтерификация липидов ионными жидкостями

Ионные жидкости (ИЖ) в последнее время активно используются для экстрагирования липидов из-за их экологической чистоты, низкой воспламеняемости и способности поддерживать жидкое агрегатное состояние в широком диапазоне температур (0–140 °C). В отличие от органических растворителей, в основном применяемых в виде двухфазных систем, этот процесс предлагает экстрагирование одним растворителем [134]. В целом, ИЖ более эффективны для экстрагирования липидов по сравнению с традиционными органическими растворителями: обладают низким давлением пара, высокой стабильностью в широком диапазоне температур, а также разной вязкостью и гидрофобностью в зависимости от типа ИЖ. Показано, что свойства ионных жидкостей в основном определяются свойствами аниона. Наиболее часто применяются такие ИЖ как метилфосфат 1,3-диметилимидазолия [MMIM][DMP], этаноат 1-этил-3-метилимидазолия [C₂MIM][OAc], этилсульфат 1-этил-3-метилимидазолия [EMIM][ESO₄], хлорид 1-этилпиридиния, 1-бутил-3-метилпиридиния

дицианамид [135]. Недостатком применения ИЖ является их высокая стоимость, которая в настоящее время в 2-10 раз превышает стоимость органических растворителей и препятствует их крупномасштабному применению для экстрагирования липидов из микроводорослей. Тем не менее, с использованием ИЖ удалось достичь высокого выхода липидов из биомассы *N. oceanica* в комбинации с обработкой микроволновым излучением. Выход общих экстрагированных липидов составил 19.58%. Результаты показали, что хлорид тетраметиламмония [TMAm][Cl] эффективнее извлекает липиды из микроводоросли *N. oceanica* [136]. Снижение стоимости применения ИЖ связывают с возможностью их повторного использования в процессе экстрагирования. Например, повторное использование 1-бутил-3-метилимидазолийхлорида [BMIM][Cl] для экстрагирования липидов микроводоросли *C. pyrenoidosa* позволило сохранить 99.8% ИЖ с затратами энергии 4.46 МДж на кг сухой биомассы. Для разделения ИЖ и гидролизатов используют хроматографию, что приводит к незначительной потере ИЖ (менее 1.97 г на кг сухой биомассы), однако делает возможным повторное использование ИЖ в процессе экстрагирования липидов микроводорослей [137].

Еще один способ снижения использования ИЖ для получения биодизельного топлива - непосредственное получение МЭЖК в результате прямой переэтерификации липидсодержащей биомассы с использованием метанола и ИЖ. Такой подход не требует предварительной дорогостоящей стадии выделения липидов из биомассы. В ряде работ используют биомассу без высушивания, что также снижает себестоимость получения биотоплива. Для переэтерификации влажной биомассы микроводоросли *C. vulgaris* для получения МЭЖК наиболее эффективной ИЖ оказалась формиат тетрабутилфосфония [P4444][For], выход МЭЖК в оптимизированных условиях составил $98.0 \pm 2.48\%$ при использовании биомассы, содержащей 40 мас.% воды. Была подтверждена возможность повторного использования [P4444][For] с потерями менее 2% за один цикл. Из-за простой и низкой стоимости синтеза этой ИЖ, она является многообещающим катализатором для прямой переэтерификации липидов в биомассе микроводорослей [138].

Сочетание ультразвуковой обработки и ИЖ оказывает положительный эффект на процесс переэтерификации за счет улучшения смешения фаз, что снижает влияние омыления липидов на протекание реакции переэтерификации. Применение ультразвука улучшает массоперенос, что сокращает время реакции сложных эфиров, позволяет снизить температуру реакции и количество ионной жидкости и метанола в реакционной смеси. Когда в качестве катализатора использовалась ионная жидкость [SO₃H-BMIM][HSO₄], выход МЭЖК из биомассы *Chlorella* составил 69.6% [139]. Влажная биомасса *Nannochloropsis* sp. была использована для прямой переэтерификации ИЖ с помощью обработки микроволнами. Три разных ионных жидкости (1-бутил-3-метилимидазолий хлорид [BMIM][Cl], метилсульфат 1-этил-3-метилиммидазолия [EMIM][MeSO₄] и 1-бутил-3-метилимидазолийтрифторметансульфонат [BMIM][CF₃SO₃]) и

органические растворители (*n*-гексан и метанол) использовали в качестве растворителей при одновременном облучении микроволнами. Применение [EMIM][MeSO₄] привело к самому высокому проценту разрушения клеток (99.73%) и выходу МЭЖК (36.79% от веса сухой биомассы) после 15 мин реакции [140]. В другой работе прямая переэтерификация липидов в биомассе *N. oceanica* с использованием ИЖ [BMIM][CF₃SO₃] увеличила выход МЭЖК в одиннадцать раз по сравнению с контрольным экспериментом, где применяли экстрагирование хлороформом и метанолом с последующей переэтерификацией [141]. Таким образом, ионные жидкости, хотя и уступают по своей стоимости органическим растворителям, традиционно применяемых для экстрагирования липидов, тем не менее имеют высокий потенциал для использования за счет высоких выходов, большей безопасности и возможности многократного использования.

1.3.1.3 Переэтерификация липидов микроводорослей в присутствии катализаторов и иммобилизованных ферментов

В основном для переэтерификации липидов биомассы микроводорослей с получением МЭЖК используют щелочные гомогенные катализаторы. Их применение сопряжено с невозможностью отделения от продуктов реакции, а также образованием значительного количества сточных вод [10]. Также накладывается ограничение на количество ЖК в сырье – оно должно быть низким (0.1 – 0.3%) для снижения дезактивации катализатора вследствие образования эмульсий [142]. Избежать этого удастся при применении кислотных катализаторов (в основном H₂SO₄ и HCl), но скорость реакции при этом снижается.

Биодизельное топливо представляет собой смесь МЭЖК, получаемых переэтерификацией липидов со спиртами, в основном, с метанолом [143]. Переэтерификацию можно проводить как химическим (под действием гомогенных кислотных или основных катализаторов), так и ферментативным (в том числе под действием иммобилизованных ферментов) путем. Несмотря на то, что химическая переэтерификация протекает достаточно быстро и обеспечивает высокие выходы МЭЖК, этот процесс имеет ряд недостатков. В том числе процесс характеризуется высоким энергопотреблением, так как реакция химической переэтерификации протекает при высоких температурах (50-100 °C) [144]. Поэтому применение ферментативного способа в мягких условиях является альтернативой традиционному процессу получения биодизельного топлива, а также может проводиться в присутствии высокой концентрации свободных жирных кислот, присутствующих в липидах микроводорослей.

В качестве носителей для иммобилизации ферментов, применяемых в реакции переэтерификации выступают разные материалы, в том числе наночастицы с магнитными свойствами, полимерные нановолокна и нанокомпозиты, металлические носители, нано- и мезопористый кремнезем, углеродные нанотрубки, графен, оксид графена [144], [145], [146]. Применение в качестве носителей для иммобилизации ферментов функционализированных суперпарамагнитных наночастиц позволяет получать биокатализаторы, которые можно легко отделять с помощью магнитного поля от реакционной среды, тем самым упрощая их повторное использование.

Ряд иммобилизованных ферментных препаратов для переэтерификации липидов микроводоросли *C. vulgaris* был получен иммобилизацией липазы *Rhizopus oryzae* на функционализированном суперпарамагнитном многослойном оксиде графена и Fe_3O_4 (MGO), на функционализированном MGO 3-аминопропилтриэтоксисиланом (MGO-AP), а также 3-аминопропилтриэтоксисиланом и глутаровым альдегидом (MGO-AP-GA) [145]. Иммобилизация липазы *R. oryzae* на MGO и MGO-AP происходила посредством электростатических взаимодействий, а на MGO-AP-GA – с образованием ковалентной связи. Наибольший выход МЭЖК 71.19% был достигнут под действием липазы, иммобилизированной на MGO-AP-GA. Кроме того, этот препарат сохранял 58.77% своей первоначальной активности после пяти циклов реакции переэтерификации и среди протестированных катализаторов являлся наиболее подходящим для непрерывной эксплуатации. В данном исследовании также было показано, что благодаря функционализации оксида графена и Fe_3O_4 , увеличилась степень иммобилизации фермента, его кинетические параметры, термостабильность и стабильность катализатора при хранении.

В работе [146] была также получена липаза *R. oryzae*, иммобилизованная на наночастицах Fe_3O_4 и на этих же частицах, функционализированных 3-аминопропилтриэтиленсиланом и глутаровым альдегидом. Полученные иммобилизованные ферментные препараты были использованы в реакции переэтерификации липидов микроводоросли *C. vulgaris*. Отмечалось, что степень иммобилизации фермента на функционализированном носителе увеличилась с 36.35 до 51.75 вес.%. Наибольшая конверсия липидов в МЭЖК (69.8%) также наблюдалась при использовании липазы, иммобилизированной через глутаровый альдегид на аминированных суперпарамагнитных наночастицах. После пяти циклов эксплуатации этот биокатализатор обеспечивал конверсию в три раза выше по сравнению с липазой, иммобилизированной на частицах Fe_3O_4 .

Иммобилизация липазы CALB из *Pseudozyma antarctica* (*Candida antarctica*) в виде поперечно сшитых агрегатов ферментов на магнитных наночастицах Fe_3O_4 позволила получить стабильный и эффективный ферментный препарат, предназначенный для получения

биодизельного топлива из липидов микроводоросли *C. vulgaris* var. L3 [147]. Применение химического катализатора ацетилхлорида в реакции переэтерификации липидов с метанолом при температуре 100 °C в течение 1 ч позволило достигнуть выхода МЭЖК $80.2 \pm 4.4\%$. Однако иммобилизованная липаза была активна в более мягких условиях реакции метанолиза липидов (30 °C, 3 ч), что позволило увеличить выход МЭЖК до $> 90\%$. Причем, как ацетилхлорид, так и иммобилизованный фермент, оба приводили к получению смеси МЭЖК с аналогичным составом. Магнитный характер биокатализатора позволил легко отделять его от продуктов реакции и повторно использовать в течение десяти последовательных циклов эксплуатации (сохраняя 90% от начальной конверсии МЭЖК).

Иммобилизация липазы *Burkholderia* sp. на функционализированных алкильными группами частицах $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ позволила получить эффективный иммобилизованный ферментный препарат для получения биодизельного топлива [148]. В результате одностадийного процесса экстракции и переэтерификации липидов из влажной биомассы микроводоросли *Chlorella vulgaris* ESP-31 с использованием иммобилизованной на $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ липазы выход МЭЖК в оптимальных условиях составил более 90%.

В качестве носителей для иммобилизации липаз, применяемых для получения биодизельного топлива, также выступают наноцеолиты. Липаза *T. lanuginosus* была ковалентно иммобилизована посредством глутарового альдегида на функционализированных 3-аминопропилтриметоксисиланом наноцеолитах с различной структурой (Nano/TS1, Nano/GIS, Nano/LTA, Nano/BEA, Nano/X, and Nano-X/Ni) [149]. Было установлено, что наноцеолитные носители, функционализированные 3-аминопропилтриэтоксисиланом и глутаровым альдегидом, обеспечивали более высокую ферментативную активность по сравнению с нефункционализированными носителями. Высокий выход МЭЖК в результате реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Prototheca moriformis* S2532 наблюдался для U-Nano-X/Ni-TLL, N-нано-X/Ni-TLL и NG-нано-X/Ni-TLL и составлял 94.0, 93.4 и 93.0%, соответственно. Помимо высоких выходов МЭЖК, NG-Nano-X/Ni-TLL обладал стабильностью при эксплуатации, сохраняя выход МЭЖК свыше 85% после пяти последовательных циклов реакции.

Исследования показали, что в процессе получения биодизельного топлива наибольшее количество энергии расходуется на экстрагирование липидов из биомассы микроводорослей. Процесс требует высоких затрат тепловой и электрической энергии, а также использования большого количества растворителя, например, *n*-гексана [150]. Снизить стоимость получения биодизельного топлива можно, используя так называемый процесс переэтерификации *in situ*, когда МЭЖК получают непосредственно из биомассы водорослей. Применение такого подхода исключает необходимость применения отжима или экстракции липидов и, в то же время, снижает

материальные и энергетические затраты на процесс. В работе [151] проводили одновременное экстрагирование липидов микроводорослей *Ankistrodesmus* sp. и их переэтерификацию этанолом с добавлением минерального дизельного топлива в качестве растворителя (соотношение липидов к минеральному дизельному топливу 7:93, вес.%) под действием иммобилизованного ферментного препарата Lipozyme TL IM. Методом поверхности отклика были определены оптимальные параметры процесса: температура 42 °C, молярное соотношение этанола к липидам 8:1, концентрация Lipozyme TL IM 9.6 вес.%, продолжительность реакции 12 ч. Использование высушенной биомассы микроводорослей в данных условиях привело к степени переэтерификации липидов 97.69%. Продукт реакции содержал 6.8% этиловых эфиров жирных кислот, а в смеси с дизельным топливом соответствовал требованиям европейского стандарта на минеральное дизельное топливо. Высокая эффективность экстрагирования и переэтерификации липидов достигалась применением высушенной биомассы микроводорослей, при увеличении содержания влаги эффективность экстрагирования и переэтерификации липидов снижалась.

Внимание исследователей к получению биодизельного топлива из биомассы морской микроводоросли *Nannochloropsis* sp. вызвано ее способностью расти в соленой воде в открытых прудах, что позволяет значительно удешевить его производство. В работе [152] получали МЭЖК с выходом 99.5% путем прямой ферментативной переэтерификации влажной биомассы микроводоросли *N. gaditana* под действием иммобилизованной липазы *P. antarctica* В (Novozyme 435). Помимо биодизельного топлива, *Nannochloropsis* sp. является потенциальным источником биомассы для коммерческого производства эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК). Был разработан подход, совмещающий получение биодизельного топлива и ЭПК-обогащенной фракции липидов, посредством ферментативного этанолиза предварительно обработанной целлюлазой биомассы *Nannochloropsis* sp. с использованием специфической липазы [153]. Среди исследуемых ферментов (*P. antarctica* (CALA и CALB), *T. lanuginosus*, *R. miehei* и *Aspergillus oryzae*) CALA показал себя наиболее подходящим для обеспечения высокого выхода МЭЖК и эйкозапентаеновой кислоты. После оптимизации реакции переэтерификации максимальная конверсия МЭЖК (46.53–48.57%) была достигнута при использовании CALA при соотношении этанол:биомасса 8:1 (об./об.), концентрации воды 10–15% и 10% липазы при 35 °C в течение 72 ч. В результате реакции переэтерификации была получена фракция нейтральных и полярных липидов, обогащенная эйкозапентаеновой кислотой (60.81%), что было больше в 1.51 раза по сравнению с исходным выходом этой кислоты. Также этот процесс был использован для получения МЭЖК из биомассы микроводорослей *N. oceanica* IMET1 и *Nannochloropsis salina* CCMP 537 (IMET1 и Salina 537, соответственно). В оптимальных условиях выход МЭЖК из биомассы IMET1 и Salina 537 с использованием CALA составил 63.41% и 54.33%, соответственно. Содержание ЭПК во фракциях нейтральных и полярных липидов составило

50.06% для IMET1 и 53.73% для Salina 537. Таким образом, катализируемый CALA этаноллиз липидов биомассы *Nannochloropsis* sp. является многообещающим подходом для одновременного получения биодизельного топлива и востребованных компонентов с добавленной стоимостью.

Использование комбинированных биокатализаторов, сочетающих свойства разных ферментов, является сравнительно новым, но перспективным подходом в ферментативном катализе. Была проведена переэтерификация экстрагированных этилацетатом без последующей сушки липидов микроводоросли *I. galbana* с этанолом с использованием комбинированного биокатализатора, представляющего собой иммобилизованную на функционализированный аминогруппами мезопористый диоксид кремния SBA-15 смесь липаз *C. antarctica* B (CALB) и *Pseudomonas ceracia* в соотношении 25:75 [154]. Выход МЭЖК с использованием этого комбинированного биокатализатора составил 97.2%, что оказалось больше, чем при использовании отдельно иммобилизованных липаз CALB (выход МЭЖК 85.5%) или *P. ceracia* (выход МЭЖК 87%), а также коммерческого ферментного препарата Novozym 435 (выход МЭЖК 69.5%). Из-за неоднородности состава липидов микроводорослей, такая комбинация липаз оказалась наиболее эффективна для применения в реакции переэтерификации. Наряду с достижением максимального выхода МЭЖК, данный подход позволит снизить затраты на производство биодизельного топлива, поскольку после экстрагирования липидов не требовалось последующей отгонки остатков растворителя.

1.3.2 Получение востребованных химических веществ из биомассы микроводорослей с применением комплексных биотехнологических подходов

Еще одним перспективным направлением применения биомассы микроводорослей является переработка входящих в ее состав углеводов в ценные продукты, например, в спирты (этанол, бутанол), биоводород и другие соединения. Данный процесс является менее энергозатратным, чем переработка лигноцеллюлозной биомассы. Дополнительным преимуществом использования биомассы микроводорослей в этом случае является возможность получения двух типов сырья (липидов и углеводов), причем частично разрушение клеточных стенок при экстракции липидов облегчает последующий процесс деполимеризации полисахаридов микроводорослей.

1.3.2.1 Этанол и бутанол

В работе [155] проводили гидролиз биомассы *C. vulgaris* путем ее предварительной обработки с использованием 2% H_2SO_4 при 120 °С в течение 30 мин, концентрация редуцирующих сахаров при этом составила 24.77 г на 100 г биомассы. Максимально достигнутый выход этанола при их сбраживании составил 14.32 г на 100 г биомассы. При этом при использовании 2% NaOH при 120 °С в течение 30 мин выход этанола составил 7.74 г на 100 г биомассы, что говорит о высокой эффективности кислотного гидролиза по сравнению с щелочным. Больший выход этанола из биомассы микроводоросли *C. sorokiniana* [156] был достигнут после обработки 4% H_2SO_4 при высоком давлении и температуре (121 °С, 30 мин) с последующим ферментативным гидролизом полисахаридов амилоглюкозидазой и α -амилазой, что позволило достигнуть выхода 34.0 ± 1.0 г редуцирующих сахаров на 100 г биомассы. Выход этанола при последующем использовании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* F13A составил 0.464 ± 0.013 г г⁻¹ редуцирующих сахаров при скорости накопления этанола 0.344 ± 0.020 г л⁻¹ ч⁻¹. В другом исследовании использовали биомассу после ультразвуковой экстракции липидов (без предварительного кислотного гидролиза) [157] в качестве питательной среды, содержащей в основном глюкозу и ксилозу, для получения этанола с использованием штамма *S. cerevisiae* NITTS1. Показано, что предварительная ультразвуковая обработка повысила концентрацию этанола в культуральной жидкости на 25.83 г л⁻¹. Максимальный выход этанола составил 86.70 ± 0.52 мг этанола на 1 г биомассы.

В работе [158] анализировали влияние параметров культивирования микроводоросли *C. sorokiniana* на выход этанола. Было показано, что снижение содержания KNO_3 (до 1.0 г л⁻¹) в культуральной среде увеличивало общее содержание углеводов и крахмала в микроводорослях до 50.28 и 34.06%, соответственно. Максимальное количество редуцирующих сахаров (13.86 мг мл⁻¹) было получено путем обработки биомассы микроводорослей 2.8% H_2SO_4 при 121 °С в течение 30 мин. Сбраживание полученного гидролизата с использованием дрожжей *S. cerevisiae* позволило достигнуть 2.91 мг мл⁻¹ этанола через 96 ч культивирования с выходом 41.16% от теоретического. Применение такого подхода позволяет осуществлять рециклинг получаемого при брожении CO_2 для культивирования микроводорослей, а также не требует больших затрат энергии. Этанол в настоящее время активно применяется в качестве биотоплива и экологически чистого растворителя в промышленных процессах, что делает актуальной разработку подобных процессов в будущем.

Помимо этанола другим перспективным продуктом комплексной переработки биомассы микроводорослей является бутанол. В работе [159] биомасса *N. gaditana* (содержание

углеводов $21.3 \pm 0.9\%$), гидролизованная H_2SO_4 , HCl или H_3PO_4 (1, 2, 3, 4 и 5%), была использована для получения бутанола путем сбраживания анаэробной бактерией *C. acetobutylicum*. Выявлено, что применение 3% HCl было наиболее эффективно для гидролиза биомассы микроводоросли, концентрация бутанола при сбраживании составила $(2.9 \pm 0.24 \text{ г л}^{-1})$. Эти результаты показывают, что *N. gaditana* можно использовать для эффективного содержания углеводов и крупномасштабного производства биобутанола в будущем.

1.3.2.2 Водород и органические кислоты

Еще одним источником энергии, который может быть получен с помощью микроводорослей, является водород. Биоводород отличается высокой энергетической ценностью (около 142.0 кДж г^{-1}) и не образует CO_2 при сгорании, что позволяет использовать его как альтернативное топливо в связи с неуклонно растущими выбросами парниковых газов. Современные технологии производства водорода (паровая конверсия метана, расщепление воды) являются энергоемкими и требуют значительных затрат электроэнергии. Получение водорода из биомассы водорослей является экологически чистым процессом, не сопровождающимся выбросами CO_2 , что делает данный подход перспективным. Выход водорода в результате сбраживания биомассы микроводоросли *Chlorella* sp. варьируется в диапазоне $12\text{--}43 \text{ мл г}^{-1}$ летучего твердого вещества [160]. Переработка биомассы *Chlorella* sp. (25 г л^{-1}) под действием 15 вес.% целлюлаз и протеаз бактериальной культуры HAU-M1, состоящей из 28% *Rhodopseudomonas palustris*, 27% *Rhodospirillum rubrum*, 25% *Rhodopseudomonas capsularis*, 11% *Rhodobacter capsulatus* и 9% *Rhodobacter sphaeroides*, позволяет достигнуть выхода биоводорода, равного 43.33 мл г^{-1} [161]. С целью получения биоводорода при увеличении глубины переработки биомассы микроводорослей после экстрагирования липидов также проводят ферментацию остаточной биомассы. Биомасса микроводорослей, относящихся к *Dunaliella*, после экстрагирования липидов подвергалась ферментации при температуре $85 \text{ }^\circ\text{C}$ под действием термофильной бактерии *Thermococcus eurythermalis* A501, продуцирующей водород [162]. Выход водорода из остаточной биомассы микроводорослей *Dunaliella primolecta* и *Dunaliella tertiolecta* составил 192.35 и 183.02 мл г^{-1} летучего твердого вещества, соответственно, менее чем за 19 ч без какой-либо предварительной обработки.

Помимо водорода, путем сбраживания биомассы микроводорослей получают уксусную [163] и масляную [164] кислоты. В настоящее время много внимания уделяется производству метана из биомассы микроводорослей. Применение анаэробных бактерий *B. licheniformis* для

предварительной обработки биомассы *Chlorella* sp. обеспечивало максимальный выход метана (415 мл г^{-1}) [165].

1.4 Применение микроводорослей в процессах водоочистки

Сточные воды являются одним из альтернативных источников питательных веществ при культивировании микроводорослей. Использование сточных позволяет снизить себестоимость производства биомассы микроводорослей [117]. Они содержат все необходимые для роста биомассы микроводорослей питательные вещества, такие как: соединения углерода, нитраты, фосфаты, соли аммония, мочевины, витамины, микроэлементы (железо, цинк). Использование сточных вод для выращивания микроводорослей значительно сокращает затраты на использование компонентов культуральной среды и на пресную воду, необходимую для культивирования [144].

Использование сточных вод в качестве питательной среды для выращивания микроводорослей сопряжено с рядом проблем, к которым относится контаминация вирусами или бактериями, что оказывает влияние на накопление биомассы и ее последующую переработку. В связи с этим требуется не только предварительная очистка сточных вод, но также частая очистка системы культивирования для предотвращения потенциального загрязнения. К методам предварительной обработки относят фильтрацию, УФ-облучение или термическое воздействие на сточные воды, осуществляемое непосредственно перед их использованием в качестве питательной среды [166]. Состав сточных вод в ряде случаев также может оказывать негативное влияние на процесс культивирования микроводорослей. Существует много типов сточных вод: промышленные, коммунальные, сельскохозяйственные и др. Каждый из этих источников может иметь различный состав питательных, а также токсичных химических веществ, которые могут препятствовать росту микроводорослей. Например, высокая концентрация солей аммония может оказывать негативное воздействие на рост микроводорослей [166]. Состав сточных вод из одного источника также может варьироваться, тем самым обеспечивая неоднородный темп роста микроводорослей, поэтому в ходе культивирования необходимо контролировать состав питательной среды. Еще одной проблемой, которая может возникнуть при культивировании водорослей на сточных водах, является снижение уровня фотосинтеза при использовании окрашенных сточных вод из-за избыточного поглощения определенной части спектра средой. Решением данного вопроса может стать использование культуры с гетеротрофным или

миксотрофным типом питания [167] или использование нескольких видов микроводорослей [150].

Зачастую применение микроводорослей позволяет удалять целый класс соединений из сточных вод. В работе [168] показано, что смешанную культуру пресноводных зеленых водорослей *T. dimorphus* и *Dictyosphaerium* можно успешно использовать для очистки на коммунальных сточных вод, загрязненных разными лекарственными веществами. Помимо разложения подобных загрязнителей, одной из важных целей при очистке сточных вод является необходимость удаления соединений азота и фосфора до пределов, установленных СанПиН 2.1.5.980-00. Во многих работах сообщалось, что микроводоросли играют важную роль в процессах биоремедиации сточных вод. Культивирование микроводоросли *C. sorokiniana* на сточных водах фармацевтических предприятий позволило не только удалить салициловую кислоту и парацетамол на 93 ± 2.25 и $41.75 \pm 1.01\%$, соответственно, но и снизить содержание нитратов на 70%, а фосфатов на 89% [169]. Выращивание *Micractinium* sp. IC-76 в стерилизованных муниципальных сточных водах привело к удалению 77% фосфатов, при этом обеспечивая продуктивность биомассы $37.18 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ и выход липидов 36% [170]. Культивирование микроводорослей на сточных водах позволяет одновременно удалять токсичные вещества и накапливать биомассу микроводорослей и получать вещества с высокой добавленной стоимостью (пигменты, липиды, белки).

Активный ил сточных вод также содержит очень высокие концентрации соединений азота и фосфора, которые трудно удалить с помощью традиционных процессов водоочистки. Потенциальным способом удаления фосфатов и аммония с одновременной продукцией биомассы для получения биодизельного топлива является миксотрофное культивирование микроводорослей, для поддержания которого необходимо достаточное количество соединений углерода. В качестве источников углерода для миксотрофного роста могут выступать сахара, глицерин, этанол, а также органические кислоты. Летучие органические кислоты, например, уксусная и масляная кислоты, могут образовываться непосредственно в процессе ферментации активного ила [171], что позволяет снизить затраты на добавление дополнительных питательных веществ. В работе [172] исследовали способность пресноводной микроводоросли *C. pyrenoidosa* использовать органические кислоты для миксотрофного роста в анаэробно обработанном иле. В результате было установлено, что добавление пропионовой и изовалериановой кислот не оказывало влияния на продукцию биомассы и даже ингибировало рост водорослей при низких концентрациях. Добавление уксусной и масляной кислот увеличило накопление биомассы в 1.9-2.4 раза по сравнению с контрольной культурой, выращенной без добавления в среду органических кислот. В результате культивирования биомассы удалось достигнуть увеличения эффективности удаления аммония и ортофосфата из иловых осадков до 88.3-97.1% и 80.4-93.0%,

соответственно. Кроме того, добавление летучих органических кислот в оптимальной концентрации увеличило выход липидов в 3.9-6.3 раз по сравнению с контролем, а максимальная продуктивность липидов составила $160 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ при добавлении уксусной кислоты в среду.

Помимо нитратов, фосфатов и токсичных веществ, сточные могут содержать тяжелые металлы, способные к биоаккумуляции и вызывающие загрязнение окружающей среды. Биосорбция тяжелых металлов из сточных вод микроводорослями является экономически эффективным, экологически чистым и высокопроизводительным методом очистки сточных вод по сравнению с традиционными подходами. Многие виды микроводорослей, в том числе *C. vulgaris*, *C. reinhardtii*, *Chlorococcum* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, продемонстрировали высокую способность к биосорбции тяжелых металлов из сточных вод [173]. Некоторые металлы, содержащиеся в сточных водах, являются микроэлементами, необходимыми для роста микроводорослей, например, Cu, Zn, Ni, Mn и Co. Другие, включая Pb, Cd, Cr и Hg, обладают неидентифицированными биологическими функциями и токсичны по своей природе, поскольку их чрезмерное поглощение может влиять на метаболические процессы и морфологию водорослей, а также оказывать токсическое и мутагенное влияние. Тяжелые металлы стимулируют образование активных форм кислорода, что приводит к окислительному повреждению метаболитов. Например, накопление свинца в микроводоросли *Acutodesmus obliquus* привело к снижению содержания ряда метаболитов, включая пигменты, белки и моносахариды, уменьшению размера и количества клеток [174]. Культивирование *C. sorokiniana* в миксотрофных и фотоавтотрофных условиях под действием наночастиц диоксида титана (TiO_2), наоборот, привело к повышенной продукции белков и углеводов [175]. В присутствии тяжелых металлов наблюдалось увеличение фотосинтетических пигментов и рост биомассы *C. vulgaris* JSC-7 [176]. Было показано, что *C. variabilis* потребляет питательные вещества из сточных вод текстильной промышленности и полностью удаляет никель, алюминий и железо, скорость накопления биомассы при этом составляет $74.96 \pm 2.62 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$, выход липидов - $20.1 \pm 2.2\%$ [177]. Таким образом, биоочистка сточных вод, содержащих тяжелые металлы, с использованием микроводорослей является экологически чистым и экономически целесообразным подходом, благодаря большому потенциалу микроводорослей в удалении тяжелых металлов из сточных вод даже в больших концентрациях.

1.5 Выделение и свойства бактериальных липолитических ферментов

Липолитические ферменты бактериального происхождения широко применяются в современных промышленных процессах, в том числе в пищевой, фармацевтической и химической промышленности [178]. Эти ферменты относятся к классу гидролаз (КФ 3.1.1.1) и принадлежат к семейству α/β гидролаз [179], в активном центре содержат каталитическую триаду Ser, Asp (Glu) и His [180]. Важным свойством является их регио- и стереоспецифичность и способность катализировать гетерогенные реакции в водных и неводных системах. Основными липолитическими ферментами, применяемыми в промышленности, являются термостабильные эстеразы и липазы. Применение термостабильных ферментов, обладающих стабильностью при температурах выше 45 °С, позволяет увеличить выход продукта, скорость реакции, а также продлить срок их эксплуатации [178].

Эстеразы представляют собой ферменты, обладающие специфичностью к жирнокислотным остаткам длиной от двух до восьми атомов углерода [181], они преимущественно катализируют реакции гидролиза, что отличает их от липаз. Свойства ряда термостабильных эстераз, выделенных в последнее время, приведены в Таблице 2.

В целом, бактериальные термостабильные эстеразы активны в широком диапазоне температур, вплоть до 90 °С, как эстераза *Anoxybacillus* sp. PDF1 [191]. Анализ активности эстераз при различных pH выявил, что они преимущественно обладают оптимумом активности при щелочном pH (6.0-9.0), в том числе продуцируемые бактериями *T. thermosaccharolyticum*, *Salimicrobium* sp., *G. subterraneus* и др. (Таблица 2). Наибольшей термостабильностью обладают

Таблица 2 – Свойства термостабильных бактериальных эстераз, описанных в литературе

Источник	Характеристики	Специфичность	Кинетические параметры	Ссылка
Эстераза <i>Rhodococcus</i> sp. LKE-021	Активность при 30 - 80 °С, оптимум активности при pH 11.0. Стабильна при 60 °С в течение 2 ч	-	-	[182]
Эстераза EstDZ2, полученная из метагенома	Оптимум активности при 50 °С	C ₄	-	[183]
Эстераза Est5250 <i>Bacillus thermocloaceae</i>	Оптимум активности при 60 °С и pH 8.0, термостабильность повышается в присутствии Ca ²⁺	pNPC2	K _m 185.8 мкМ и k _{cat} 186.6 с ⁻¹	[184]

Эстераза ThLip1 <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> DSM 571	Оптимум активности при 80 °С и pH 6.5. Сохраняет 85% исходной активности через 2 ч при 75 °С	pNPC6	$K_m 3.52 \pm 0.47$ мМ, $V_{max} 191.18 \pm 1.82$ мкмоль мин ⁻¹ мГ ⁻¹ и $k_{cat}/K_m 20.80 \pm 0.07$ мМ ⁻¹ с ⁻¹	[185]
Эстераза ThLip2 <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> DSM 571	Оптимум активности при 75 °С и pH 6.5. Стабильна при pH 6.0-8.0. $t_{1/2}$ 2 ч при 80 °С	линолилацетат	$K_m 3.37$ мМ, $V_{max} 578.14$ мкмоль мин ⁻¹ мГ ⁻¹ и $k_{cat} 231.2$ с ⁻¹	[185]
Эстераза EST3 <i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	Активность при 41- 45 °С, оптимум активности при pH 6.0. Активность увеличивается в присутствии 0.5 мМ Mn ²⁺ , Li ⁺ , ЭДТА и 1% СТАВ. 50% активности сохраняется в присутствии 10% метанола и этанола	pNPC5	-	[186]
Эстераза <i>Clostridium thermocellum</i> DSM 1313	Масса 35 кДа, оптимум активности при 65 °С, pH 7.0. Активность повышается в присутствии Ca ²⁺ и Mg ²⁺	pNPC2	-	[187]
Эстераза <i>Clostridium thermocellum</i> DSM 1313	Сохраняет 70% активности через 3 ч инкубации при 65 °С. Поверхностно-активные вещества ингибируют активность (на 50% в 10% ДМСО)	pNPC2	-	[187]
Эстераза <i>Salimicrobium</i> sp. LY19	Масса 57 кДа, оптимум активности при 50 °С, pH 7.0 и 5 % NaCl. Сохраняет активность при 20-70 °С, pH 7.0-10.0 и в присутствии 2.5 – 25 % NaCl.	pNPC4	-	[188]
Эстераза <i>Bacillus subtilis</i> DR8806	Масса 60.25 кДа, оптимум активности при 50 °С и pH 8.0 . Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Mg ²⁺ и Hg ²⁺ ингибируют активность. 1% Тритон X-100 не влияет на активность фермента	pNPC2	$K_m 4.2$ мМ, $V_{max} 151$ мкмоль мин ⁻¹ мГ ⁻¹	[189]
Эстераза <i>Geodermatophilus obscurus</i> G20	Масса 55 кДа, оптимум активности при 80 °С и pH 8.0-9.0. Сохраняет более 90% активности после инкубации при 80 °С в течение 10 ч	pNPC2	$K_m 400$ мкМ	[190]

Карбоксилэстераза <i>Anoxybacillus</i> sp. PDF1	Масса 26 кДа, оптимум активности при 60 °С и pH 8.0, активность при pH 5.0-10.0 и 25-90 °С. Сохраняет активность через 30 мин инкубации при 60 °С	pNPC4	K_m 0.348 ± 0.030 мМ, V_{max} 3725.8 ЕА м г ⁻¹ , k_{cat} 1500 ± 54.50 с ⁻¹	[191]
Эстераза <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> OUC_Est10	Масса 70.6 кДа, оптимум активности при 65 °С и pH 9.0. При инкубации при 45 °С и pH 8.0 остаточная активность составляет 70.2% через 96 ч. Сохраняет 97% и 84% активности при инкубации в 100% ацетонитриле или в <i>n</i> -гексане	pNPC6	-	[192]
Эстераза EstES1, полученная из метагенома	Оптимум активности при 40 °С и pH 9.0. Стабильна при 60-65 °С, pH 9.0-10.5, а также в присутствии метанола, этанола, изопропанола и ДМСО	pNPC4	-	[193]
Эстераза EstGSU753 <i>Geobacillus subterraneus</i> DSM13552	Оптимум активности при 60 °С и pH 8.0. Стабильна в 50% метаноле в течение 9 сут (сохраняет 50% от исходной активности). При инкубации с 90% метанолом в течение 35 ч сохраняет 50% активности	pNPC4	-	[194]
Эстераза EstL5 <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> T2	Активна при 0-80 °С, pH 6.0-11.0, оптимум активности при 60 °С и pH 8.0. Сохраняет 100% активности после 12 ч инкубации при 55 °С. Подвергается ингибированию в присутствии 10% SDS и 0.1 мМ PMSF	pNPC4	-	[195]
Эстераза <i>Geobacillus</i> sp. JM6	Масса 33.6 кДа, оптимум активности при 60 °С и pH 7.5. Сохраняет 68% активности при инкубации при 100 °С в течение 18 ч. Устойчива к SDS, Chaps, Твин-20, Твин- 80, Тритон X-10	pNPC4	-	[196]
Эстераза <i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426	Масса 27.7 кДа, оптимум активности при 65 °С и pH 8.0	pNPC2	K_m 2.77 мМ, k_{cat} 280.41 с ⁻¹	[197]
Эстераза est30 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC12980	Масса 28.3 кДа. Стабильна при 60 °С более 2 ч. Сохраняет 50% активности при 70 °С через 180 мин	pNPC6	K_m 2.16 мкМ, k_{cat} 38 с ⁻¹	[198]

Эстераза est55 <i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i> ATCC7954	Масса 54.8 кДа, оптимум активности при 30-60 °С и pH 8-9. Стабильна при 60 °С более 2 ч, при 70 °С сохраняет 50% через 40 мин	pNPC4	K_m 0.5 мкМ; k_{cat} 39758 с ⁻¹	[198]
Эстераза est29 <i>Geobacillus</i> <i>thermocatenulatus</i> KCTC 3921	Масса 29 кДа, оптимум активности при pH 6.0. Сохраняет 70% активности через 1 ч при 70 °С	C ₄ -C ₈	-	[199]

эстеразы бактерий р. *Geobacillus*, в том числе эстераза *Geobacillus* sp. JM6, которая сохраняет 68% активности после инкубации при 100 °С в течение 18 ч [196], что является одним из самых высоких показателей среди этих ферментов. Анализ субстратной специфичности показывает, что термостабильные бактериальные эстеразы активны в отношении короткоцепочечных жирных кислот, преимущественно C₂ и C₄ (Таблица 2), более широкой субстратной специфичностью (C₄-C₈) обладает эстераза est29 *G. thermocatenulatus* KCTC 3921 [199]. Существуют также галотолерантные эстеразы, в том числе продуцируемая бактерией *Salimicrobium* sp. LY19, которая активна в присутствии 25% NaCl [188]. Показано, что соли металлов (в том числе Cu²⁺ и Fe²⁺) могут ингибировать липолитическую активность эстераз, в то время как Ca²⁺ ее повышает (Таблица 2). Эстераза EstGSU753, полученная из *G. subterraneus* DSM13552, обладает высокой стабильностью в метаноле, сохраняя половину от первоначальной активности через 9 суток инкубации в 50% растворе метанола [194]. Эстераза Est2, полученная из метагенома в работе [200], сохраняла большую часть своей активности после 26 суток инкубации в присутствии 30% этанола, метанола, изопропанола, ДМСО или ацетона.

Другими активно применяющимся в промышленности липолитическими ферментами являются липазы, которые получают из термофильных грибов (*T. lanuginosus* и *R. miehei*), а также дрожжей *P. (Candida) antarctica*. Бактериальные липолитические ферменты (*B. ceracia* и *P. fluorescens*) применяются реже, хотя они обладают значительно большей термостабильностью. При этом относительно мало изучены липазы, продуцируемые термофильными бактериями р. *Geobacillus*, растущих при температурах 50-75 °С (Таблица 3) [201], [202].

В целом, липазы бактерий р. *Geobacillus* обладают активностью в широком диапазоне температур (до 95 °С) и pH (4.0 – 11.0) [203], липаза GD-95RM бактерии *Geobacillus* sp. 95 имеет высокий температурный оптимум активности (75-85 °С) [206], ее стабильность при инкубации в течение 20 сут в 25% этаноле при 55 °С позволяет использовать этот фермент для получения биодизельного топлива (Таблица 3). Показано увеличение активности липаз в присутствии Ca²⁺ и Mg²⁺ и снижение активности в присутствии PMSF, K⁺, Co²⁺ и Zn²⁺ [209]. Ферменты специфичны к жирнокислотным остаткам C₁₂ - C₁₆ [210], что их применимыми в переэтерификации растительных масел для получения МЭЖК, а также для получения модифицированных жиров.

Таким образом, бактериальные термостабильные липолитические ферменты обладают разнообразными свойствами, что позволяет использовать их в различных процессах, связанных с реакциями гидролиза и переэтерификации. Высокая термостабильность и устойчивость этих ферментов позволит снизить себестоимость их применения в процессах, связанных с реакциями с высокой специфичностью.

Таблица 3 – Свойства термостабильных бактериальных липаз, описанных в литературе

Источник	Характеристики	Специфичность	Кинетические параметры	Ссылка
Липаза <i>G. stearothermophilus</i> FMR12	Масса 63 кДа, стабильна при 40–95 °С и pH 4–11, оптимум активности при 70 °С и pH 9.0. Добавление Тритон X-100 увеличивает активность фермента	-	-	[203]
Липаза <i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 T	Масса 43 кДа, оптимум активности при 50 °С и pH 8.0	C ₄ (фермент с His-Tag) C ₁₀ и C ₁₂ (без His-Tag)	K _m 1.22 мМ, k _{cat} 417.1 мин ⁻¹	[204]
Липаза BTL2 <i>G. thermocatenulatus</i>	Оптимум активности при 50 °С и pH 8	pNPC16	K _m 1.5831 мкМ, V _{max} 1.2003 мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ , k _{cat} 0.9269 с ⁻¹	[205]
Липаза GD-95RM <i>Geobacillus</i> sp. 95	Оптимум активности при 75-85 °С. Стабильна в 25% этаноле (при 55 °С в течение 20 сут). Сохраняет свыше 50% активности через 40 сут в 5% NaCl, перборате натрия, мочеvine, 0.1% борной кислоте, лимонной кислоте и Тритоне X-100.	C ₆		[206]
Липаза <i>G. stearothermophilus</i> AH22	Оптимум активности при 50 °С и pH 8.0-9.0	pNPC12	K _m 0.16 мМ	[207]
Липаза <i>Geobacillus</i> sp. EPT9	Масса 44.8 кДа, оптимум активности при 55 °С и pH 8.5. Сохраняет 44% активности после инкубации при 80 °С в течение 1 ч	pNPC16	-	[208]

Липаза <i>Geobacillus</i> sp. Iso5	Оптимум активности при 70 °С и pH 8.0. Сохраняет свыше 90% активности при 70 °С и 35% активности при 85 °С в течение 2 ч. Активность фермента увеличивается в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} и ингибируется HgCl_2 , PMSF, ДТТ, K^+ , Co^{2+} и Zn^{2+}	Оливковое масло	-	[209]
Липаза lip29 <i>G. thermocatenulatus</i> KCTC 3921	Масса 29 кДа, оптимум активности при 50 °С и pH 9.5	$\text{C}_{12}\text{-C}_{16}$	-	[199]

1.6 Применение иммобилизованных липолитических ферментов в процессах получения востребованных веществ из растительных масел и в процессах водоочистки

1.6.1 Иммобилизованные ферменты, применяемые для получения биодизельного топлива

Алкильные эфиры жирных кислот (в основном МЭЖК), являющиеся основными компонентами биодизельного топлива, получают в результате реакции переэтерификации масел растительного или животного происхождения. На эффективность этого процесса в основном влияют несколько факторов, включая качество сырья (содержание свободных жирных кислот), тип акцептора ацильных групп (спирты или метилацетат) и тип реакции (каталитическая, химическая или ферментативная реакция). Традиционно биодизель получают с использованием гомогенных катализаторов (KOH , NaOH , H_2SO_4 , HCl). Этот подход признан эффективным, но в то же время сопровождается рядом проблем, связанных с образованием большого количества промывных сточных вод и, как следствие, увеличением нагрузки на окружающую среду, высокими требованиями к качеству сырья, сложностью в стадии очистки от катализаторов и их повторного использования [211]. Поэтому все чаще используют ферментативную переэтерификацию, позволяющую получать биодизельное топливо в мягких условиях без дополнительных стадий очистки, способную перерабатывать сырье даже с высоким содержанием примесей (вода, свободные жирные кислоты) без протекания побочных реакций [212].

Ферментативную переэтерификацию масел проводят с использованием концентратов или иммобилизованных липаз [213]. Чтобы решить проблему удаления воды реакцию проводят в присутствии адсорбентов, таких как силикагель, оксид алюминия, полимеры и молекулярные сита. Так в работе [214] было показано, что добавление полимера из полиакрилата натрия

повышало эффективность переэтерификации олеинового масла, катализируемую липазой Eversa Transform (липаза *T. lanuginosus*, Novozymes). Конверсия реакции переэтерификации олеинового масла с метанолом в молярном соотношении 1:3 при 35 °C, количестве иммобилизованной липазы 10% и содержании воды 5% увеличилась более чем на 25% при добавлении полимера в реакционную среду.

Еще одним существенным недостатком применяемых липаз является их низкая устойчивость к спиртам (метанолу). Например, липазу Eversa Transform в реакции переэтерификации олеиновой кислоты и метанола можно использовать лишь один раз – после первого цикла реакции конверсия снижалась на 20%, а после пятого уже более чем на 70% [214].

В основном для ферментативной переэтерификации используют иммобилизованные на различных носителях липазы, поскольку они обеспечивают высокую операционную стабильность ферментов и возможность повторного использования. В работе [215] показано, что даже после 20 циклов реакции переэтерификации подсолнечного масла с этанолом в присутствии иммобилизованной на углеродном наноматериале SwCNTNH₂ липазы из *P. fluorescens* выход МЭЖК составил свыше 99%. При этом каждый цикл составлял всего 4 ч.

При выборе фермента, катализирующего реакцию переэтерификации, важно учитывать его термостабильность, а также устойчивость к органическим растворителям. В настоящее время для получения биодизельного топлива в основном применяют коммерческие препараты иммобилизованных липаз дрожжей и грибов - Novozym 435 (липаза из *P. antarctica* В, иммобилизованная на смоле Lewatit VP OC 1600) и Lipozyme TL IM (липаза из *T. lanuginosus*, иммобилизованная на макропористом силикагеле).

Бактериальные липазы также являются перспективными для применения в реакции переэтерификации масел для получения биодизельного топлива. В работе [216] липаза *Bacillus* sp. PS35, адсорбированная на гидрофобной стирол-дивинилбензольной смоле со сшивкой глутаровым альдегидом, обеспечивала выход МЭЖК 97% в реакции переэтерификации пальмового масла с метанолом (молярное соотношение 1:5) при температуре 50 °C и поэтапным добавлением метанола. Клетки липазы *B. subtilis*, инкапсулированные внутри гидрофобного носителя с магнитными частицами (Fe₃O₄), в количестве 3% обеспечивали выход МЭЖК около 90% в реакции метанолиза отработанных кулинарных масел с добавлением метанола в два этапа после 72 ч реакции при 40 °C и pH 6.5 [217]. В работе [218] исследовали иммобилизованные на гранулах полигидроксibuтирата липазы разного происхождения. Отмечено, что иммобилизованная бактериальная липаза *P. fluorescens* показала выход этиловых эфиров ЖК (100%) в реакции переэтерификации масла бабассу с этанолом (молярное соотношение масла и этанола 1:9, 45 °C, количество иммобилизованного фермента 10 вес.%) но при этом обладала большей продуктивностью по сравнению с липазами *P. antarctica* (CALB) и *T. lanuginosus* (Lipex

100L). Количество образующихся этиловых эфиров на 1 мг иммобилизованного фермента в час составило 40.9, 18.9 и 25.1 мг, соответственно. В работе [219] также было показано, что бактериальная липаза *P. fluorescens*, ковалентно иммобилизованная на матрице из полисилоксан-поливиниловом спирта, в реакции переэтерификации пальмового масла с этанолом показала большую эффективность, чем липазы из других микроорганизмов (*T. lanuginosus*, *B. ceracia*, *Penicillium camembertii* и *P. antarctica*). Продукт реакции (выход ~98% менее чем за 24 ч) характеризовался отсутствием глицерина, побочного продукта реакции, низким содержанием воды (0.02%), удельным весом (0.8) и вязкостью (4.97 сСт), что соответствует стандарту биодизельного топлива ASTM D6751. Еще одной липазой микробного происхождения с высокой эффективностью в реакции получения биодизельного топлива является *B. ceracia*. Этот фермент, иммобилизованный ковалентной сшивкой на композите (кремнезем-поливиниловый спирт), обеспечивал выход этиловых эфиров жирных кислот > 98% в оптимальных условиях реакции переэтерификации масла бабассу и этанола (молярное отношение масла к этанолу 1:7, количество иммобилизованной липазы 20 вес.%, 39 °C, 48 ч) [220].

Иммобилизованные липазы, в том числе бактериального происхождения, позволяют получать МЭЖК из масел с высоким содержанием свободных жирных кислот, которые не могут быть переработаны с использованием катализаторов. В работе [221] исследовали возможность переэтерификации масла мадуки индийской (*Madhuca indica*), которое содержит большое количество свободных ЖК (~20%), в МЭЖК под действием липазы *P. ceracia*, иммобилизованной различными способами. Липаза *P. ceracia* в свободном виде, адсорбированная на полипропиленовом носителе Accurel, в виде ПСФА и микрокристаллов, покрытых белком, обеспечивала выход МЭЖК, равный 98% (6 ч), 96% (за 6 ч), 92% (2.5 ч), и 99% (2.5 ч), соответственно. Также отмечено, что в последнем случае с участием микрокристаллов, покрытым белком, конверсия 99% достигалась и при меньшем использовании биокатализатора (загрузка белка в 2 раза ниже) при увеличении времени реакции до 16 ч.

1.6.2 Иммобилизованные липазы для получения модифицированных жиров

Процесс гидрогенизации масел, направленный на восстановление ненасыщенных связей жирных кислот триглицеридов растительных масел в присутствии Ni, Pd и Pt катализаторов [222] является наиболее широко применяемым на промышленных масложировых предприятиях для получения промышленных жиров, применяющихся в пищевой промышленности как основ для получения маргаринов и кондитерских жиров. При этом в процессе гидрирования ненасыщенных

жирных кислот триглицеридов при достаточно высоких температурах может происходить изменение их пространственной конфигурации, что приводит к превращению цис-изомеров жирных кислот в транс-изомеры, содержание которых может достигать в отдельных случаях 60% от общего количества жира в продукте [223]. Наличие транс-изомеров жирных кислот (ТЖК) в масложировых продуктах является нежелательным, и с 2003 года их содержание регулируется во многих странах ЕС, а также в США, Канаде и России [224]. Решением проблемы производства продуктов с нулевым содержанием ТЖК является использование на масложировых производствах процесса ферментативной переэтерификации растительных масел. Такой подход позволяет не только получать специализированные жиры с низким содержанием транс-изомеров, но и с требуемыми физическими характеристиками, благодаря *sn*-1,3-специфичности некоторых липаз к остаткам жирных кислот в молекулах триглицеридов. Кроме того, процесс протекает при сравнительно невысоких температурах, является энергоэффективным и экологически безопасным [225]. Ферментативная переэтерификация оказывает меньшее воздействие на окружающую среду, чем любой процесс химической модификации масел по совокупности всех сопутствующих стадий процесса. Это связано как с незначительным количеством образующихся побочных продуктов, так и с соответствующим снижением затрат на их удаление, использованием более низких температур (50 – 80 °C), меньшим расходом воды и электроэнергии суммарно по всем стадиям процесса.

Наиболее широкое применение в промышленном производстве пищевых жиров с использованием технологии ферментативной переэтерификации нашел иммобилизованный ферментный препарат Lipozyme TL IM (Новозаймс, Дания) [226], [227], полученный методом грануляции термостабильной липазы *T. lanuginosus* с силикагелем. Lipozyme TL IM был использован для переэтерификации различных масел, в том числе соевого [228], кокосового [229], пальмового [230] и других масел в широком диапазоне температур (55 – 85 °C). В работе Zhang и соавторов [229] отмечается, что Lipozyme TL IM в реакции переэтерификации смеси пальмового стеарина и кокосового масла (75:25, вес. %) оставался стабилен в реакторах периодического действия с загрузкой масла 1 и 300 кг в течение 11 и 9 циклов, соответственно. Кроме того, данная работа подтверждает отсутствие необходимости добавления воды в систему, что значительно упрощает операционный процесс реакции переэтерификации с использованием этого ферментного препарата. Важной областью применения ферментативной переэтерификации масел является получение специализированных жиров с повышенным содержанием определенных структурированных липидов, которые представляют собой триацилглицериды, которые используют для снижения содержания калорий в продуктах и увеличения содержания незаменимых жирных кислот (например, арахидоновой кислоты [231]).

Структурированные липиды, которые добавляют в детские молочные смеси, преимущественно получают с помощью *sn*-1,3-специфичных липаз, например, *R. meihei*. Так, в присутствии Lipozyme RM IM (иммобилизованная на ионообменной смоле липаза *R. meihei*) были получены структурированные липиды, богатые ненасыщенными жирными кислотами (олеиновой и др.), переэтерификацией трипальмитина и олеиновой кислоты или омега-3 полиненасыщенных жирных кислот [232]. Другой структурированный триглицерид, который применяется в детском питании, 1,3-диолеоил-2-пальмитин, является одним из основных компонентов грудного молока. В работе [233] он был получен ферментативной переэтерификацией трипальмитина и олеиновой кислоты под действием Lipozyme RM IM с использованием ультразвуковой предобработки реакционной смеси, которая улучшает взаимодействие субстрата с активным центром фермента, вследствие изменения его конформации [234]. Таким образом, применение ферментативной переэтерификации обеспечивает широкие возможности производства важных, полезных для здоровья специализированных жиров, которые невозможно получить с использованием традиционных методов переэтерификации.

1.6.3 Применение биокаталитических подходов к очистке сточных вод

Биологическая очистка сточных вод от пестицидов является относительно новым подходом, при этом он является экологически чистым, а также не требует затрат энергии. В основном для этого используют различные бактерии [235], что обеспечивает достаточную степень очистки сточных вод по сравнению с традиционными подходами, связанными с применением химических окислителей и УФ-обработки [236]. Для биологической очистки используют бактерии, относящихся к *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Serratia* [237], и продуцируемые ими гидролитические ферменты. Например, в работе [238] штамм бактерии *Bacillus aryabhattai* sp. SanPS1 обеспечивал разложение ~ 56% паратиона (*O,O*-диэтил-*O*-(4-нитрофенил)тиофосфата) в жидкой культуре в течение 24 ч при 37 °C. Биоразложение малатиона в водных растворах проводят в основном с использованием клеток бактерий рода *Bacillus*, обычно этот процесс занимает от нескольких часов до нескольких суток. Например, штамм *B. licheniformis* ML-1 обеспечивает удаление малатиона на 78% из водного раствора в течение 5 суток при 32 °C и pH 7.5 при начальной концентрации малатиона 25 мг л⁻¹ [239]. Штамм *Bacillus thuringiensis* за 3 суток при температуре 30 °C обеспечивает гидролиз 50% малатиона при его начальной концентрации в растворе 250 мг л⁻¹ [240]. Применение штамма *P. putida* для гидролиза

малатиона при его начальной концентрации 125 мг л^{-1} при температуре $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и pH 7.0 позволило удалить 72% инсектицида в течение 7 суток [235].

Для удаления малатиона из водных сред также используют гидролитические ферменты. Карбоксилэстераза D1CarE5, полученная из *A. tengchongensis*, эффективно гидролизовала малатион (на 89%) за 100 мин при низкой начальной концентрацией малатиона в растворе (5 мг л^{-1}) [241]. Помимо малатиона, бактерии также применялись для разложения другого пестицида - пендиметалина при его начальной концентрации в растворе 0.2%. Имобилизированные в полиуретановой пене клетки бактерии *Bacillus lehensis* XJU полностью удаляли его из раствора после 96 ч инкубации при $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. В этих же условиях разложение пендиметалина с использованием суспензионной культуры составило около 10-15%.

На данный момент, в отличие от других инсектицидов, для малатиона не удалось достигнуть высокой степени гидролиза с использованием иммобилизированных клеток и ферментов. Биокатализатор на основе клеток бактерии *Bacillus* sp. S14, иммобилизированных в 3% альгинате кальция, исследован в реакции гидролиза малатиона в водных растворах (степень удаления малатиона составила 64.4% после 8 ч реакции при $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и pH 7.0 при начальной концентрации малатиона 50 мг л^{-1}), однако его операционная стабильность не изучалась [242]. Карбоксилэстераза, выделенная из насекомого *Spodoptera litura* и адсорбированная на мезопористом силикатном носителе MCM-41, также не обеспечивала высокой степени гидролиза малатиона (степень удаления малатиона 60% после 120 мин реакции в фосфатном буфере pH 7.0 при начальной концентрации малатиона 10 мг л^{-1}) [243]. Поэтому остается актуальной разработка эффективных и стабильных биокатализаторов гидролиза малатиона, а также исследование биокаталитического гидролиза малатиона в процессах водоочистки, так как ранее этот вопрос не изучался.

1.7 Комплексная биотехнологическая переработка целлюлозы в востребованные вещества

Моносахариды (в основном гексозы), получаемые с использованием биомассы, в свою очередь могут быть использованы как сырье для получения различных химических веществ с использованием каталитических процессов, в том числе: 5-ГМФ [244], леулиновой [245] и молочной кислот [246]. Глюкоза также активно применяется как субстрат для сбраживания микроорганизмами, с целью получения различных веществ. Основными промышленными микроорганизмами, применяемыми для ферментации сахаров, получаемых из

лигноцеллюлозной биомассы, являются дрожжи *S. cerevisiae*, а также бактерии *Zymomonas mobilis* и *E. coli* [4]. Штаммы микроорганизмов, предназначенных для применения в современных биотехнологических процессах, получают как методами генетической инженерии, так и с применением методов селекции. Хотя ряд анаэробных бактерий, таких как *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* и *Clostridium thermotherum*, использовался для ферментации гексозных и пентозных сахаров до этанола [247], [248], [249], однако на практике трудно поддерживать анаэробные условия в большом объеме культуральной жидкости, поэтому использование термофильных анаэробов ограничено.

Помимо направленной генетической модификации микроорганизмов для получения целевых веществ, исследования сосредоточены на разработке более устойчивых штаммов, адаптированных под определенный технологический процесс. В частности, в процессе сбраживания субстратов, получаемых путем активации (или гидролиза) лигноцеллюлозы с использованием кислот, образуются различные ингибиторы. Наибольшее негативное влияние на рост и метаболизм клеток оказывают фурфурол и 5-ГМФ путем прямого ингибирования ряда ферментов, в том числе алкогольдегидрогеназы, пируват дегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы [250]. Повышение устойчивости микроорганизмов к ингибиторам сбраживания достигается путем увеличения концентрации клеток, очисткой гидролизата и нейтрализацией кислот, а также увеличением продукции фермента алкогольдегидрогеназы (нейтрализующей ингибиторы ферментации) вместе с селекцией штаммов по устойчивости к последним путем мутагенеза [4], [5].

Основными продуцентами этанола являются мезофильные дрожжи *S. cerevisiae*, однако возможность продукции этанола также была показана по отношению к другим видам, относящимся к *P. stipitis* [251], *K. marxianus* [252] и *O. polymorpha* [253]. При этом наибольшее внимание в последних исследованиях уделяют использованию двух последних видов в качестве продуцентов этанола и других целевых продуктов биосинтеза. Показано, что скорость роста и накопления этанола у них сравнимы с аналогичными показателями дрожжей *S. cerevisiae*. При этом продукция этанола дрожжами *O. polymorpha* [254] и *K. marxianus* [255] возможна при температуре 45 °С. Это позволяет не только значительно снизить затраты на охлаждение ферментационной жидкости, но и уменьшить рост побочной микрофлоры на производстве (например, бактерий, относящихся к роду *Lactobacillus*). Термотолерантные дрожжи способны расти на средах, содержащих целлобиозу, ксилозу и другие сахара. В целом, продукция этанола этими дрожжами оказалась достаточно высокой. Например, при использовании делигнифицированного шрота подсолнечника и оптимизированной смеси целлюлаз и SSF дрожжей *K. marxianus* ATCC 36907 был получен выход этанола 87.06 % от теоретического [256]. Показано, что на процесс спиртового брожения термотолерантных дрожжей значительное

влияние оказывают такие параметры, как концентрация субстрата, температура, период инкубации и pH [257]. Были получены рекомбинантные штаммы *K. marxianus*, содержащие гены ксилоредуктазы (*KmXyl1*) и ксилитдегидрогеназы (*KmXyl2*), что позволило получить 11.52 г дм⁻³ этанола при росте на среде с 30.15 г дм⁻³ ксилозы [258].

Термотолерантные дрожжи *K. marxianus* являются перспективным продуцентом для производства этанола при более высоких температурах. Многие штаммы *K. marxianus* растут при температурах до 45-52°C и могут эффективно продуцировать этанол при температурах 38-45 °C [259]. Более того, применение *K. marxianus* обеспечивает дополнительные преимущества, включая высокую скорость роста и способность использовать широкий спектр субстратов (например, галактозу, арабинозу, ксилозу и маннозу) при повышенных температурах [260]. Благодаря этим преимуществам *K. marxianus* широко используется для получения биоэтанола из различных сахаросодержащих субстратов [261]. Показано, что *K. marxianus* SS106 способен к росту при высоких температурах (35–50 °C) и в широком диапазоне pH (3.0–5.5). При использовании последовательного сбраживания штаммом *K. marxianus* SS106 крахмала маниоки скорость накопления биомассы составила 3.28 г л⁻¹ ч⁻¹ с удельной скоростью накопления биомассы 0.49 ч⁻¹, этанол накапливался в концентрации 61.72 г л⁻¹ (скорость накопления 0.86 г л⁻¹ ч⁻¹) [262].

На примере термотолерантных дрожжей [263] показано, что увеличение экспрессии НАДФ⁺-зависимой ксилитдегидрогеназы в рекомбинантном штамме дрожжей *K. marxianus* DMB13 является эффективным подходом для получения этанола (выход 0.402 г г⁻¹) из смеси глюкозы и ксилозы при 40 °C. Для снижения содержания ингибиторов сбраживания в процессе получения этанола дрожжами *K. marxianus* были сконструированы штаммы *Acinetobacter baylyi* ADP1 для получения консорциума микроорганизмов, способного полностью разлагать побочные продукты гидролиза лигноцеллюлозы - бензоат и 4-гидроксibenзоат - одновременно в периодических и непрерывных условиях в присутствии сбраживаемых сахаров [264].

Некоторые из термотолерантных штаммов *S. cerevisiae* были выделены из образцов, полученных в тропическом климате. Выделенный штамм *S. cerevisiae* TJ14 обладает оптимумом роста при 41 °C и продуцирует 40 г л⁻¹ этанола из 161 г л⁻¹ отходов бумажного производства, содержащих 66% глюканов, в присутствии целлюлазы, продуцируемой мицелиальным грибом *Acremonium cellulolyticus* [265].

Помимо *K. marxianus* и *O. polymorpha*, этанол могут продуцировать и другие термотолерантные дрожжи, в том числе: *Meyerozyma caribbica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Torulaspora globosa*, *Pichia manshurica* и *Pichia kudriavzevii* [266]. При использовании гидролизата отходов выращивания ананасов, содержащего 103.08 г л⁻¹ углеводов, в качестве сырья для сбраживания штаммом *P. kudriavzevii* CM4.2 максимально достигнутая концентрация

этанола составила 36.91 г л^{-1} при скорости его накопления $4.10 \text{ г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$. Другой штамм *P. kudriavzevii* UniMAP 3-1 сбраживал ксилозу из лигноцеллюлозы до этанола как при $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, так и при $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ с выходом 0.013 и 0.019 г г^{-1} с сопутствующим выходом ксилита 0.24 и 0.25 г г^{-1} , соответственно. Сбраживание глюкозы в этанол также тестировали при 30 и $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, выход этанола составил 0.42 и 0.41 г г^{-1} , соответственно. В этом исследовании доказана возможность использования этих термотолерантных дрожжей в высокотемпературном сбраживании как глюкозы, так и ксилозы [267].

1.8 Целесообразность получения биотоплива и других продуктов путем переработки различных компонентов биомассы

1.8.1 Липиды микроводорослей

Экономический анализ целесообразности производства продуктов переработки растительной биомассы носит ограниченный характер в силу наличия небольшого количества пилотных исследований. В основном проводится теоретический расчет стоимости продукции, основное место в исследованиях занимает комплексная переработка биомассы микроводорослей.

В работе [268] показано, что биопереработка биомассы микроводорослей для получения смеси спиртов с использованием биотехнологических подходов являлась более предпочтительной по экономическим соображениям (стоимость продуктов 899 долларов США за тонну) по сравнению с получением углеводородного топлива с использованием мягкого каталитического окисления и последующего облагораживания (стоимость продуктов 1033 долларов США за тонну). Использование комплексной переработки биомассы микроводорослей также оказалось более эффективным, нежели получение отдельных продуктов. В другом исследовании [269] показано, что при проведении симулированного технико-экономического анализа получения продуктов из биомассы наиболее эффективных штаммов микроводорослей затраты на выращивание их биомассы в большинстве случаев имеют наибольший удельный вес в цепочке создания добавленной стоимости. В случае производства одного продукта основным техническим недостатком процесса является низкий выход продукта, что обеспечивает его высокую стоимость. Затраты на биопереработку (за исключением культивирования) значительно различаются для разных видов микроводорослей из-за разницы в условиях эксплуатации, а также различиях в выходе продукта. Подход с комплексной биопереработкой значительно увеличивает потенциал использования биомассы для получения товарной продукции с 7 – 28% до более чем

97%. При получении множества продуктов из биомассы микроводорослей показан потенциал получения прибыли лишь в промышленном масштабе (при объеме производства от 10000 тонн год⁻¹).

На примере микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* разработана экономическая модель производства, которая показывает, что при суммарном объеме колонных фотобиореакторов 80 000 м³ при объеме производства 1811 тонн биомассы и 171705 л биодизельного топлива в год, стоимость производства биомассы микроводорослей оценивается в 2.01 евро кг⁻¹, а биодизельного топлива – 0.33 евро л⁻¹. Рассчитанная для проекта рентабельность инвестиций составляет 10% при сроке окупаемости 10 лет, что превышает показатели топлива, получаемого из ископаемых источников сырья [270].

Использование микроводоросли *C. vulgaris* для переработки сточных вод в целлюлозно-бумажной промышленности показало, что экономически целесообразное (чистая приведенная стоимость 15400000 евро и дисконтированный период окупаемости 13 лет) получение биомассы микроводорослей с ее последующей переработкой в ценные продукты при выращивании на этих сточных водах возможно при выполнении следующих условий: эффективность фотосинтеза 3%, эффективность извлечения липидов 75% и эффективность анаэробного сбраживания 45%. Экологические преимущества подобного подхода выражаются в виде: очистки промышленных сточных вод; использовании CO₂ для получения биомассы микроводорослей, что способствует сокращению выбросов парниковых газов; производстве чистой и возобновляемой энергии [271].

При сравнительном анализе стоимости производства биодизельного топлива путем каталитической, ферментативной и прямой переэтерификации биомассы микроводорослей показано, что наименьшие затраты достигаются при каталитической переэтерификации (4.77 долларов США кг⁻¹), большие - при прямой (9.92 долларов США кг⁻¹) и при ферментативной переэтерификации (12.53 долларов США кг⁻¹). Выявлено, что стоимость растворителя для процесса каталитической переэтерификации и стоимость метилового спирта для ферментативной и прямой переэтерификации являются наиболее важными факторами, определяющими стоимость процесса [272]. Получение биомассы микроводорослей с использованием сточных вод а также производство дополнительных продуктов с добавленной стоимостью (кормовой белок, астаксантин и экзополисахариды) может резко снизить затраты на производство биодизельного топлива. Показано, что получение астаксантина, как дополнительного продукта, может снизить стоимость производства биодизельного топлива с 3.90 до 0.54 долларов США за литр. Экономический анализ показывает, что внедрение таких экономически эффективных стратегий может сделать концепцию биоперерабатывающего завода осуществимой и прибыльной. Стоимость производства биодизельного топлива из микроводорослей может быть снижена до 0.73 долларов США кг⁻¹ сухого вещества при

выращивании в сточных водах или 0.54 долларов США л⁻¹ при совместном производстве с продуктами с высокой добавленной стоимостью [273].

1.8.2 Растительные масла

Другое направление переработки биомассы – использование растительных масел для получения биотоплива, относительно хорошо изучено с экономической точки зрения. Переэтерификация растительных масел с использованием традиционных катализаторов имеет ряд недостатков, отражающихся в высокой стоимости биотоплива, в том числе: необходимость низкого содержания свободных жирных кислот (для реакций, катализируемых щелочными катализаторами), необходимость использования высоких температур для проведения реакции переэтерификации, сложный процесс очистки глицерина. Реакция переэтерификации, катализируемая кислотами, требует более высоких температур, мольных соотношений спирта и масла, при этом кислоты вызывают коррозию реактора. При использовании щелочных катализаторов наблюдается образование мыла во время реакции, а для очистки метиловых эфиров требуется большое количество воды, что влияет на стоимость процесса [274]. Помимо экологической чистоты и меньших температур при протекании реакции ферментативная переэтерификация имеет еще одно преимущество: свободные жирные кислоты, содержащиеся в маслах, могут полностью превращаться в метиловые эфиры [275]. В работе [276] показано, что при мощности пилотной установки по ферментативной переработке отработанного пищевого масла 8000 тонн год⁻¹ стоимость биодизельного топлива из него составит 1.64 евро л⁻¹ (при текущей стоимости ферментов 800 евро кг⁻¹) и 0.75 евро л⁻¹ (при прогнозируемой стоимости ферментов 8 евро кг⁻¹), при том что стоимость дизельного топлива составляет 1.20-1.80 евро л⁻¹.

Растительные масла также являются основой для получения различных продуктов питания. Рынок маргариновой продукции в Российской Федерации является одним из наиболее динамично развивающихся сегментов пищевой промышленности. Производство жиров специального назначения и прочих продуктов на маргариновой основе в 2006 г. составляло порядка 558 тыс. тонн, а к концу 2012 г. оно увеличилось на 75% - до 974 тыс. тонн. По сравнению с остальными способами, ферментативная переэтерификация масел позволяет не только получать специализированные жиры с низким содержанием транс-изомеров, но и с требуемыми физическими характеристиками. Кроме того, данный процесс протекает при сравнительно невысоких температурах, является энергоэффективным и экологически безопасным. В настоящее время в мире действует более двух десятков заводов по получению маргаринов, заменителей масла какао, шортенингов и других жиров специального назначения с

использованием технологии ферментативной переэтерификации. Применяемый в производстве биокатализатор Lipozyme TL IM (Новозаймс, Дания) нашел наиболее широкое применение в промышленном производстве пищевых жиров с использованием технологии ферментативной переэтерификации. В России с 2006 по 2013 годы на ведущих предприятиях были внедрены новые технологии, такие как, например, фракционирование и переэтерификация растительных масел, увеличены производственные мощности по выпуску новых масложировых продуктов (жиров специального назначения, заменителей и эквивалентов масла какао). В настоящее время на территории РФ действует 21 крупное промышленное предприятие по производству маргариновой продукции, в том числе жиров специального назначения, заменителей и эквивалентов масла какао, суммарной мощностью 913 тыс. т в год, однако из-за высокой стоимости Lipozyme TL IM на предприятиях РФ он не используется [231].

Работы по получению подобных ферментных препаратов в РФ носят ограниченный характер, что подтверждает необходимость интенсификации исследований в этом направлении. В работе [277] на диатомитовый носитель Chromaton и на полимерный носитель Lewatit CNP-105 при помощи сшивающих агентов глутарового альдегида и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида соответственно. Степень иммобилизации липаз *Aspergillus oryzae*, *Burkholderia* sp., *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Pseudomonas fluorescens* и *Rhizopus oryzae* составила 53.9 – 86.4%, сохранение активности после иммобилизации (от исходной) – 14.3-35.0%. При ферментативной переэтерификации при 60° С модельных смесей пальмового и кокосового масел, полученные рандомизированные жиры обладали сходными показателями плавления при использовании иммобилизованных ферментов. Кроме того, были получены иммобилизованные ферментные препараты на основе термостабильной липазы *T. lanuginosus*. В качестве наноуглеродных адсорбентов изучены углеродные нанотрубки, различающиеся диаметром, удельной поверхностью, а также концентрацией поверхностных карбокси-групп. [278]. В качестве биокатализаторов на основе липаз могут также рассматриваться целые клетки, содержащие этот фермент. В патенте [279] описан рекомбинантный штамм дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующий липазу, связанную с поверхностью клетки, что позволяет применять этот фермент в различных реакциях без предварительной очистки.

Кроме того, разработаны отечественные иммобилизованные ферментные препараты липаз для получения биодизельного топлива. В работе [280] проведено исследование процесса метанолиза триглицеридов жирных кислот растительного масла биокатализаторами на основе иммобилизованных клеток *Yarrowia lipolytica* и липазы *Candida antarctica*. При сопоставимом выходе метиловых эфиров жирных кислот (27.2 и 21.3% соответственно) препараты на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов, продуцирующих липолитические ферменты,

характеризуются большей эффективностью и удобством использования для производства биодизельного топлива ввиду большей достигаемой конверсии и менее затратной и трудоемкой процедуры их наработки. Также для метанолиза масел были использованы коммерческие препараты иммобилизованных липаз, в том числе Novozym 435 [281] выход МЭЖК при молярном соотношении этилацетат : сурепное масло 12:1, температуре 60 °C и 15% Novozym 435 составляет 90%.

1.8.3 Крахмал и другие углеводы

Основным источником крахмала, применяемого как сырье для сбраживания, являются растения (их семена, плоды, стебли, корни и клубни или клетки у микроводорослей). В промышленности в качестве сырья в основном используют сырье пищевого назначения: пшеницу (*Triticum* sp. 70%), кукурузу (*Zea mays* 70%), ячмень (*Hordeum vulgare*, 75%) и другие виды сельскохозяйственных растений [282]. Также в качестве источника углеводов в последнее время рассматривают морские растения, содержащие крахмал. Показано, что у тихоокеанской черемухи (*Thalassia hemprichii*) его содержание составляет 70.4% [283]. Основным путем переработки крахмала для получения химических веществ служит путь с применением микроорганизмов. Путем сбраживания глюкозы в промышленности получают разнообразные вещества, в том числе: этанол, ацетон и бутанол, бутандиол, а также уксусную, молочную и лимонную кислоты. При этом используют как микроорганизмы, полученные путем селекции, так и путем генетической инженерии [284].

Основным продуктом биотехнологической переработки пищевого сырья является этанол. Мировое производство этанола составило 110 миллиардов литров в 2019 году, а в 2020 году упало до 98.6 миллиардов литров из-за пандемии. В качестве основного сырья для производства этанола за рубежом используются сахарный тростник и кукуруза, в РФ – зерно. Крахмалосодержащее сырье первоначально измельчают, затем добавляют воду и термостабильную α -амилазу и выдерживают при 60-70 °C в течение 30-45 мин, увеличивают температуру до 85-95 °C, инкубируют в течение определенного времени, при этом крахмал гидролизуются до короткоцепочечных декстринов (от двух до четырех единиц глюкозы). В полученную смесь добавляют глюкоамилазу, культуру дрожжей и мочевины. Конечная концентрация этанола в конце сбраживания составляет около 15 % (об./об.) [285].

Перспективным продуктом биопереработки крахмала является янтарная кислота, поскольку для ее получения традиционно используются продукты нефтепереработки (каталитическое гидрирование малиновой кислоты) [286]. В настоящее время стоимость

янтарной кислоты получаемая обеими способами примерно сопоставима и составляет 2.94 долларов США за кг, при этом скорость синтеза янтарной кислоты должна составлять не менее $2.5 \text{ г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$. Ранее был получен мутант *E. coli* AFP111, с мутациями в системе глюкозоспецифической фосфотрансферазы, системе пируватформатлиазы и в лактатдегидрогеназе, что позволило увеличить выход янтарной кислоты до 1 моль янтарной кислоты на моль глюкозы [287].

1.8.4 Целлюлоза

Хотя полисахариды (крахмал), получаемые из сырья пищевого назначения (пшеница, кукуруза), являются основой для промышленного получения возобновляемых химических веществ и топлива, вторым по значению источником сырья выступает лигноцеллюлоза, которая перерабатывается до моносахаридов, получаемых посредством ее кислотного или щелочного гидролиза [288]. Альтернативой химическому способу гидролиза являются процессы с применением ферментов гликозил гидролаз, которые широко используют в процессах биотехнологической переработки биомассы. Считается, что применение ферментативного гидролиза целлюлозы позволяет достичь высоких выходов моносахаридов и селективности процесса, а также сократить энергетические затраты на процесс путем использования более мягких, по сравнению с химическим гидролизом [5], условий. Кроме того, в ходе ферментативного гидролиза не наблюдается образования продуктов деструкции глюкозы, в том числе фурфурола и 5-гидроксиметилфурфурола (5-ГМФ), а также органических кислот (уксусной, муравьиной и леулиновой), оказывающих негативное влияние на микроорганизмы в процессе брожения [289]. Применяющиеся в промышленности препараты гликозил гидролаз в основном получены из мицелиальных грибов (*p. Trichoderma* или *p. Aspergillus*), поскольку они обладают высокой активностью и стабильностью при достаточно высоких температурах. Промышленность в настоящее время выпускает ряд коммерческих препаратов гликозил гидролаз, предназначенных для применения в пищевой, кормовой, текстильной, топливной, целлюлозно-бумажной промышленности и др. Основной проблемой для широкого применения целлюлаз в промышленности для последующего получения химических веществ путем ферментации получаемых сахаров является высокая стоимость ферментных препаратов. Это является следствием низкой продуктивности используемых продуцентов целлюлаз, а также низкой биодоступностью используемых для их получения субстратов. Наиболее широко представленные на рынке ферментные препараты, например, Cellic CTec2 и Cellic HTec2 (Novozymes), Accellerase 1500 (DuPont) и Cytolase CL (DSM), позволяют с высокой

эффективностью проводить гидролиз целлюлозы при температуре 50 °С в более мягких, чем при химических способах, условиях. Эти ферменты, предназначенные для применения в одностадийных процессах биотехнологической переработки целлюлозы, отличаются высокой активностью, устойчивостью к ингибиторам и меньшей загрузкой по сравнению с предыдущими поколениями ферментов, что позволяет снизить стоимость получения целевых продуктов [5].

Основным продуктом сбраживания гидролизатов целлюлозы является этанол, однако пока что его производство частично является дотационным. Сдерживающими факторами производства этанола данным способом являются стоимость сырья и его доступность, высокая стоимость производства этанола [290]. На сегодняшний день все промышленные предприятия, производящие этанол из лигноцеллюлозы, используют многостадийные технологии ее переработки. В США на момент 2016 г. этанол, полученный из лигноцеллюлозы, на рынок поставляли преимущественно два завода. Завод POET DSM, мощностью 20 млн. галлонов (5.6 млн. дал) в год использует технологию кислотной предобработки биомассы и последующего ферментативного гидролиза целлюлозы. Функционирует также завод компании DuPont мощностью 30 млн. галлонов (8.4 млн. дал) в год. Используемая на этом заводе технология включает предварительный помол биомассы, щелочное отделение лигнина и гемицеллюлозы, ферментативный гидролиз и затем ферментацию сахаров с использованием биокатализатора на основе бактерии *Z. mobilis*. В России в первом десятилетии нынешнего века насчитывалось восемь гидролизных заводов общей мощностью 5 млн. дал, на которых использовались схемы кислотного гидролиза лигноцеллюлозного сырья. Большинство из этих заводов прекратили существование, в настоящее время действует только Кировский БиоХимЗавод (г. Киров, Россия). Основными причинами невысокой экономичности таких производств являются высокое энергопотребление в процессе дистилляции этанола и его низкий выход при использовании лигноцеллюлозного сырья (по сравнению с зерном). Помимо этанола, перспективными химическими веществами, которые могут быть получены из лигноцеллюлозной биомассы, являются *n*-бутанол, изобутанол, 2,3-бутандиол, а также молочная и янтарная кислота [5]. Кроме биотехнологической переработки, сахара могут служить сырьем для получения еще одного продукта – 5-ГМФ. Для его получения преимущественно применяют дегидратацию гексоз в присутствии соляной кислоты и разнообразных ионных жидкостей. Показано, что выход этого вещества составляет 87.2% после 4 ч реакции при 140 °С при конверсии глюкозы. При прямой конверсии целлюлозы выход 5-ГМФ составляет 68.2% [291]. В качестве альтернативного подхода для переработки целлюлозы в 5-ГМФ недавно было предложено использовать мезопористый углеродный материал Сибунит-4-окс, содержащий на своей поверхности кислотные группы (0.042 ммоль на г углерода) [292]. Глюкоза, получаемая как один из продуктов

реакции каталитического гидролиза целлюлозы, может быть использована для получения других продуктов, в том числе путем сбраживания микроорганизмами.

Продукты переработки целлюлозы могут служить исходным сырьем для синтеза широкого спектра продуктов, в том числе пластиков, биополимеров, растворителей. Таким образом, биотехнологическая переработка лигноцеллюлозной биомассы в востребованные химические вещества является актуальным, но малоизученным научным направлением.

1.9 Заключение по обзору литературы

По результатам обзора литературы можно заключить, что переработка биомассы в востребованные вещества представляет собой сложную научную проблему. В части использования биомассы для получения биотоплива и востребованных химических веществ большое внимание уделяется применению микроводорослей. Хотя производство энергетических веществ из этого вида биомассы (липидов и углеводов) пока еще остается дорогостоящим, тем не менее, успехи в изучении особенностей их метаболизма и генетической инженерии позволят в дальнейшем получить более эффективные штаммы-продуценты целевых веществ (в том числе спиртов и органических кислот). Из приведенных данных можно заключить, что экономически целесообразное производство биотоплива и химических веществ как из биомассы микроводорослей, так и из растительных масел, возможно лишь при создании крупных комплексных производств с получением нескольких уникальных продуктов с высокой добавленной стоимостью. Хотя процесс ферментативной переэтерификации обладает рядом неоспоримых преимуществ перед традиционными каталитическими подходами, только кардинальное снижение стоимости ферментов сделает его экономически целесообразным. Стоит отметить, что микроводоросли также могут эффективно применяться в процессах водоочистки, что позволит использовать более дешевые субстраты для получения их биомассы. Для создания современных процессов переработки биомассы и ее компонентов широкое внимание уделяется применению экологически чистых биокаталитических подходов на основе липолитических ферментов. Создание подобных процессов требует как поиска новых термостабильных ферментов, так и их улучшения методами биоинженерии для улучшения параметров реакции и увеличения выхода целевых продуктов. Получаемые ферменты востребованы не только в упомянутых процессах, но и в смежных областях, в том числе в водоочистке. Разработка процессов, связанных с переработкой целлюлозы, направлена, в том числе, на получение

штаммов термотолерантных дрожжей, устойчивых к высокой температуре и ингибиторам сбраживания сахаров, а также эффективно продуцирующих этанол.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

В работе использованы следующие микробиологические среды, штаммы и олигонуклеотиды (Таблицы 4-6).

Таблица 4 – Состав микробиологических сред, использованных в работе

Среда	Состав	Ссылка
LB	г л ⁻¹ : дрожжевой экстракт – 5.0; триптон – 10.0; NaCl – 10.0; pH 7.0	Стандартная среда
LB-агар	1.5% агара в LB-среде	Стандартная среда
LBT	1% трибутирин в LB-агаре	Стандартная среда
SOC	г л ⁻¹ : дрожжевой экстракт, триптон - 20; NaCl – 0.584; KCl - 0.186; MgSO ₄ - 2.4; pH 7.0	Стандартная среда
BBM	г л ⁻¹ : NaNO ₃ – 0.25; CaCl ₂ ·2H ₂ O – 0.025; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0.075; K ₂ HPO ₄ - 0.075; KH ₂ PO ₄ – 0.175; NaCl – 0.025, FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0.00498; Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O – 0.01; H ₃ BO ₃ – 0.00805; раствор микроэлементов – 1 мл (г л ⁻¹ : H ₃ BO ₃ ·2H ₂ O – 2.86; MnCl ₂ ·4H ₂ O – 1.81; ZnSO ₄ – 0.222; Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O – 0.0494; NaMoO ₄ ·5H ₂ O – 0.39; CuSO ₄ ·5H ₂ O – 0.079); pH 6.8	[293]
BBM-N	Среда BBM без добавления NaNO ₃	Эта работа
BBM-P	Среда BBM без добавления K ₂ HPO ₄ и KH ₂ PO ₄	Эта работа
Среда А	Среда BBM с добавлением 0.1 г л ⁻¹ NaNO ₃	Эта работа
Среда В	Среда BBM с добавлением KH ₂ PO ₄ и K ₂ HPO ₄ (0.175 и 0.075 г л ⁻¹ соответственно)	Эта работа
BBM-S	Среда BBM с добавлением 30 г л ⁻¹ морской соли (состав: NaCl – 99.5%, Ca ²⁺ - 0.05%, SO ₄ ²⁻ - 0.25%, K ⁺ - 0.25%)	Эта работа
BG-11	г л ⁻¹ : NaNO ₃ - 1.5; K ₂ HPO ₄ - 0.04; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0.075; CaCl ₂ ·2H ₂ O - 0.036, натрия цитрат - 0.006; цитрат железа (III)-аммония - 0.006; Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O - 0.001; Na ₂ CO ₃ - 0.02; раствор микроэлементов А5 - 1 мл (г л ⁻¹ : H ₃ BO ₃ - 2.86; MnCl ₂ ·4H ₂ O - 1.81; ZnSO ₄ ·7H ₂ O - 0.222; NaMoO ₄ ·2H ₂ O - 0.39; CuSO ₄ ·5H ₂ O - 0.079; Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O - 49.4), pH 7.1	[294]
Chu-13	мг л ⁻¹ : KNO ₃ - 400; K ₂ HPO ₄ - 80; MgSO ₄ ·7H ₂ O - 200; CaCl ₂ ·2H ₂ O - 107; цитрат железа (III) - 20; лимонная кислота – 100, CoCl ₂ – 0.02; H ₃ BO ₃ – 5.72; MnCl ₂ ·6H ₂ O – 3.62; ZnSO ₄ ·6H ₂ O - 0.44; CuSO ₄ ·5H ₂ O; Na ₂ MoO ₄ – 0.084; pH 7.5	[295]
OECD	мг л ⁻¹ : мясной экстракт - 160.0; CO(NH ₂) ₂ – 30.0; KH ₂ PO ₄ - 28.0; NaCl - 7.0; CaCl ₂ ·2H ₂ O - 4.0; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 2.0; pH 7.3	[296]
WW	Стерилизованные (30 мин, 121 °C) муниципальные сточные воды с очистных сооружений Новосибирска, состав (мг л ⁻¹): химическое потребление кислорода (ХПК) – 161.0 ± 5.0; NH ₄ ⁺	[170]

	- 27.7 ± 1.3 ; PO_4^{3-} - 1.8 ± 0.1 ; NO_3^- - 0.2; SO_4^{2-} - 10.7 ± 1.0 ; Cl^- - 139.0 ± 5.0	
WW-S	Среда WW с добавлением 30 г л ⁻¹ морской соли (состав соли: NaCl – 99.5%; Ca^{2+} - 0.05%; SO_4^{2-} - 0.25%; K^+ - 0.25%)	Эта работа
Среда С	Приготовлена на основе кислотного (H_2SO_4) гидролизата остаточной биомассы <i>Micractinium</i> sp. IC-44, состав (г л ⁻¹): глюкоза - 13.66 ± 0.8 ; галактоза - 1.04 ± 0.1 ; арабиноза 2.73 ± 0.3 ; фурфурол - 0.04 ± 0.02 ; K_2HPO_4 - 0.25; NaCl - 0.05; CaCl_2 - 0.01; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0.05; свежий раствор MgCO_3 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.04); дрожжевой экстракт - 0.15; пептон - 0.5; pH 7.0	Эта работа [297]
Тамия	г л ⁻¹ : KNO_3 - 5.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2.5; KH_2PO_4 - 1.25	
YNB	г л ⁻¹ : KH_2PO_4 - 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5, NaCl - 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5.0, дрожжевой экстракт - 1.0, pH 5.5	Стандартная среда
YPD	г л ⁻¹ : дрожжевой экстракт - 100.0; пептон – 200.0; декстроза – 200.0	Стандартная среда
YNB-G	Среда YNB с добавлением (г л ⁻¹): пептона - 5.0; дрожжевого экстракта – 3.0; глюкозы 20.0	Эта работа
YNB-H	Среда на основе каталитического гидролизата активированной микрокристаллической целлюлозы березы, полученная с использованием катализатора Сибунит-4-окс состава (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; гликолевая кислота - 1.4 ± 0.2 ; молочная кислота - 0.6; винная кислота - 0.3 ± 0.1 ; изобутанол - 0.1; KH_2PO_4 - 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5; NaCl - 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5.0. Смесь доводят до pH 4.75 NH_4OH и добавляют дрожжевой экстракт до 1.0 г л ⁻¹ , стерилизацию проводят с использованием фильтра 0.22 мкм	Эта работа
YNB-M	г л ⁻¹ : целлобиоза - 3.0; глюкоза - 15.0; манноза - 2.0; фруктоза - 1.3; KH_2PO_4 - 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5; NaCl - 0.1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5.0; дрожжевой экстракт - 1.0; pH 4.75	Эта работа

Таблица 5 – Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Микроорганизмы	Штаммы
Микроводоросли	<i>Desmodesmus</i> sp. IC-75, <i>Desmodesmus</i> sp. IC-10, <i>P. kessleri</i> IC-11, <i>Parachlorella</i> sp. IC-23, <i>Micractinium</i> sp. IC-44, <i>Chlorella sorokiniana</i> IC-62, <i>Micractinium</i> sp. IC-76, <i>Chlorella</i> sp. IC-82, <i>Botryococcus</i> sp. A-1113, <i>Botryococcus</i> sp. A-1115, <i>Botryococcus</i> sp. A-1138, <i>Botryococcus</i> sp. A-1162, <i>Bracteacoccus occidentalis</i> A-1144, <i>Chlorella sorokiniana</i> A-1135, <i>Chlorella</i> sp. A-1176, <i>Chlorella</i> sp. A-1182, <i>Chlorella vulgaris</i> A-1123, <i>Nannochloris bacillaris</i> A-1139, <i>Scenedesmus abundans</i> A-1175, <i>Scenedesmus obliquus</i> A-1167 были выделены в ходе работы. <i>Chlorella sorokiniana</i> IPPAS C-1, <i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS C-2, <i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS C-9, <i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS C-15, <i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS S-333 получены из Коллекции микроводорослей IPPAS Института физиологии растений им. Тимирязева РАН (Москва). Штаммы <i>Chlorella protothecoides</i> NIES-2164 и <i>Tetradismus obliquus</i> NIES-2280 были получены из коллекции микроводорослей NIES Национального института экологических исследований (Япония).
Бактерии	<i>Bacillus licheniformis</i> BL1, <i>Bacillus licheniformis</i> BL2, <i>Bacillus licheniformis</i> BL9, <i>Bacillus</i> sp. Bsp8, <i>Ureibacillus suwonensis</i> US3, <i>Bacillus licheniformis</i>

	BL9-1, <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> GT2, <i>Geobacillus</i> sp. Gsp3, <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> GT3, <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> GT4, <i>Ureibacillus thermosphaericus</i> UT1 были выделены в ходе работы. Штамм <i>E. coli</i> B-1298 предоставлен ФИЦ ИЦИГ СО РАН для исследований [298]. Штаммы <i>E.coli</i> : DH10B, BL21(DE3) фирмы Thermo Fisher Scientific (США). Штамм <i>Actinobacillus succinogenes</i> 130Z был получен из коллекции DSMZ (Германия).
Дрожжи	<i>Kluyveromyces marxianus</i> C1, <i>Kluyveromyces marxianus</i> D5, <i>Kluyveromyces marxianus</i> B5, <i>Kluyveromyces marxianus</i> B3, <i>Clavispora lusitaniae</i> C3, <i>Kluyveromyces marxianus</i> A1, <i>Kluyveromyces marxianus</i> A5, <i>Kluyveromyces marxianus</i> D4, <i>Pichia kudriavzevii</i> B4, <i>Kluyveromyces marxianus</i> A4, <i>Kluyveromyces marxianus</i> B1, <i>Kluyveromyces marxianus</i> 4C были выделены в ходе работы. Штамм <i>Ogataea polymorpha</i> CBS4732 получен из коллекции DSMZ (Германия).
Векторы для клонирования	pAL-TA фирмы Evrogen (Россия), pET32b(+), pET28a фирмы Novagen (США).
Плазмиды	pBB540 (#27393 Addgene), pBB542 (#27395 Addgene) предоставлены Берндом Букау [299].

Таблица 6 – Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

Название	Последовательность*
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
18SUnivFor	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
18SUnivRev	5'-TCAGCCTTGCACCATAAC-3'
BMB-B	5'-CCGTCAATTCVTTTPAGTTT-3'
Ys_13	5'-AAACATAGGGGATCCATGAAAATCGTTTCGCCAAAACC-3'
Ys_14	5'-AAAGTCTACTCGAGTTCTTCCCATTCTTAACTTTCAAAGAAG-3'
Ser93Ala_F	5'-GAAATTGCGGTTGCTGGTGTGCTTTAGGCGGCATTTTCTCAC-3'
Ser93Ala_R	5'-GTGAGAAAATGCCGCCTAAAGCAACACCAGCAACCGCAATTTTC-3'
Asp192Asn_F	5'-CGTGGGTAAATAACGATGAATACTACTGCCAAAGCGCAG-3'
Asp192Asn_R	5'-CTGCGCTTTGGCAGTAGTATTCATCGTTATTTAACCCACG-3'
His222Leu_F	5'-GCTTTATTAATTCAGGTCACCTCTTAACTGTAGATAAAGAACG-3'
His222Leu_R	5'-CGTTCTTTATCTACAGTTAAAGAGTGACCTGAATTAATAAAGC-3'

* Сайты узнавания рестриктаз отмечены подчеркнутой линией, нуклеотидные замены для сайт-направленного мутагенеза отмечены курсивом

Ферменты: Phusion Hot Start Flex ДНК-полимераза (NEB), Taq SE ДНК полимераза, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTPs), эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Sfr*274I, *Mall*I (СибЭнзим), T4 ДНК лигаза (Thermo Fisher Scientific).

Наборы для выделения и очистки нуклеиновых кислот и белка: «GeneJET Genomic DNA Purification Kit», «GeneJET PCR Purification Kit», «GeneJET Gel Extraction Kit», «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» все фирмы Thermo Fisher Scientific. Bio-Rad Protein assay kit (Bio-Rad).

Реактивы: Маркер молекулярного веса ДНК: 2500-10000 п.о. (200 мкг мл⁻¹), маркер молекулярного веса белков: 10-250 кДа, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), бычий

сывороточный альбумин (БСА) – все фирмы СибЭнзим; метанол, изопропанол фирмы J.T. Baker; этанол, *n*-бутанол, ацетон, *трет*-бутанол – все фирмы Вектон; ампициллин фирмы «Синтез», хлорамфеникол фирмы Gold Biotechnology. Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Синтол» (г. Москва). Остальные реактивы – не ниже марки «хч».

2.2 Методы

2.2.1 Выделение и культивирование штаммов микроводорослей

Выделение штаммов микроводорослей и их видовая идентификация

Для выделения чистых культур микроводорослей 1 мл образца почвы или воды помещали в стеклянную колбу с 50 мл среды BBM, инкубировали в фотоавтотрофном режиме до 3 недель при 25-30 °С, фотопериоде 16 ч световая фаза/8 ч темновая фаза, при освещенности 2000 лк. Для полученных накопительных культур микроводорослей проводили их последовательное разделение на среде BBM с 2% агара. При наличии высокого уровня контаминации сопутствующей микрофлорой проводили очистку культур проточном цитофлуориметре [300]. Чистоту культур подтверждали как по отсутствию сопутствующей микрофлоры (бактерий и грибов) при посеве на агаризованные среды LB и картофельно-глюкозный агар, а также последующей световой микроскопией для подтверждения отсутствия смешанной культуры микроводорослей.

Для выделения ДНК одну колонию из чистой культуры микроводоросли вносили в 50 мл среды BBM, выращивали биомассу в течение 7-10 суток, после чего ее осаждали центрифугированием ($1000 \times g$, 10 мин). Из 20 мг биомассы выделяли геномную ДНК с использованием набора GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo, согласно инструкции производителя). ПЦР-амплификацию фрагмента гена 18S рРНК проводили в присутствии 20 нг ДНК в общем объеме 50 мкл, содержащего 0.2 мМ смеси четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0.1 мкМ праймеров, буфер и 1 ЕА Phusion ДНК-полимеразы (NEB), праймеры 18SUnivFor и 18SUnivRev. Для амплификации фрагмента, содержащего фрагмент ITS1 – 5.8S рРНК - ITS2, использовали праймеры ITS5 и ITS4. ПЦР амплификацию проводили в следующих условиях: 1 цикл- 98 °С – 30 сек, 32 цикла (98 °С – 5 с, 54 °С – 20 с, 72 °С – 30 с), 1 цикл – 72 °С 5 мин. Продукты амплификации очищали с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit (Thermo). Секвенирование проводили в компании «Синтол» (Москва, Россия) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, США). Полученные последовательности сравнивали с известными последовательностями ДНК,

содержащимися в базе GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), с использованием алгоритма BLAST. При идентификации идентичность с известными последовательностями составляла не менее 99%.

Первичный отбор штаммов по накоплению биомассы, нейтральных липидов и углеводов

Для оценки способности штаммов микроводорослей накапливать биомассу, нейтральные липиды и углеводы, использовали среды BBM, OECD и WW. Культуру, в экспоненциальной фазе роста при культивировании на соответствующей среде, вносили в лунки 96-луночного планшета Greiner (объем среды 200 мкл, начальная ОП₆₅₀ = 0.1) и культивировали при постоянном перемешивании в орбитальном термошейкере при скорости перемешивания 350 об. мин⁻¹, температуре 28 ± 1 °C, при освещенности 2000 лк люминесцентными лампами теплого белого света (3000 К) при режиме освещения 16 ч световая фаза/8 ч темновая фаза. Концентрацию биомассы оценивали путем подсчета клеток в камере Горяева. Содержание нейтральных липидов в стационарной фазе роста оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции после окрашивания красителем Нильским красным на спектрофлуориметре (п. 2.2.6). Общее содержание углеводов определяли фенол-сернокислотным методом (п. 2.2.6).

Культивирование микроводорослей в колбах

Для выращивания микроводорослей в колбах Эрленмейера первоначально вносили колонию штамма в 25-50 мл соответствующей среды и культивировали при 80 об. мин⁻¹ на орбитальном шейкере при 28 ± 1 °C при освещении 2000 лк при световом цикле 16 ч световая /8 ч темновая фаза до достижения середины экспоненциальной фазы роста. Динамику роста культуры контролировали путем измерения ОП₆₅₀. Клетки инокулировали в конические колбы объемом 100-500 мл, содержащие 25-100 мл среды при начальной оптической плотности 0.1, и культивировали при 150 об. мин⁻¹ при 28 ± 1 °C, С 2000 лк до достижения стационарной фазы роста.

Анализ влияния стрессовых факторов на накопление нейтральных липидов в микроводорослях

Колонию штамма вносили в 50 мл соответствующей среды и культивировали при перемешивании 80 об. мин⁻¹ при освещенности 2000 лк при световом цикле 16 ч световая/8 ч темновая фаза (интенсивность освещения $34 \text{ мкмоль фотонов}^{-2} \text{ с}^{-1}$ люминесцентными лампами теплого белого света, 3000 К) до достижения середины экспоненциальной фазы роста. 0.09 мг мл^{-1} клеток (по сухому веществу), вносили в 25 мл среды. Базовый эксперимент проводили при температуре 28 ± 1 °C, при режиме освещения 16 ч световая /8 ч темновая фаза, при освещенности 2000 лк и перемешивании 140 об. мин. мин⁻¹ в среде BBM. Варьировали следующие параметры:

концентрацию NaNO_3 (использовали среды BBM-N и среду А), KH_2PO_4 и K_2HPO_4 (среда В и среда BBM-P), морской соли (NaCl – 99.5%, Ca^{2+} - 0.05%, SO_4^{3-} - 0.25%, K^+ - 0.25%) концентрации от 0 до 50 г л⁻¹ и освещенности (2000-6000 лк). Состав липидов и углеводов в биомассе анализировали в стационарной фазе роста. Содержание нейтральных липидов измеряли методом флуориметрии после окрашивания красителем Нильский красный (п. 2.2.6).

Наработка образцов биомассы микроводорослей в лабораторной установке для культивирования

Для получения образцов биомассы штаммы микроводорослей культивировали в лабораторной установке объемом 110 л (0.2 м × 1.5 м × 1.0 м). Культуру выращивали в среде BBM (*Micractinium* sp. IC-44 и *P. kessleri* IC-11) или в среде Chu-13 (*Micractinium* sp. IC-76) в колбах объемом 1 л до середины экспоненциальной фазы роста при непрерывной подаче смеси воздуха с 1.5% CO_2 . Такая же смесь подавалась с постоянным расходом 220 л ч⁻¹ через пористую трубку на дне установки для культивирования. Начальная концентрация биомассы после инокуляции составила 0.09 ± 0.01 г л⁻¹. Интенсивность освещения составляла 60 мкмоль м⁻² с⁻¹, температура 28 ± 1 °С. Клетки осаждали в стационарной фазе роста с использованием сульфата алюминия в качестве флокулянта, и клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при $1000 \times g$, сушили при 37 °С в течение 48 ч и измельчали в ступке.

2.2.2 Получение и исследование свойств липолитических ферментов

2.2.2.1 Клонирование и исследование свойств эстеразы estUT1

Выделение штаммов бактерий с липолитической активностью и определение их видовой принадлежности

Для выделения микроорганизмов методом последовательного разделения использовали 0.5 г образцов компоста и LB-агар, посев инкубировали 16 ч при 37-65 °С. Определение липолитической активности культур по размеру гало вокруг колонии проводили на среде LBT при 37-65 °С, культуры морфологически отличавшихся от остальных подвергали дальнейшему анализу.

Выделение геномной ДНК из бактерий проводили с использованием набора «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» (Thermo), согласно протоколу производителя. Амплификацию фрагмента 16S рРНК длиной около 1400 п.о. проводили в реакционной смеси общим объемом 50 мкл, содержащей: 20 нг геномной ДНК, 0,24 мкМ смеси трифосфатов, 0.24 мкМ универсальных праймеров 27F и 1492R, буфера для TaqSE ДНК полимеразы и 1.0 ЕА TaqSE ДНК-полимеразы (СибЭнзим). ПЦР проводили по следующей программе: 94 °С – 3 мин; 36 циклов (94 °С – 30 с,

53 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин 30 с); 72 °C – 10 мин, остальные работы проводили как описано в п. 2.2.1.

Определение последовательности ДНК эстеразы estUT1, филогенетический и структурный анализ

Аmplification гена эстеразы estUT1 проводили с помощью ПЦР с использованием 50 нг геномной ДНК, 0.24 мкМ dNTPs, 0.24 мкМ праймеров Ys_13 и Ys_14, буфера для Phusion Hot Start Flex ДНК-полимеразы и 1 ЕА Phusion Hot Start Flex ДНК полимеразы. Реакцию амплификации проводили по следующей программе: 98 °C – 30 с; 32 цикла (98 °C – 10 с, 62 °C – 25 с, 72 °C – 25 с); 72 °C – 7 мин в амплификаторе MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad, США). ПЦР-продукт очищали с использованием набора «GeneJET PCR Purification Kit» (Thermo) и лигировали с вектором pAL-TA (Evrogen), используя T4 ДНК лигазу в условиях, рекомендованных производителем, с получением плазмиды pAL-TA-UT1. Лигазную смесь использовали для электротрансформации компетентных клеток *E. coli* DH10B (Novagen), далее проводили отбор клонов по бело-голубой селекции на среде с ампициллином (100 мкг мл⁻¹). Последовательность гена эстеразы определяли секвенированием, как описано в п. 2.2.1.

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков проводили с помощью программ ClustalW и ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript>), идентичность и похожесть определяли с использованием пакета Sequence Manipulation Suite (<https://sites.ualberta.ca/~stothard/javascript/index.html>). Филогенетическую дендрограмму строили с использованием метода ближайших соседей в программе MEGA 6.0. Статистическую достоверность топологии филогенетического дерева определяли с помощью бутстреп-теста (1000 повторов).

Моделирование структуры эстеразы estUT1 проводили с использованием сервера SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) [301] и визуализировали в программе Chimera 1.11. Качество построенной модели проверяли с помощью программы PROCHECK [302] на сервере SWISS-MODEL.

Конструирование рекомбинантных плазмид и сайт-направленный мутагенез

Плазмиду pAL-TA-UT1 и вектор pET32b(+) (или pET28a), обработанные рестриктазами BamHI и Sfr 274I, очищали в 0.8% агарозном геле, выделяли с использованием «GeneJET Gel Extraction Kit» (Thermo) и лигировали, используя T4 ДНК-лигазу, с получением плазмиды pET32b-UT1 (pET28a-UT1). Лигазную смесь использовали для трансформации *E. coli* DH10B (Novagen), как описано выше в этом пункте.

Сайт-направленный мутагенез проводили на основе полученной плазмиды pET32b-UT1. Мутации для введения аминокислотных замен Ser93Ala, Asp192Asn и His222Leu были получены

с использованием праймеров Ser93Ala_F, Ser93Ala_R, Asp192Asn_F, Asp192Asn_R, His222Leu_F и His222Leu_R. Амплификацию мутантных генов эстеразы *estUT1* проводили с помощью ПЦР с использованием 50 нг плазмиды pET32b-UT1, 0.24 мкМ dNTPs, 0.24 мкМ соответствующей пары праймеров, буфера для Phusion Hot Start Flex ДНК-полимеразы и 1.0 ЕА Phusion Hot Start Flex ДНК полимеразы. Реакцию амплификации проводили по следующей программе: 98 °С – 30 с; 20 циклов (98 °С – 10 с, 62 °С – 25 с, 72 °С – 2 мин 20 с); 72 °С – 7 мин. Полученные ПЦР-продукты после обработки эндонуклеазой рестрикции *MalI* и очистки с помощью набора «GeneJET PCR Purification Kit» (Thermo) трансформировали в клетки *E. coli* DH10B (Novagen). Наличие мутаций в нуклеотидной последовательности гена подтверждали секвенированием ДНК.

Экспрессия рекомбинантной эстеразы estUT1 в E. coli BL21(DE3)

Клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидой pET32b-UT1, выращивали в 15 мл среды LB, содержащей антибиотик ампициллин (100 мкг мл⁻¹), при 37 °С, 250 об. мин⁻¹ в течение 10 ч. 2 мл инокулята переносили в 200 мл среды LB и культивировали при 32 °С и 250 об. мин⁻¹. При оптической плотности культуры, равной 0.6-0.8 (600 нм) экспрессию гена индуцировали добавлением 0.5 мМ ИПТГ. После инкубации при 16 °С и 250 об. мин⁻¹ в течение 18 ч клетки осаждали 10 мин при 3000 об. мин⁻¹ и 4 °С и отмывали дважды 50 мМ Tris-HCl pH 7.0. Биомассу клеток суспендировали в 50 мМ Tris-HCl pH 7.0 и разрушали обработкой ультразвуком при 0 °С при мощности 50 Вт (5 циклов по 40 сек с 20 сек). Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 5000 об. мин⁻¹ и температуре 4 °С. Супернатант и клеточный осадок собирали как растворимую и нерастворимую фракции белка, соответственно. Клеточный осадок промывали дважды 50 мМ Tris-HCl pH 7.0 и растворяли в 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, содержащем 8.0 М мочевины, при комнатной температуре и 80 об. мин⁻¹ в течение 1 ч. Суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 10000 об. мин⁻¹ и 4 °С. Рефолдинг белка проводили ступенчатым диализом при 4 °С в 20 мМ Tris-HCl pH 8.0 в понижающемся градиенте концентрации мочевины (8–0 М). Очистку рекомбинантного фермента проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, уравновешенной буфером, содержащим 0.5 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl pH 8.0. Белок элюировали с колонки в повышающемся градиенте концентрации имидазола (3–300 мМ) в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, содержащем 0.5 М NaCl. Очищенный белок наносили на колонку с сорбентом Sephadex G25, уравновешенную 50 мМ Tris-HCl pH 7.0. Элюцию проводили тем же буфером.

Для получения *estUT1* проводили обработку *estUT1*-TrxA с использованием энтерокиназы (Thermo). Для этого в реакционную смесь, содержащую 25 мкг эстеразы, 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, добавляли энтерокиназу в количестве 1 ЕА и выдерживали в течение 16 ч при температуре 23 °С.

Коэкспрессия рекомбинантной эстеразы estUT1-TrxA с молекулярными шаперонами

Клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидой pBB542, отбирали на LB-агаре со спектиномицином (50 мкг мл^{-1}) и использовали для приготовления электрокомпетентных клеток. Полученные клетки трансформировали плазмидой pBB540, проводили селекцию клонов на LB-агаре со спектиномицином (50 мкг мл^{-1}) и хлорамфениколом (20 мкг мл^{-1}), и затем повторяли процедуру приготовления компетентных клеток. Полученные клетки использовали для трансформации плазмидой pET32-UT1, трансформанты сеяли на агаризованную среду LB, содержащую спектиномицин (50 мкг мл^{-1}), хлорамфеникол (20 мкг мл^{-1}) и ампициллин (100 мкг мл^{-1}). Экспрессию белка проводили согласно процедуре, описанной выше в этом пункте.

Определение активности эстеразы

Активность рекомбинантной эстеразы определяли спектрофотометрией с использованием эфиров карбоновых кислот *n*-нитрофенола (*p*NP) в качестве субстратов. Реакционная смесь состояла из 150 мкл раствора субстрата (1 об. 0.1 М эфира *p*NP в ацетонитриле, 4 об. этанола и 95 об. 50 мМ Tris-HCl pH 8.0) и 20 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали при температуре 50 °C в течение 15 мин, затем реакцию останавливали охлаждением на льду и измеряли ОП₄₀₅. За одну единицу активности эстеразы estUT1 (ЕА) принимали количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль *n*-нитрофенола в мин в анализируемых условиях. Удельную активность эстеразы выражали в единицах ЕА мг^{-1} белка.

Анализ свойств эстеразы

Субстратную специфичность эстеразы определяли, измеряя активность фермента с использованием в качестве субстратов *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот с различной длиной углеводородного остатка (*p*NPC2, *p*NPC4, *p*NPC8, *p*NPC12, *p*NPC16 и *p*NPC18) при температуре 50 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0. Результат выражали в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата.

Для определения pH оптимума фермента измеряли его активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата при 50 °C в течение 15 мин в следующих буферах (50 мМ): цитратно-фосфатный (pH 5.0-6.0), натрий-фосфатный (pH 6.0-8.0), Tris-HCl (pH 8.0-9.0), глицин-NaOH (9.0-10.0). Результат выражали в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность эстеразы с использованием 50 мМ Tris-HCl pH 8.0.

Стабильность эстеразы определяли, выдерживая фермент в буферах с различными значениями pH при температуре 50 °C в течение 1 ч, после чего измеряли остаточную ферментативную активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата. Результат выражали

в виде графика относительной активности, где активность эстеразы до прогрева была принята за 100%.

Для определения температурного оптимума фермента измеряли его активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0 в течение 15 мин при 30-90 °С. Результат выражали в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность эстеразы при 80 °С.

Термостабильность фермента при температурах 50-80 °С определяли путем инкубации фермента в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0 в течение 1-8 ч при указанных температурах, после чего измеряли остаточную ферментативную активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата. Результат выражали в виде графика относительной активности, где активность эстеразы до прогрева была принята за 100%.

Влияние на фермент различных солей металлов (NaCl, KCl, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, FeSO₄ и Al₂(SO₄)₃) и других добавок (2-меркаптоэтанол, ЭДТА, ДТТ, ФМСФ, SDS, Твин 20, Твин 80, Тритон X-100) в концентрациях 1 и 10 мМ определяли по остаточной активности, измеренной с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата, после инкубации фермента при 50 °С в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0 в течение 1 ч с указанными соединениями. Влияние различных органических растворителей (метанол, этанол, *n*-гексан, ацетон, ДМСО, хлороформ, изопропанол, *n*-бутанол, ацетонитрил и ДМФ) на активность фермента определяли по остаточной активности, измеренной с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата, после инкубации фермента в течение 1-24 ч при 50 °С в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, содержащем 10 или 30% (об./об.) указанных растворителей. Результат представляли в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность эстеразы без добавления химических веществ.

Измерение кинетических параметров эстеразы

Кинетические параметры (K_M , V_{max} , $k_{кат}$) гидролиза *p*NPC2, *p*NPC4 и *p*NPC8, катализируемого эстеразой, вычисляли при анализе зависимости начальных скоростей гидролиза от концентрации субстратов (0.05-10 мМ) в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0 при 50 °С. Результаты измерений обрабатывали с использованием регрессионного анализа в прямых координатах согласно уравнению Михаэлиса-Ментен:

$$v = \frac{V_{max} \times S}{S + K_M} \quad (1)$$

где v – скорость ферментативной реакции, V_{max} – максимальная скорость реакции, S – концентрация субстрата, K_M – константа Михаэлиса.

2.2.2.2 Исследование свойств рекомбинантной липазы G3

Выделение рекомбинантной липазы G3

Штамм *E. coli* В-1298, продуцирующий термостабильную липазу бактерии *G. stearothermophilus* G3, культивировали в 200 мл среды LB при 37 °С и 250 об. мин⁻¹, экспрессию липазы индуцировали добавлением 1 мМ ИПТГ. После инкубации при 37 °С 250 об. мин⁻¹ в течение 6 ч клетки осаждали центрифугированием при 3000 об. мин⁻¹ в течение 10 мин. Индуцированные ИПТГ клетки суспендировали в 50 мМ Tris-HCl pH 7.0 и разрушали обработкой ультразвуком при 60 Вт (5 циклов по 40 сек с 20 сек интервалами). Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 5000 об. мин⁻¹ и температуре 4 °С. Для выделения белка к полученному супернатанту добавляли сульфат аммония до 30% от насыщения, после формирования осадка при 4 °С последний отделяли центрифугированием при 14000 об. мин⁻¹ в течение 10 мин при 4 °С, затем проводили насыщение раствора сульфатом аммония до 80%, осадок отделяли центрифугированием. Полученный белок обессоливали диализом в 50 мМ Tris-HCl pH 7.0 при 4 °С с использованием целлюлозной мембраны (10 кДа).

Определение активности липазы G3

Активность липазы G3 определяли методом алкалиметрического титрования при постоянном pH по скорости гидролиза эмульсии трибутирина. Для этого 0.01 г фермента, полученного после очистки, добавляли к 10 мл раствора субстрата и титровали 0.05 М NaOH при удержании pH 7.0 в течение 15 мин при температуре 30 °С.

Раствор субстрата готовили перемешиванием трибутирина (3 мл), дистиллированной воды (47 мл) и раствора эмульгатора (10 мл) в течение 30 с в гомогенизаторе при частоте вращения 20000 об. мин⁻¹. Раствор эмульгатора готовили путем растворения гуммиарабика (6.0 г), глицерина (540 мл), NaCl (17.9 г) и KН₂РO₄ (0.41 г) в дистиллированной воде, доводя общий объем до 1 л. Одна единица активности липазы G3 определялась как количество фермента, необходимое для выделения 1 мкмоль масляной кислоты в мин в анализируемых условиях. Удельную активность липазы G3 выражали в единицах ЕА г⁻¹ белка.

2.2.3 Получение и исследование свойств иммобилизованных ферментов в реакциях гидролиза и переэтерификации

2.2.3.1 Ферментный препарат КатА

Приготовление КатА методом поперечной сшивки агрегатов белка

Для получения ферментного препарата КатА на основе поперечно сшитых агрегатов липазы *B. serasia* (Amano) 2 мл раствора фермента (концентрация 25 мг мл⁻¹) в 0.025 М

фосфатном буфере при pH 7.0 смешивали с 5 мг БСА и 0.008 мл Triton X-100, затем к полученному раствору по каплям добавляли 4 мл ацетона и перемешивали при 4 °C в течение 30 мин с последующим добавлением глутарового альдегида (0.075 М). После 4 ч инкубации КатаА отделяли от жидкости центрифугированием (4 °C, 3000 g, 5 мин) и дважды промывали ацетоном. После оценивали относительную активность (IcD) КатаА, характеризующую количество ферментативной активности, сохранившуюся после получения ферментного препарата методом ПСФА.

IcD была вычислена по следующей формуле:

$$IcD = \frac{E_{cat}}{E_{enz}} \times 100\%, \quad (2)$$

где E_{cat} – активность полученного ферментного препарата, E_{enz} – активность исходного ферментного препарата.

Переэтерификация липидов микроводорослей в присутствии ферментного препарата КатаА

Ферментативную переэтерификацию липидов микроводорослей (50 мг) с метанолом проводили с использованием 1-20% КатаА (по отношению к маслу) в течение 24 ч при 30-60 °C, при мольном соотношении метанол:масло (3:1 - 10:1), концентрации воды (до 5%) и перемешивании 500 об. мин⁻¹. Молярное соотношение рассчитывали на основе средней молекулярной массы липидов. Среднюю молекулярную массу липидов рассчитывали в соответствии с составом жирных кислот [303]. В качестве растворителя в реакционную смесь добавляли *n*-гексан (масло: гексан 1:2 об./об.). Выход МЭЖК ($Y_{МЭЖК}$) рассчитывали в соответствии с п. 2.2.6.

Измерение активности КатаА

Активность КатаА измеряли с использованием *p*-нитрофенилпальмитата (*p*NPP) в качестве субстрата. Реакционная смесь содержала 150 мкл раствора *p*NPP (0.1 М *p*NPP в ацетонитриле, этаноле и 0.05 М Tris pH 8.0 в объемном соотношении 1:4:95), 0.02 мл деионизированной воды и 0.005-0.01 г КатаА. Смесь инкубировали при 50 °C в течение 15 мин. Реакцию останавливали при 0 °C, раствор центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об. мин⁻¹, супернатант собирали и измеряли ОП₄₀₅. За одну единицу активности (ЕА) принимали количество ферментного препарата (г), необходимое для высвобождения 1 мкмоль *n*-нитрофенола в минуту.

Оптимизация реакции переэтерификации липидов микроводорослей методом поверхности отклика

Реакцию получения МЭЖК из липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 оптимизировали оптимизирован с помощью метода поверхности отклика (RSM) на основе

центрального композитного планирования (CCD) с использованием программного обеспечения Design-Expert v.10 (Stat-Ease Inc.). Для увеличения выхода МЭЖК оптимизировали факторы (количество Ката, температура, молярное отношение метанол к маслу и количества воды) с использованием 5-уровневого 4-факторного центрального композитного плана эксперимента. Матрица экспериментов состояла из 30 опытов (16 факторных точек, восемь осевых точек и шесть повторов в центральных точках), что обеспечило достаточный объем данных для получения полиномиальной модели второго порядка (квадратичной) для построения поверхности отклика.

Полиномиальная модель второго порядка для прогнозирования отклика (прогнозируемого выхода реакции переэтерификации) были рассчитана в соответствии со следующим уравнением:

$$Y_{\text{пр}(n)} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

где $Y_{\text{пр}(n)}$ – предсказанная переменная отклика (прогнозируемый выход реакции), n – номер модели; β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} – постоянные коэффициенты регрессии рассчитанной модели; X_i , X_j ($i = 1, 4$; $j = 1, 4, i \neq j$) – независимые переменные (факторы).

Оценка операционной стабильности Ката

Операционную стабильность Ката в реакции переэтерификации липидов *Micractinium* sp. IC-76 определяли в течение 5 циклов реакции в стандартных условиях: температура 39.8 °С, концентрация Ката 12.3%, соотношение метанол: липиды 1:3.5, концентрация воды 2.3%. После каждого цикла реакции (1 цикл = 24 ч) Ката отделяли от реакционной среды, анализировали состав смеси, отмывали ацетоном и добавляли к свежей смеси липидов и метанола. Выход МЭЖК определяли методом ГХ-МС согласно п. 2.2.6.

2.2.3.2 Имобилизированный ферментный препарат БКЛ

Приготовление БКЛ

Для синтеза аminosиликагеля предварительно проводили активацию мезопористого силикагеля АСКГ (размер частиц – 0.2-0.5 мм, насыпная плотность 0.4 г см⁻³) путем прокаливании при температуре 170 °С в течение 6 ч, затем к 1 г силикагеля добавляли 95% 3-аминопропилтриэтоксисилан в безводном бензоле (из расчета 25 мл раствора на 1 г силикагеля) и инкубировали в термостатированном шейкере 3 ч при температуре 75 °С и 150 об. мин⁻¹. Модифицированный силикагель промывали 50 мл бензола, 50 мл этанола и 50 мл дистиллированной воды. Водный раствор глутарового альдегида в концентрации 1.2%,

выдержанный в течение 20 мин при 60 °С, добавляли к аминированному силикагелю из расчета 2 мл на 1 г силикагеля и перемешивали полученную смесь в течение 2 ч при комнатной температуре. Обработанный силикагель промывали 0.1 М фосфатным буфером pH 6.5.

Очищенную липазу *G. stearothermophilus* G3, полученную в соответствии с пунктом 2.2.2.2, растворяли в 0.1 М фосфатном буфере pH 6.5 и добавляли к обработанному глутаровым альдегидом силикагелю (из расчета 50 мг фермента на 1 г носителя) при перемешивании в течение 3 ч при 50 °С и 150 об. мин⁻¹. Имобилизированный ферментный препарат БКЛ отфильтровывали под вакуумом, двукратно промывали водой и сушили в вакуумном испарителе при комнатной температуре до насыпной плотности 0.75 г см⁻³

Определение активности БКЛ

Активность имобилизированной липазы *G. stearothermophilus* G3 определяли путем алкалиметрического титрования при постоянном pH по скорости гидролиза эмульсии трибутирина, как описано в п. 2.2.2.2. Одна единица активности БКЛ определялась как количество БКЛ, необходимое для выделения 1 мкмоль масляной кислоты в мин в анализируемых условиях. Удельную активность выражали в единицах ЕА г⁻¹ имобилизированного ферментного препарата. Относительную активность БКЛ после имобилизации (*IcD*) оценивали по формуле 2.

Применение имобилизированного ферментного препарата БКЛ для получения МЭЖК

Переэтерификацию подсолнечного масла (2 г) проводили с использованием 0.25-20% БКЛ в течение 24 ч при 30-60 °С и перемешивании 250 об. мин⁻¹. Для оптимизации условий проведения процесса исследовали также влияние природы растворителя (*n*-гексан, ацетон, *трет*-бутанол) и его количества (2 – 10 мл), мольного соотношения метанол : масло (от 1:1 до 9:1) и концентрации воды (1 – 10%, об./вес.).

Операционную стабильность БКЛ определяли в течение 20 циклов реакции в стандартных условиях: 2 г масла, БКЛ в концентрации 20% (вес./вес.), метанол в мольном соотношении к маслу 3:1, 4 мл *трет*-бутанола и 4% (об./вес.) воды, температура 40 °С, 250 об. мин⁻¹. После каждого цикла реакции (1 цикл = 24 ч) имобилизованную липазу отделяли от реакционной среды, анализировали состав смеси, а БКЛ промывали *трет*-бутанолом и добавляли к свежей смеси подсолнечного масла и метанола. Выход МЭЖК определяли методом ГХ-МС согласно п. 2.2.6. Время полуинактивации БКЛ ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из экспериментальных данных с использованием уравнения линейной регрессии в программе OriginPro 8.5.

Применение БКЛ в реакции переэтерификации растительных масел для получения модифицированных пищевых жиров

Реакцию переэтерификации смеси подсолнечного масла и полностью гидрированного соевого масла в соотношении 75:25 (вес./вес.), объем 600 мкл, проводили с использованием 10-30% БКЛ в течение 1-5 ч при 70-80 °C и 1400 об. мин⁻¹. Для оптимизации условий реакции также исследовали молярное соотношение гидрированное соевое масло: подсолнечное масло (1:9, 1:4, 1:3 и 2:3).

Операционную стабильность БКЛ определяли в течение 5 циклов реакции переэтерификации в стандартных условиях: молярное соотношение гидрированное соевое масло : подсолнечное масло 1:3, 10% БКЛ, 70 °C, 1400 об. мин⁻¹. После каждого цикла реакции (1 цикл = 24 ч) БКЛ отделяли от реакционной среды, анализировали состав смеси, а БКЛ отмывали *n*-гексаном и добавляли свежую сырьевую смесь. Степень переэтерификации (*ID*) определяли методом ВЭЖХ-МС согласно п. 2.6.

Время полуинактивации БКЛ ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из экспериментальных данных с использованием уравнения линейной регрессии в программе OriginPro 8.5.

2.2.3.3 Ферментный препарат ПСФА-estUT1-TrxA

Приготовление ферментного препарата ПСФА-estUT1-TrxA методом поперечной сшивки агрегатов белка

Для получения ПСФА к 0.5 мл фермента (1 мг мл⁻¹ в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0) добавляли осадитель, глутаровый альдегид и добавки в общем объеме 1.5 мл. Реакцию иммобилизации проводили при температуре 4 °C и скорости перемешивания 200 об. мин⁻¹. После завершения приготовления ПСФА отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об. мин⁻¹ (4 °C), дважды отмывали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0.

В качестве осадителей в работе использовали ацетон, *трет*-бутанол, изопропанол, этанол и сульфат аммония 50% (вес./об.) в соотношении осадитель:фермент 3:1 (об./об.). ПСФА-estUT1-TrxA готовили, как описано выше в этом пункте. Концентрация глутарового альдегида составила 75 мМ, время иммобилизации 4 ч.

В качестве добавок использовали БСА и SDS в количестве 10 мг. Концентрация сульфата аммония и глутарового альдегида составила 60% (вес./об.) и 75 мМ, соответственно, время иммобилизации 4 ч.

Для оптимизации параметров приготовления ПСФА-estUT1-TrxA была построена модель с помощью факторно-центрированного центрально-композиционного планирования (FCCCD) по методу RSM в программе Design-Expert 10 (Stat-Ease Inc.). Для этого варьировали следующие параметры приготовления ПСФА-estUT1-TrxA: время реакции (1, 4.5 и 8 ч), концентрация

сульфата аммония (30, 55 и 80%, вес./об.), глутарового альдегида (25, 87.5 и 150 мМ) и БСА (0.010, 0.105 и 0.200 мМ). В качестве отклика была выбрана относительная активность ПСФА (IcD) estUT1-TrxA.

Полиномиальная модель второго порядка для прогнозирования отклика (прогнозируемого значения IcD) были рассчитана в соответствии со следующим уравнением:

$$IcD_{\text{пр}} = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

где $Y_{\text{пр}(n)}$ – предсказанная переменная отклика (прогнозируемая степень иммобилизации), β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} – постоянные коэффициенты регрессии рассчитанной модели; X_i , X_j ($i = 1, 4; j = 1, 4, i \neq j$) – независимые переменные (факторы).

Определение активности ПСФА-estUT1-TrxA

Активность ПСФА-estUT1-TrxA определяли спектрофотометрически согласно методу, описанному в п. 2.2.6. За одну единицу активности принимали количество иммобилизованного ферментного препарата, необходимое для высвобождения 1 мкмоль *n*-нитрофенола в мин в анализируемых условиях. Удельную активность выражали в единицах ЕА мг⁻¹ ферментного препарата, также рассчитывали остаточную степень активности ПСФА после приготовления (IcD) по формуле 2.

Свойства дополнительно исследовали в реакции гидролиза малатиона. 5 мкл раствора малатиона в этаноле (10 мМ) смешивали с 515 мкл 50 мМ Tris-HCl pH 7.0 и 80 мкл ПСФА-estUT1-TrxA и инкубировали 30 мин при 37 °C и 250 об. мин⁻¹. Малатион экстрагировали *n*-гексаном и определяли методом ГХ-МС (п. 2.2.6). Результат выражали в виде степени гидролиза малатиона (MHD) в анализируемых условиях:

$$MHD = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\%, \quad (5)$$

где C – концентрации малатиона в растворе после реакции гидролиза, C_0 – начальная концентрация малатиона в растворе.

Исследование свойств estUT1-TrxA (при коэкспрессии с шаперонами) и ПСФА-estUT1-TrxA

Для определения pH оптимума эстеразы estUT1-TrxA, полученной путем ее коэкспрессии с шаперонами *E. coli*, а также ПСФА-estUT1-TrxA, измеряли ее активность с использованием рNPC2 в качестве субстрата при 50 °C в течение 15 мин в следующих 50 мМ буферах: цитратно-фосфатный (pH 5.0), натрий-фосфатный буфер (pH 6.0-7.0), Tris-HCl (pH 8.0-9.0), глицин-NaOH

(рН 10.0). Результат представляли в виде графика относительной активности, где за контрольное значение была принята активность эстеразы с использованием 50 мМ Tris-HCl рН 8.0.

Стабильность estUT1-TrxA и ПСФА-estUT1-TrxA определяли путем инкубации фермента в буферах разным рН при 50 °С в течение 1 ч, после чего измеряли остаточную активность с использованием *pNPC2* в качестве субстрата. Результат выражали в виде графика относительной активности в данных условиях, где активность эстеразы до прогрева была принята как контрольное значение.

Для определения температурного оптимума estUT1-TrxA и ПСФА-estUT1-TrxA определяли ее активность с использованием *pNPC2* в качестве субстрата в 50 мМ Tris-HCl рН 8.0 при 30-90 °С в течение 15 мин. Результат выражали в виде графика относительной активности, где за контрольное значение была принята активность эстеразы при 80 °С.

Термостабильность estUT1-TrxA и ПСФА-estUT1-TrxA при 50-80 °С определяли, выдерживая фермент в 50 мМ Tris-HCl рН 8.0 в течение 1-8 ч при указанных температурах, после чего измеряли остаточную ферментативную активность с использованием *pNPC2* в качестве субстрата. Результат представляли в виде графика относительной активности, где активность эстеразы до прогрева была принята за 100%.

Константа скорости инактивации (k_i) рассчитывали по уравнению:

$$\ln \left(\frac{E}{E_0} \right) = -k_i \times t, \quad (6)$$

где E – это активность фермента после прогрева в течение времени t , E_0 – это начальная активность фермента до прогрева.

Время полуинактивации ($t_{1/2}$) определяли из уравнения:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_i} \quad (7)$$

Влияние различных добавок (30% растворы этанола и метанола, об./об.; 10 мМ растворы ФМСФ, 2-меркаптоэтанола и ДТТ; 1% растворы SDS, Твин 20 и Тритон X-100, вес./об.) на активность исходной и ПСФА эстеразы определяли по остаточной активности (субстрат - *pNPC2*), после инкубации ферментного препарата при 50 °С в 50 мМ Tris-HCl рН 8.0 в течение 1 ч с добавками. Результат представляли в виде графика относительной активности, где за контрольное значение была принята активность фермента (ПСФА фермента) без добавления добавок.

Кинетические параметры (K_M , V_{max} , $k_{кат}$) гидролиза субстрата, определяли при анализе зависимости начальных скоростей гидролиза от концентрации субстратов *pNPC2*, *pNPC4*, *pNPC8* и малатиона (0.003-10 мМ) в 50 мМ Tris-HCl рН 8.0 при 50 °С. Результаты измерений

обрабатывали методом регрессионного анализа в прямых координатах с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен.

Применение ПСФА-estUT1-TrxA в реакции гидролиза малатиона

Операционную стабильность ПСФА-estUT1-TrxA определяли в течение 25 циклов реакции гидролиза малатиона в 50 mM Tris-HCl pH 7.0, OECD и WW. 0.1 г ПСФА-estUT1-TrxA в 495.8 мкл среды смешивали с 4.2 мкл 10 mM раствора малатиона в этаноле и инкубировали в течение 14 ч при 37 °C и 250 об. мин⁻¹, после чего определяли степень гидролиза малатиона, как описано выше. После каждого цикла реакции ПСФА-estUT1-TrxA отделяли центрифугированием (4 °C, 5 мин, 4000 об. мин⁻¹) и отмывали трижды 50 mM Tris-HCl pH 7.0.

2.2.4 Переработка биомассы микроводорослей в МЭЖК и янтарную кислоту

Химическая переэтерификация липидов микроводорослей в присутствии серной кислоты

Липиды в количестве 1 г растворяли в 100 мл толуола, затем добавляли 200 мл 2% H₂SO₄ в сухом метаноле и интенсивно перемешивали. Смесь инкубировали при 80 °C в течение 2 ч, затем добавляли 500 мл 5% NaCl. МЭЖК экстрагировали из смеси 10 мл *n*-гексана. После разделения фаз верхний слой отделяли с помощью делительной воронки, промывали 2% NaHCO₃ и сушили над безводным Na₂SO₄. Раствор фильтровали, и растворитель удаляли в токе азота.

Прямая переэтерификация биомассы микроводорослей

Для прямой переэтерификации липидов микроводорослей в биомассе без их предварительной экстракции использовали смесь, содержащую 1 г сухой биомассы микроводорослей, 10 мл сухого метанола с 2% H₂SO₄ и 10 г ионной жидкости. После инкубации при 1000 об. мин⁻¹ при 65 °C в течение 18 ч, МЭЖК экстрагировали *n*-гексаном и сушили в токе азота до постоянной массы.

Гидролиз остаточной биомассы микроводорослей для последующего сбраживания

Биомассу *Micractinium* sp. IC-44, полученную после прямой переэтерификации в присутствии ИЖ, трижды промывали деионизированной водой. Гидролиз проводили в присутствии 2% H₂SO₄ и 3.5% биомассы (по сухому веществу) в автоклаве при 130 °C в течение 90 мин. Полученную смесь упаривали при 70 °C и нейтрализовали аммиаком до pH 7.0. После осаждения при комнатной температуре в течение 20 мин нейтрализованный раствор центрифугировали при 3500 об. мин⁻¹ в течение 10 мин и затем очищали с использованием смолы AmberChrom 50WX4 (предварительно промытой деионизированной водой).

Сбраживание продуктов гидролиза биомассы микроводорослей для получения янтарной кислоты

Одну колонию *A. succinogenes* 130Z, выращенную среде ВНИ (37 г л⁻¹), добавляли в колбу (25 мл), содержащую жидкую среду ВНИ (10 мл), и культивировали в аэробных условиях при 37 °С до достижения середины экспоненциальной фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием при $1000 \times g$ в течение 10 мин. Культуру вносили в среду С (Таблица 4) при начальной концентрации биомассы 0.15 ± 0.01 г л⁻¹ и культивировали в герметичной колбе (объем среды 10 мл) с портом для отбора образцов при 150 об. мин при 37 °С в течение 148 ч в атмосфере 2% CO₂.

2.2.5 Переработка продуктов каталитического гидролиза целлюлозы в этанол

Приготовление среды YNB-H

Для экстракции каталитического гидролизата целлюлозы, полученного в присутствии катализатора Сибунит-4-окс [292], смесь фильтровали через фильтровальную бумагу и упаривали в десять раз на ротационном испарителе при 70 °С. Затем упаренную смесь помещали в делительную воронку, добавляли равный объем изобутанола, раствор тщательно перемешивали и удаляли водную часть. Экстракцию повторяли трижды. Органические фракции объединяли и полученный раствор дополнительно упаривали на ротационном испарителе. Оставшийся водный раствор повторно выпаривали до конечной концентрации глюкозы 20 г л⁻¹, и объединяли с остальными компонентами среды YNB (Таблица 4). Затем смесь доводили до pH 5.5 NH₄OH и добавляли и дрожжевой экстракт (1.0 г л⁻¹). После фильтрации через стерильный фильтр (0.22 мкм) получали среду YNB-H.

Выделение и идентификация штаммов термотолерантных дрожжей

Для выделения штаммов термотолерантных дрожжей использовали образцы молочных продуктов (1 мл), которые помещали в среду YPD (20 мл) с добавлением стрептомицина (20 мкг мл⁻¹) и выращивали при 30 °С в течение 48 ч. Затем накопительные культуры разделяли на 1.5% YPD агаре и инкубировали при 40 °С в течение 48 ч. Отдельные колонии трижды разделяли в тех же условиях для приготовления чистой культуры. Геномную ДНК выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo). ПЦР-амплификацию частичной последовательности 18S рРНК проводили с использованием универсальных праймеров 18SUnivFwd и BMB-B с последующим секвенированием с помощью BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo) и Phusion ДНК-полимеразы (NEB), выполняли как описано в п. 2.2.1.

Культивирование дрожжей в глубоких 96-луночных планшетах

Для определения параметров культивирования дрожжей на различных субстратах (п. 2.2.6) использовали систему «Micro-flask» (Applikon Biotechnology) с глубокими 96-луночными планшетами объемом 1 мл [304]. Клетки выращивали аэробно до оптической плотности 0.8-1.0 при 595 нм в среде YNB-G с добавлением 5.0 г л⁻¹ пептона, 3.0 г л⁻¹ дрожжевого экстракта и 20.0 г л⁻¹ глюкозы до достижения середины экспоненциальной фазы роста. Для культивирования в системе «Micro-flask» 20 мкл культуры добавляли в лунки до конечной концентрации 5×10⁵ клеток в 1 мл в 180 мкл среды YNB pH 4.75 с добавлением 1.0 г л⁻¹ дрожжевого экстракта и углеводами (20 г л⁻¹ глюкоза, манноза, сахароза или целлобиоза), после чего проводили культивирование при 350 об мин⁻¹ в течение до достижения стационарной фазы роста при 42-48 °С. В качестве контроля для экспериментов с культивированием дрожжей на среде с продуктами каталитического гидролизата целлюлозы (YNB-H) использовалась модельная смесь, состоящая из смеси углеводов в тех же концентрациях (YNB-M). Параметры культивирования рассчитывали по формулам, приведенных в п. 2.2.6.

Определение массы клеток дрожжей

Массу клеток дрожжей определяли по соотношению между оптической плотностью культуры и массой сухих клеток для каждого штамма. Для этого при достижении экспоненциальной фазы роста на среде YNB-G измеряли ОП₅₉₅. После клетки переносили на стеклянный фильтр и сушили при 105 °С до постоянной массы. Взаимосвязь между оптической плотностью культуры и массой определяли путем расчета линейной регрессии ($R^2 > 0.98$).

Анализ параметров культивирования термотолерантных дрожжей в глубоких 96-луночных планшетах

Количественный анализ влияния температуры и состава среды на параметры культивирования термотолерантных дрожжей проводили путем культивирования в глубоких 96-луночных планшетах в системе Microflask (Applikon Biotechnology). Штаммы дрожжей предварительно выращивали в течение 16 ч в среде YNB-G с последующим отделением клеток центрифугированием при 500 × g в течение 10 мин. Осадок дважды промывали фосфатно-солевым буфером и растворяли в 1 мл среды YNB-G до конечной концентрации 5×10⁵ клеток в 1 мл. Дрожжи культивировали в закрытых планшетах при 400 об. мин⁻¹ в течение 10 ч при температуре 37-50 °С до достижения экспоненциальной фазы роста. Количество биомассы определяли по ОП₅₉₅, а количество глюкозы определяли количественно с использованием глюкозооксидазы (GAGO20, Sigma-Aldrich). Кинетические параметры культивирования рассчитывали, как в п. 2.2.6.

Анализ чувствительности дрожжей к ингибиторам ферментации

Для анализа влияния различных соединений на продукцию биомассы при культивировании на гидролизатах целлюлозы, проводили культивирование дрожжей в 96-луночных глубоких планшетах в системе Microflask (Applikon Biotechnology), как описано выше, в присутствии различных веществ-ингибиторов при 42 °С в течение 8 ч, 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. Значение IC₅₀ вычисляли из полулогарифмических графиков зависимости выхода биомассы в стационарной фазе роста как функции от концентрации ингибитора.

Культивирование термотолерантных дрожжей на среде YNB-H в колбах

Одну колонию ночной культуры дрожжей вносили в 10 мл среды YNB-M и культивировали в аэробных условиях при 42 °С и 250 об. мин⁻¹ до середины экспоненциальной фазы роста, соответствующей значению ОП 1.0 при 565 нм. Клетки отделяли центрифугированием при 500 *g* в течение 10 мин, осадок промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли 10 мл YNB-H и культивировали в герметичных объемом 25 мл при 100 об мин⁻¹ и 42 °С. В качестве контроля использовали среду YNB-M. Во время эксперимента прирост биомассы прирост биомассы оценивали по ОП₅₉₅, состав культуральной жидкости анализировали с помощью ВЭЖХ (п. 2.2.6).

2.2.6 Аналитические методы

Определение массы клеток микроводорослей

Вес биомассы определяли путем соотношения показателя ОП₆₅₀ соответствующей ему массой сухих клеток. Для построения калибровочной кривой при экспоненциальной фазе роста измеряли ОП₆₅₀, отбирали 10 мл жидкости (не менее 5 раз в течение фазы в трех повторностях), фильтровали через стеклянный фильтр, сушили при 105 °С 24 ч, затем взвешивали. Зависимость показателя ОП₆₅₀ клеток от массы образца определяли помощью линейной регрессии и выражали в г л⁻¹ с R² > 0.98.

Расчет кинетических параметров культивирования микроорганизмов

а) Скорость накопления биомассы (продуктов биосинтеза) рассчитывали по формуле:

$$V_p = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad (8)$$

где X_1 и X_2 концентрация биомассы или продукта биосинтеза в начальный (t_1) и конечный (t_2) период экспоненциальной фазы, соответственно; p – продукт, которым являются биомасса (b), липиды (l), углеводы (c), этанол (e).

б) Удельную скорость накопления биомассы (μ) рассчитывали в фазе экспоненциального роста по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (9)$$

в) Время удвоения биомассы рассчитывали по формуле:

$$T = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (10)$$

где Y_1 и Y_2 - концентрация компонента (продукта) в начальный период времени - t_1 и t_2 - конечный период времени, соответственно.

е) Выход продукта сбраживания (биомассы, этанола, янтарной кислоты) рассчитывали по формуле:

$$Y_{N/cc} = \frac{P}{S} \quad (11)$$

где P – концентрация продукта: N - концентрация биомассы (б) или этанола (е); S – концентрация сбраживаемых сахаров.

Выход этанола также рассчитывали в процентах от теоретического по формуле:

$$Y_e(\%) = \frac{Y_{e/cc}}{0.521} \times 100 \quad (12)$$

SDS-PAGE электрофорез белков

Электрофорез белков в 12% полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли [305] в камере для электрофореза «Ready Gel Cell 108BR» (40-60 мА) (BioRad, США).

Определение концентрации белка

Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [306] при длине волны 595 нм. Концентрацию белка рассчитывали исходя из данных калибровочной кривой, построенной по БСА в качестве стандарта.

Определение содержания нейтральных липидов в биомассе микроводорослей

Измерение содержания нейтральных липидов в биомассе проводили путем флуоресцентного окрашивания клеток микроводорослей красителем Нильским красным. Для этого 0.025 мл раствора Нильского красного в ацетоне (0.1 мг мл^{-1}) добавляли к 0.5 мл суспензии клеток нормализованной к значению $\text{ОП}_{650}=0.2$, содержащей 20% ДМСО. Смесь инкубировали 10 мин при 37°C в темноте, флуоресценцию анализировали на спектрофлуориметре Synergy HTX (Biotek) с использованием фильтров 525/579 нм. Значение относительной интенсивности флуоресценции (AU) получали путем вычитания значения автофлуоресценции неокрашенных клеток и среды из значения флуоресценции испытуемого образца.

Определение общего содержания липидов в биомассе микроводорослей (по Фолчу)

Для определения содержания общих липидов клетки осаждали центрифугированием при $3000 g$ в течение 10 мин, дважды промывали деионизированной водой, а затем лиофилизировали на лиофильной сушке FreeZone (Labconco) и взвешивали. Для экстрагирования липидов до 100 мг лиофилизированной биомассы водорослей растворяли в 2 мл смеси хлороформ: метанол (2:1). В смесь дополнительно добавляли 0.25 объема 0.9% раствора NaCl и интенсивно перемешивали. После расслоения фаз органическую фазу упаривали в токе азота, и образец взвешивали. Содержание липидов рассчитывали по формуле:

$$W_l = \frac{M_{\text{лип/фолч}}}{M_b} \quad (13)$$

где $M_{\text{лип/фолч}}$ – масса экстрагированных общих липидов (по методу Фолча) в мг, M_b – масса клеток микроводорослей по сухому веществу в мг.

Экстрагирование липидов микроводорослей с использованием ионных жидкостей

Сухую биомассу микроводорослей в количестве 1 г добавляли к 10 г ионной жидкости и инкубировали при 65°C при $1000 \text{ об. мин}^{-1}$ в течение 18 ч, липидную фракцию экстрагировали с использованием 10 мл *n*-гексана и отделяли центрифугированием. Гексановый слой упаривали в токе азота. Сухую массу липидной фракции определяли взвешиванием. Относительный выход липидов после экстракции рассчитывали по формуле:

$$Y_{\text{лип/фолч}}(\%) = \frac{M_{\text{эл}}}{M_{\text{лип/фолч}}} \times 100 \quad (14)$$

где $M_{\text{эл}}$ – масса экстрагированных альтернативным методом липидов (мг), $M_{\text{лип/фолч}}$ – масса липидов после экстракции по Фолчу (мг).

Анализ липидных экстрактов микроводорослей методом тонкослойной хроматографии

Анализ липидных экстрактов микроводорослей проводили методом ТСХ на пластинах с силикагелем 60G (Merck). Для этого 0.003 мл раствора липидного экстракта (10 мг в 1 мл

хлороформа) наносили на пластину, сушили на воздухе и помещали в камеру с *n*-гексаном, этиловым эфиром и уксусной кислотой (80:20:1). Смесь липидов (10 мг мл⁻¹), включая моно-, ди-, триацилглицериды и олеиновую кислоту (Sigma), использовали в качестве внутреннего стандарта. Положение пятен относительно стартовой позиции определяли после опрыскивания пластины 10% фосфорно-молибденовой кислотой и ее последующим нагревом при 120 °С в течение 15 мин.

Анализ состава жирных кислот микроводорослей

Для анализа состава жирных кислот микроводорослей использовали экстракт липидов, полученный по методу Фолча, который подвергали переэтерификации с метанолом для получения МЭЖК. Для проведения реакции 2 мг липидов добавляли к 0.3 мл 2% раствора H₂SO₄ в метиловом спирте и инкубировали в течение 1 ч 30 мин при 80 °С в атмосфере азота. В качестве внутреннего стандарта использовали гептадекановую кислоту (50 мг). Затем добавляли 0.3 мл 0.9% NaCl и 0.3 мл *n*-гексана, встряхивали и разделяли центрифугированием при 3000 *g* в течение 5 мин. Верхний гексановый слой использовали для ГХ-МС.

Состав МЭЖК анализировали с помощью ГХ-МС на приборе Agilent 7000В с ионизацией электронным ударом (70 эВ) на колонке ZB-WAX (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) с градиентом температуры от 100 - 260 °С со скоростью увеличения 12 °С мин⁻¹, температура инжектора - 260 °С, скорость потока газа-носителя (гелия) составляла 1.2 см³ мин⁻¹. Идентификацию соединений проводили с использованием библиотеки NIST11. Относительное количество индивидуальных жирных кислот рассчитывали как процентное соотношение к площади пиков всех жирных кислот.

Относительный выход МЭЖК рассчитывали по формуле:

$$Y_{\text{МЭЖК/фолч}}(\%) = \frac{M_{\text{МЭЖК}}}{M_{\text{лип/фолч}}} \times 100 \quad (15)$$

где $M_{\text{МЭЖК}}$ – масса МЭЖК (мг), $M_{\text{лип/фолч}}$ – масса липидов, полученных экстракцией методом Фолча.

Определение содержания белка в биомассе микроводорослей

Для экстракции белка использовали 10 мг лиофилизированной биомассы микроводорослей, к которой добавляли 10 мл 0.5 М раствора NaOH и инкубировали в течение 10 мин при 80 °С, а затем центрифугировали в течение 5 мин при 14000 × *g*. Содержание белка в полученном экстракте определяли с помощью набора Quick Start (Bio-Rad) по методу Бредфорда. Содержание белка в биомассе рассчитывали по формуле:

$$W_6 = \frac{M_p}{M_6} \quad (16)$$

где M_p – масса белка в биомассе в мг, M_6 – масса клеток микроводорослей по сухому веществу в мг.

Определение содержания углеводов в биомассе микроводорослей

Фенол-сернокислотный метод

К 0.1 мл образца добавляли 0.1 мл 5% раствора фенола, 0.5 мл концентрированной H_2SO_4 , затем инкубировали 30 мин при комнатной температуре, центрифугировали 5 мин при 12 000 об. мин⁻¹ и измеряли ОП₄₈₈. Концентрацию глюкозы в пробах определяли по стандартной калибровочной кривой в линейном диапазоне концентраций 10-100 мкг мл⁻¹, полученной с использованием стандартного раствора глюкозы.

Антроновый метод

10.0 мг лиофилизированной биомассы добавляли к 10 мл воды. К 1.0 мл образца добавляли к 4.0 мл раствора антрона (0.2% в концентрированной H_2SO_4) и нагревали до 100 °С в течение 10 мин. Образец охлаждали на льду и определяли концентрацию углеводов при 620 нм по калибровочной кривой в линейном диапазоне концентраций 10-100 мкг мл⁻¹, полученной с использованием стандартного раствора глюкозы.

Содержание углеводов рассчитывали по формуле:

$$W_y = \frac{M_y}{M_6} \quad (17)$$

где M_y – масса углеводов в мг, M_6 – масса клеток микроводорослей по сухому веществу в мг.

ВЭЖХ

Состав образцов гидролизатов и культуральной жидкости при сбраживании определяли с помощью ВЭЖХ с использованием системы Shimadzu LC-MS2020 с колонкой (Rezex ROA-Organic Acid H⁺ 300 × 7.8 мм, Phenomenex, США) и рефрактометрическим детектором RID-10A. Перед анализом зонды фильтровали через фильтр 0.22 мкм. В качестве подвижной фазы использовали серную кислоту (0.005 Н), Объем нанесения - 10 мкл, скорость потока подвижной фазы - 0.6 мл мин⁻¹, а температура колонки - 65 °С. Идентификацию пиков проводили путем сравнения со временем удерживания аналитических стандартов, количественное определение проводили с использованием калибровочных кривых для аналитических стандартов соединений.

Анализ метаболических профилей микроводорослей методом ГХ-МС

Для метаболического профилирования использовали 2 мл клеточной суспензии (с концентрацией клеток, нормализованной до $ОП_{759} = 0.5$) и центрифугировали в течение 1 мин при 4 °C при $3000 \times g$, осадок промывали 32.5% раствора метанола в воде (-20 °C). Затем к осадку добавляли 900 мкл смеси метанол: хлороформ (7:3, -20 °C) с 10 мкг рибитола в качестве внутреннего стандарта. Смесь обрабатывали ультразвуком (100 Вт, 35 кГц) в течение 1 ч при 4 °C. Затем добавляли 400 мкл деионизированной воды и полученную суспензию центрифугировали 3 мин при $13000 \times g$ при 4 °C. 300 мкл раствора высушивали в вакуумном концентраторе при 25 °C до постоянной массы.

Для дериватизации к высушенным образцам добавляли 20 мкл раствора гидрохлорида метоксиамина в 99% пиридине (20 мг мл⁻¹) и перемешивали при 30 °C в течение 90 мин. После этого добавляли 30 мкл раствора *N*-метил-*N*-(триметилсилил) трифторацетамида (MSTFA) с 1% триметилхлорсиланом и инкубировали течение 30 мин при 37 °C при постоянном перемешивании. Полученную смесь анализировали с помощью ГХ-МС с использованием Agilent 7000В с электронной ионизацией (70 эВ) на колонке HP5-MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) в следующих условиях: 60 °C 3 мин, затем увеличение температуры на 10 °C мин⁻¹ до 300 °C в течение 10 мин. Время анализа составило 37 мин, температура испарителя 300 °C, поток газа-носителя (гелий) 1 мл мин⁻¹. Идентификацию соединений (40-650 m/z^+) проводили согласно масс-спектральным библиотекам NIST11 и GOLM [307].

Анализ состава сред, используемых для культивирования микроводорослей

Анализ состава среды для культивирования проводили как для исходных сред (BBM, OECD, WW), так и для культуральной жидкости в процессе культивирования микроводорослей. В последнем случае для клетки отделяли центрифугированием при $3000 \times g$ в течение 5 мин, супернатант использовали для анализов.

Концентрацию NO_3^- в среде определяли согласно методу, описанному в [308], для чего измеряли $ОП_{220}$. Концентрацию NO_3^- в пробах определяли по стандартной кривой в линейном диапазоне концентраций 0.001-0.5 мМ, полученной с использованием стандарта $NaNO_3$.

Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли путем окисления органического компонента среды с использованием $K_2Cr_2O_7$. Для этого к 2 мл исследуемого образца добавляли 1 мл 0.1Н водного раствора $K_2Cr_2O_7$, 3 мл 2.5% раствора Ag_2SO_4 в $H_2SO_{4(к)}$, инкубировали течение 2 ч при 160 °C. ХПК в пробах определяли по $ОП_{600}$ и стандартной калибровочной кривой (20-200 мг O_2 мл⁻¹), полученной с использованием гидрофталата калия.

Концентрацию NH_4^+ определяли с помощью реактива Несслера как в работе [309]. Для этого к 1 мл образца добавляли 20 мкл 50% водного раствора тартрата натрия-калия, 20 мкл

реактива Несслера, смесь инкубировали в течение 10 мин. Концентрацию NH_4^+ рассчитывали по стандартной калибровочной кривой NH_4Cl (0-10 мг мл^{-1}) по ОП₄₁₄.

Определение концентрации PO_4^{3-} проводили по значению ОП₆₁₀, как описано в [310]. Для этого к 500 мкл образца добавляли 172 мкл раствора 28 мМ раствора $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, в 2.1 М растворе H_2SO_4 , 128 мкл 0.76 мМ раствора малахитового зелёного в 0.35% поливинилового спирте, инкубировали в течение 20 мин. Концентрацию PO_4^{3-} в пробах определяли по стандартной калибровочной кривой Na_3PO_4 (0-100 μM) при 600 нм.

Определение содержания анионов (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) проводили на ионном хроматографе 883 Basic IC Plus (Metrohm) с кондуктометрическим детектированием с использованием колонки Metrosep A Supp 5 150/4.0 и элюента, содержащего 3.2 мМ Na_2CO_3 , 1.0 мМ NaHCO_3 .

Анализ содержания малатиона методом ГХ-МС

Определение концентрации малатиона в растворах проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent 7000В с ионизацией электронным ударом (70 эВ), на колонке HP-5ms (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Нагрев колонки до 200 °С проводили в течение 3 мин, затем повышали температуру до 250 °С со скоростью 5 °С мин^{-1} . Скорость потока газа-носителя (гелий) составляла 1.2 мл мин^{-1} . Регистрацию хроматограммы проводили в режиме выделенных положительных ионов малатиона (m/z^+ 125) и дифенила (m/z^+ 154) в качестве внутреннего стандарта. Количество малатиона было вычислено из соотношения пиков малатион:дифенил.

Анализ продуктов реакции переэтерификации растительных масел с метанолом методом ГХ-МС

Для определения состава продуктов переэтерификации подсолнечного масла с метанолом 10 мкл образца растворяли в 600 мкл пиридина и добавляли внутренний стандарт (метиловый эфир лауриновой кислоты) в количестве 0.2 мг мл^{-1} . Состав МЭЖК определяли методом газовой хроматомасс-спектрометрии на приборе Agilent 7000В с ионизацией электронным ударом (70 эВ), на колонке ZB-WAX (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм). Температура испарителя составляла 250 °С. Нагрев колонки до 210 °С проводили в течение 5 мин, затем повышали температуру до 220 °С со скоростью 6 °С мин^{-1} . Общее время анализа составляло 12 мин. Скорость потока газа-носителя (гелий) – 1 $\text{см}^3 \text{мин}^{-1}$. Регистрацию хроматограммы проводили в режиме выделенных положительных ионов (m/z 214, 242, 294, 296, 298, 326). Идентификацию соединений проводили по библиотеке масс-спектров NIST'11 на основании анализа образца, записанного в тех же условиях, но в режиме сканирования в диапазоне 40-600 m/z^+ . В качестве стандарта использовали смесь со 100% переэтерификацией, полученную в результате химической кислотной переэтерификации с H_2SO_4 в качестве катализатора, как описано выше.

Расчет выхода метиловых эфиров жирных кислот ($Y_{\text{МЭЖК}}$) проводили по формуле:

$$Y_{\text{МЭЖК}}(\%) = \frac{S_x}{S_{100\%}} \times \frac{S_{st}}{S_{st-100\%}} \quad (18)$$

где S_x – суммарная площадь пиков анализируемой пробы; $S_{100\%}$ – суммарная площадь пиков контрольной смеси со 100% перэтерификацией; S_{st-x} – площадь пика внутреннего стандарта анализируемой пробы; $S_{st-100\%}$ – площадь пика внутреннего стандарта контрольной смеси со 100% перэтерификацией.

Анализ продуктов реакции перэтерификации масложировых смесей методом ВЭЖХ-МС

Состав триацилглицеридов в образцах определяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) с использованием жидкостного хроматографа HPLC-MS 2020 фирмы Shimadzu (Япония), совмещенным с квадрупольным масс-спектрометром фирмы Shimadzu (Япония) с однократной фокусировкой, на колонке PerfectSil Target ODS-3 C18 (MZ-Analysentechnik) размером 250 мм × 4.6 мм. Использовали химическую ионизацию при атмосферном давлении (APCI) и электрораспыление (ESI). Разделение на колонке проводили смесью метанол:изопропанол (70:30, об.%) в изократическом режиме. Скорость потока составляла 1 мл мин⁻¹, время анализа – 75 мин, температура испарителя 400 °С. Регистрацию хроматограммы проводили в режиме выделенных положительных ионов в диапазоне 100-1000 m/z^+ . Идентификацию триацилглицеридов осуществляли на основе молекулярных масс соответствующих псевдомолекулярных положительных ионов.

Для оценки состава триацилглицеридов использовали определение эквивалентных углеродных чисел (ECN) в соответствии с методом AOCS Ce 5b-89 [303]. В качестве стандарта использовали триолеин. Расчет проводили по формуле:

$$ECN = N(C) - 2 \times N(d), \quad (19)$$

где $N(C)$ – общее число атомов углерода в жирнокислотных остатках, $N(d)$ – количество двойных связей в жирнокислотных остатках.

Концентрацию триацилглицеридов (TG_i), площадь которых увеличилась в ходе реакции, рассчитывали по формуле:

$$TG_i = \frac{\sum S_{TG_i}}{\sum S_{TG}} \times 100\%, \quad (20)$$

где S_{TG_i} – площади пиков, которые увеличивались в ходе реакции, S_{TG} – общая площадь пиков в реакционной смеси.

Степень переэтерификации (ID) определяли по изменению в процентах площадей пиков триацилглицеридов, которые увеличивались в ходе реакции (TG_i), по отношению к их значению в начале реакции (TG_{i0}) (Формула 20):

$$ID = \frac{TG_i}{TG_{i0}} \times 100\%, \quad (21)$$

Определение температуры плавления масел

Температуру плавления масел определяли согласно методу AOCS Cc.3.25 [303]. Капиллярную трубку с внутренним диаметром 1 мм заполняли образцом расплавленного масла и охлаждали до затвердения масла при 4 °C в течение 1 ч. Далее капилляр с маслом погружали в водяную баню с дистиллированной водой при перемешивании и нагревании воды со скоростью 2 °C в мин. Температуру плавления регистрировали по началу движения масла по капиллярной трубке.

2.2.7 Статистические методы

Статистический анализ экспериментальных данных

Статистический анализ экспериментальных данных проводили с использованием языка R (версия 4.0.5), Microsoft Excel и OriginPro 8.5.

Использовали следующие методы статистического анализа:

Одно- и многофакторный дисперсионный, а также регрессионный анализ ($\alpha = 0.05$). При необходимости проводили апостериорный анализ для множественных сравнений с поправкой Бонферрони (менее или равно 8 сравнений) или тестом Тьюки (более 9 сравнений) [311].

Z-оценка для анализа отличия от среднего при первоначальном отборе штаммов по продукции биомассы, липидов и углеводов ($\alpha = 0.05$).

t-тест Стьюдента для проверки равенства средних значений в двух выборках ($\alpha = 0.05$).

Все эксперименты (за исключением RSM) были выполнены в трех экземплярах, и данные выражены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Статистический анализ данных при метаболическом профилировании

Перед статистическим анализом все площади пиков в каждом профиле были нормализованы относительно внутреннего стандарта (рибитол). Анализ проводился с помощью пакета MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) [312]. Набор данных для анализа предварительно нормализовали с использованием суммарной интенсивности пиков в каждом образце и центрировали данные по среднему значению. Для уменьшения размерности данных, применяли анализ PCA и PLS-DA с использованием 7-кратного метода внутренней перекрестной проверки, с последующим расчетом значений R^2 и Q^2 , которые определяют качество модели. Для

всех идентифицированных метаболитов были рассчитаны значения t-критерия Стьюдента для сравнения уровней метаболитов в двух фазах роста, определена кратность изменения и VIP (важность независимой переменной в проекции). Для анализа наиболее нарушенных метаболических циклов метаболиты с ($p < 0.05$ и $VIP > 1$) использовали пакет MetaboAnalyst 5.0, позволяющий анализировать метаболиты с использованием обогащения по метаболическим путям и анализа топологии путей в соответствии с базой данных метаболизма KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Циклы с $p < 0.05$ считались статистически значимо обогащенными.

Статистический анализ качества моделей, полученных методом RSM

Данные всех экспериментов центрального композиционного плана использовались для определения коэффициентов регрессии квадратичной полиномиальной модели и анализа F -критерия. В процессе анализа использовали дисперсионный анализ, регрессионный анализ и построение графиков поверхности. Точность полученной полиномиальной модели оценивалась с помощью коэффициента R^2 .

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

3.1 Выделение штаммов микроводорослей из природных источников

Для выделения штаммов микроводорослей были отобраны образцы почвы и воды в Новосибирской области, Алтайском крае, Камчатском крае, Кемеровской области, Краснодарском крае, Республике Казахстан [313]. Для получения накопительных культур и последующего выделения из них чистых культур использовали среду BBM, как одну из наиболее часто применяемых сред для выделения микроводорослей [314]. Из-за высокого уровня контаминации ряда образцов побочной микрофлорой (преимущественно, бактериями) штаммы A-1113, A-1115, A-1138, A-1162, A-1144, A-1135, A-1176, A-1182, A-1123, A-1139, A-1175, A-1167 дополнительно очищали с использованием метода проточной цитофлуориметрии [299]. Дополнительно для увеличения количества используемых штаммов микроводорослей (за счет добавления других видов микроводорослей), в работе использовали штаммы, полученные из коллекции Национального института экологических исследований (NIES, Цукуба, Япония) и коллекции микроводорослей и цианобактерий ИФР РАН (IPPAS, Москва, Россия).

После выделения чистых культур проводили их идентификацию по последовательности района 18S рРНК - ITS1 - 5.8S рРНК - ITS2. Аналогично уточняли таксономическую принадлежность штаммов, полученных из коллекций микроводорослей. Для работы использовали штаммы, стабильно поддерживавшиеся в культуре в лабораторных условиях. Список штаммов, использованных в работе, приведен в Таблице 7.

Таблица 7 – Список штаммов микроводорослей, использованных в работе

№	Штамм	Источник	Среда	Идентичность с последовательностями из базы GenBank
1	<i>Auxenochlorella protothecoides</i> NIES-2164	Коллекция NIES	BBM с 1% пептона	100% (LN610704.1, AB488569.1)
2	<i>Botryococcus</i> sp. A-1113	Вода из пресного озера, Алтайский край	BBM	99% (AJ581914.1)
3	<i>Botryococcus</i> sp. A-1115	Вода из пресного озера, Алтайский край	BBM	100% (GU250969.1)
4	<i>Botryococcus</i> sp. A-1138	Вода из пресного озера, Алтайский край	BBM	99% (GU250969.1)
5	<i>Botryococcus</i> sp. A-1162	Лесная почва, Новосибирская область, Россия	BBM	99% (AJ581914.1)

6	<i>Bracteacoccus occidentalis</i> A-1144	Почва и вода, берег реки Ур, Кемеровская область край	BBM	99% (JQ259951.1)
7	<i>Chlorella sorokiniana</i> A-1135	Песок, Побережье Черного моря, Краснодарский край, Россия	BBM	99% (FR865683.1)
8	<i>Chlorella sorokiniana</i> IC-62	Почва, берег р. Иртыш, г. Павлодар, Казахстан	BBM	99% (AB731602.1)
9	<i>Chlorella sorokiniana</i> IPPAS C-1	Коллекция IPPAS	Тамия	99% (MF101221.1)
10	<i>Chlorella</i> sp. A-1176	Почва, Новосибирская область, Россия	BBM	99% (FR865683.1)
11	<i>Chlorella</i> sp. A-1182	Вода из водохранилища, Новосибирская область, Россия	BBM	99% (FR865683.1)
12	<i>Chlorella</i> sp. IC-82	Песок, берег реки Обь, Новосибирская область	BBM	99% (AY195981.1)
13	<i>Chlorella vulgaris</i> A-1123	Почва и вода, горячий источник у подножия вулкана Мутновский, Камчатский край	BBM	99% (FR865683.1)
14	<i>Desmodesmus</i> sp. IC-10	Почва, Новосибирская область, Россия	BBM	99% (MF327580.1)
15	<i>Desmodesmus</i> sp. IC-75	Вода из пресного озера, Алтайский край	BBM	99% (AB917128.1)
16	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	Вода, побережье Черного моря, Краснодарский край, Россия	BBM	99% (KT883906.1)
17	<i>Micractinium</i> sp. IC-76	Песок, берег Новосибирского водохранилища, Новосибирская область	BBM	99% (KM243325.1)
18	<i>Nannochloris bacillaris</i> A-1139	Лесная почва, Новосибирская область, Россия	BBM	99% (AB080300.1)
19	<i>Parachlorella kessleri</i> IC-11	Активный ил городских очистных сооружений, г. Омск, Россия	Тамия	99% (KX021356.1)
20	<i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS C-15	Коллекция IPPAS	Тамия	99% (KX021356.1)
21	<i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS C-2	Коллекция IPPAS	Тамия	99% (KX021356.1)
22	<i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS C-9	Коллекция IPPAS	Тамия	99% (KX021356.1)
23	<i>Parachlorella kessleri</i> IPPAS S-333	Коллекция IPPAS	Тамия	99% (KX021356.1)
24	<i>Parachlorella</i> sp. IC-23	Вода из пресного озера, Алтайский край	BBM	99% (KU990883.1)

25	<i>Scenedesmus abundans</i> A-1175	Вода из озера Драга, Кемеровская область	BBM	100% (X73995.1)
26	<i>Scenedesmus obliquus</i> A-1167	Побережье Черного моря, Краснодарский край, Россия	BBM	100% (FR865738.1)
27	<i>Tetradesmus obliquus</i> NIES-2280	Коллекция NIES	BG-11	100% (MK041642.1)

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

Первоначально для выбора штаммов микроводорослей в качестве продуцентов биомассы с высоким содержанием отдельных компонентов (нейтральных липидов или углеводов) проводили культивирование с использованием сред различного состава. Для этого использовали базовую среду BBM, OECD (моделирующую состав муниципальных сточных вод) [296] и WW (стерилизованные муниципальные сточные воды). Применение выбранных сред позволяет использовать как модельные, так и реальные субстраты, содержащие компоненты, которые могут ингибировать деление клеток микроводорослей (например, тяжелые металлы [315], а также различные токсические вещества, например, пестициды [316]), идентификация которых может быть затруднительной. Анализ состава сред (п. 2.2.6), использованных для культивирования микроводорослей, приведен в Таблице 8. Как видно из приведенных данных, базовая среда BBM достоверно ($p < 0.001$, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой Холма-Бонферрони) отличается от OECD и WW отсутствием NH_4^+ , а также присутствием большой концентрации ионов NO_3^- и PO_4^{3-} . Среда WW достоверно ($p < 0.001$) отличается от модельной среды OECD меньшей концентрацией PO_4^{3-} , при этом концентрация SO_4^{2-} и Cl^- в среде WW значительно больше ($p < 0.001$). Показатель ХПК в

Таблица 8 – Анализ состава сред, использовавшихся в работе для культивирования микроводорослей

Параметр	Концентрация, мг л ⁻¹		
	BBM	OECD	WW
NH_4^+	0	$56.5 \pm 2.2^{***}$	$27.7 \pm 1.3^{***}$
NO_3^-	$293.7 \pm 19.3^{***}$	0.1 ± 0	0.2 ± 0
PO_4^{3-}	$104.8 \pm 11.5^{***}$	$35.4 \pm 0^{***}$	$1.8 \pm 0.1^{***}$
SO_4^{2-}	$29.6 \pm 1.6^{***}$	$2.1 \pm 0.1^{***}$	$10.7 \pm 1.0^{***}$
Cl^-	14.9 ± 3.0	9.4 ± 0.9	$139.0 \pm 5.0^{***}$
ХПК (O_2)	0	$84.7 \pm 3.3^{***}$	$161.0 \pm 5.0^{***}$

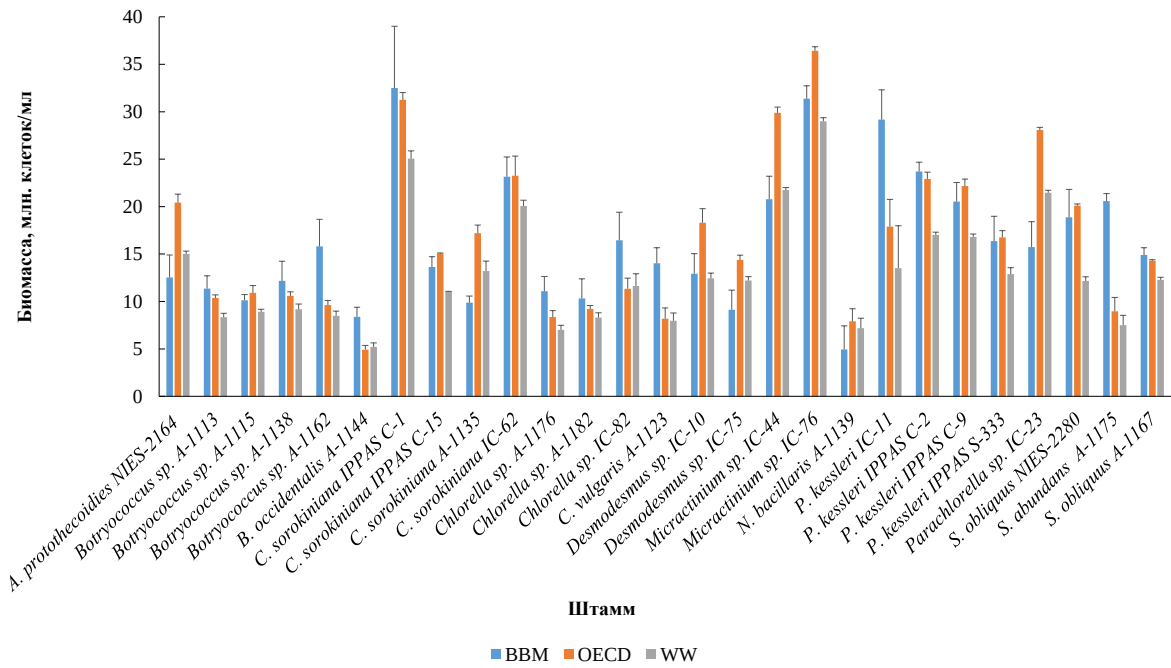
Наблюдаются достоверные ($^{***} p < 0.001$) различия по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой Холма-Бонферрони

среде WW почти в два раза больше, чем в среде. Таким образом, все три используемые среды имеют свои особенности, связанные с их составом, что определяет различные условия для культивирования микроводорослей. Результаты первичного отбора штаммов микроводорослей по способности накапливать биомассу (из расчета количества клеток), нейтральные липиды (по данным флуоресцентной микроскопии после окрашивания красителем Нильский красный) и углеводы в стационарной фазе роста в микропланшетах на трех культуральных средах приведены на Рисунке 1. Из представленных данных видно, что у большей части штаммов наблюдается тенденция к снижению накопления биомассы на среде WW. Это может быть связано с относительно низким содержанием легкоусвояемых соединений азота в среде (NH_4^+ и NO_3^- , Таблица 8). Также стоит отметить, что у штаммов с высоким содержанием липидов (*C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76) наблюдается тенденция к увеличению накопления нейтральных липидов на среде WW по сравнению со средой BBM.

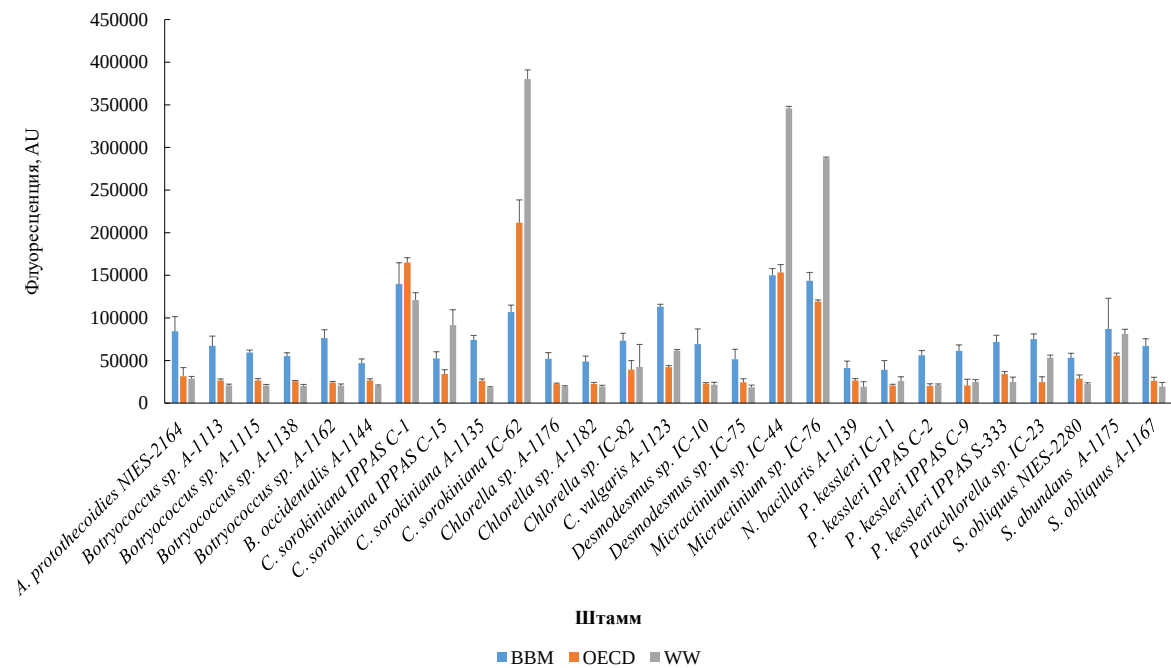
Для более полной оценки результатов скрининга и селекции штаммов для проведения дальнейших исследований была проведена z-оценка, позволяющая отобрать образцы со статистически значимым отличием от среднего по выборке (Приложение А), среди которых были отобраны значения ($p < 0.05$) отличающихся не менее, чем на двух средах для одного из измеряемых параметров. Дополнительно для образцов с $z \geq 1.65$ был проведен однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой Холма-Бонферрони (Приложение А). Выявлено, что достоверно высоким ($p < 0.05$, по данным z-оценки при критическом значении $Z > 1.65$) накоплением биомассы по сравнению с другими штаммами на всех средах для культивирования отличаются штаммы *C. sorokiniana* IPPAS C-1 и *Micractinium* sp. IC-76. Для среды BBM высокий уровень накопления биомассы был отмечен в первую очередь для *C. sorokiniana* IPPAS C-1 и штаммов, относящихся к р. *Micractinium*. На среде WW нейтральные липиды в стационарной фазе роста в основном накапливались у *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76. Анализ содержания углеводов в биомассе выявил, что на всех трех средах наибольшей эффективностью отличался штамм *P. kessleri* IC-11, на средах BBM и OECD также высоким содержанием углеводов обладали *P. kessleri* IPPAS C-2 и *P. kessleri* IPPAS C-9. На среде WW помимо этих штаммов дополнительно высоким уровнем углеводов отличался штамм *P. kessleri* IPPAS C-2.

Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным множественным сравнением с поправкой Холма-Бонферрони для образцов с $Z > 1.65$ (Приложение А) выявил, что для среды BBM для штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1 с наибольшим уровнем накопления липидов не наблюдается статистически значимых различий ($p > 0.05$) по уровню накопления биомассы с

А.



Б.



В.

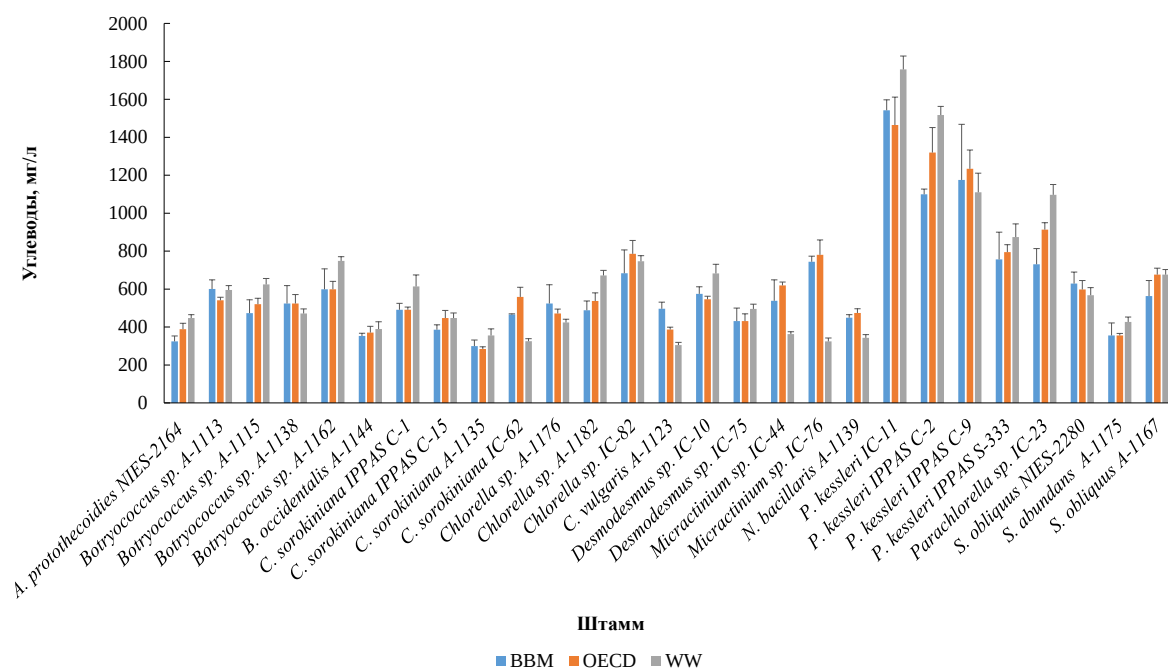


Рисунок 1 – Первичный отбор штаммов микроводорослей по накоплению биомассы, нейтральных липидов и углеводов на средах BBM, OECD и WW. (А) Биомасса, (Б) Нейтральные липиды, (В) Углеводы. Условия культивирования: объем среды 200 мкл, температура 28 ± 1 °С, освещенность 2000 лк, 16 ч световая /8 ч темновая фаза

другими штаммами с $Z > 1.65$. Статистически значимые отличия по накоплению биомассы с поправкой Холма-Бонферрони ($p < 0.05$) были выявлены лишь в отношении *Micractinium* sp. IC-76 при культивировании на среде OECD. Аналогично при анализе накопления нейтральных липидов статистически значимые различия ($p < 0.05$) с другими штаммами были отмечены только для *C. sorokiniana* IC-62 (среда OECD) и *Micractinium* sp. IC-76 (среда WW). Достоверные отличия ($p < 0.05$) по концентрации углеводов с другими штаммами были выявлены для штаммов с высоким уровнем углеводов: *P. kessleri* IC-11 (среды BBM и WW), а также для *P. kessleri* IPPAS C-2 (среда WW).

Таким образом, основываясь на статистических данных, при культивировании в среде BBM у штаммов с высоким уровнем накопления биомассы и липидов ($Z > 1.65$) в основном не было обнаружено достоверных различий в этих параметрах ($p > 0.05$, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным анализом с поправкой Холма-Бонферрони). Стоит отметить, что при культивировании в среде WW достоверно высоким уровнем накопления липидов ($p < 0.05$) отличался штамм *Micractinium* sp. IC-76, однако для выбора штамма с высоким накоплением и биомассы, и липидов далее требовалось уточнение полученных результатов путем анализа их параметров при культивировании в колбах. Для выбора оптимального

продуцента липидов необходимы дополнительные исследования свойств штаммов микроводорослей, в том числе штаммы *P. kessleri* IC-11 и *P. kessleri* IPPAS C-2 необходимо дополнительно протестировать на накопление углеводов, чтобы выявить наиболее эффективный штамм-продуцент углеводов.

Для дальнейших исследований проводились работы по направлениям, представленным в Таблице 9. На начальном этапе были протестированы штаммы, отличающиеся высоким уровнем накопления биомассы и достоверно высоким уровнем накопления липидов (*Micractinium* sp. IC-

Таблица 9 – Подходы к изучению свойств штаммов микроводорослей, использованные в работе

№	Направление работы	Штаммы	Примечание
1	Исследование состава биомассы микроводорослей, продуцирующих нейтральные липиды при культивировании на среде ВВМ, для выявления штаммов с высоким содержанием липидов с высокой степенью насыщенности	<i>Micractinium</i> sp. IC-76, <i>Micractinium</i> sp. IC-44, <i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1, <i>C. sorokiniana</i> IC-62	Продуцируют наибольшее количество нейтральных липидов
		<i>C. vulgaris</i> A1123, <i>S. abundans</i> A1175, <i>C. sorokiniana</i> A1135, <i>S. obliquus</i> A1167, <i>Botryococcus</i> sp. A1162	Дополнительно используются для поиска штаммов с высоким содержанием насыщенных липидов
2	Исследование факторов, влияющих на индукцию синтеза нейтральных липидов и углеводов у микроводорослей в различных условиях	<i>C. sorokiniana</i> IC-62, <i>Micractinium</i> sp. IC-76, <i>Micractinium</i> sp. IC-44, <i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	Продуцируют наибольшее количество нейтральных липидов
		<i>P. kessleri</i> IC-11, <i>P. kessleri</i> IPPAS C-2, <i>P. kessleri</i> IPPAS C-9, <i>P. kessleri</i> IPPAS S-333, <i>A. protothecoides</i> NIES-2164, <i>S. obliquus</i> NIES-2280, <i>Desmodesmus</i> sp. IC-10, <i>Desmodesmus</i> sp. IC-75, <i>Parachlorella</i> sp. IC-23, <i>Chlorella</i> sp. IC-82	Характеризуются низким содержанием нейтральных липидов и высоким - углеводов
3	Наработка партий биомассы штаммов с высоким содержанием целевого компонента биомассы (липидов или углеводов)	Отбор среди протестированных штаммов	Выбор штаммов микроводорослей для получения образцов биомассы с высоким содержанием липидов или углеводов по данным исследований

76, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IPPAS C-1), а также иные штаммы для выявления штаммов с высоким содержанием насыщенных и мононенасыщенных липидов, что в дальнейшем позволит на их основе получать биотопливо высокого качества (удовлетворяющего стандарту EN 14214), в том числе более устойчивое к окислению [317]. Далее были изучены факторы, влияющие на индукцию синтеза нейтральных липидов у исследуемых штаммов микроводорослей. Поскольку было выявлено, что уровень накопления нейтральных липидов у микроводорослей отличается при культивировании штаммов на разных средах, то в экспериментах были использованы как базовая среда BBM, так и среда WW, по составу наиболее близкая к реальному субстрату, что необходимо для дальнейшего применения исследуемых штаммов в процессах водоочистки. В качестве основных факторов, влияющих на уровень накопления нейтральных липидов, предполагается оценить следующие параметры: концентрация соединений азота и фосфора, а также солей в среде, уровень освещенности. Кроме того, необходимо оценить влияние отдельных факторов на накопление липидов у низко- и высоколипидных штаммов микроводорослей, а также исследовать эффект переключения метаболизма с синтеза углеводов на синтез липидов. Анализ факторов, влияющих на накопление нейтральных липидов у штаммов с различным уровнем их накопления в биомассе, позволит в рамках дальнейших работ разработать подходы к увеличению содержания липидов у разных микроводорослей. По результатам проведенных исследований будут отобраны штаммы, эффективно продуцирующие биомассу и липиды или углеводы, что позволит использовать их для наработки сырья для получения ценных веществ.

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

Для поиска штаммов микроводорослей, продуцирующих липиды с высоким содержанием насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, позволяющих получать высококачественное биодизельное топливо, был проведен анализ свойств микроводорослей при их культивировании в колбах. В исследовании использовали штаммы, которые по данным первичного отбора продемонстрировали высокий уровень накопления биомассы и липидов, а также дополнительные штаммы. В качестве среды для культивирования использовали базовую среду BBM (фотоавтотрофный режим культивирования), результаты приведены на Рисунках 2-3, в Таблице 10.

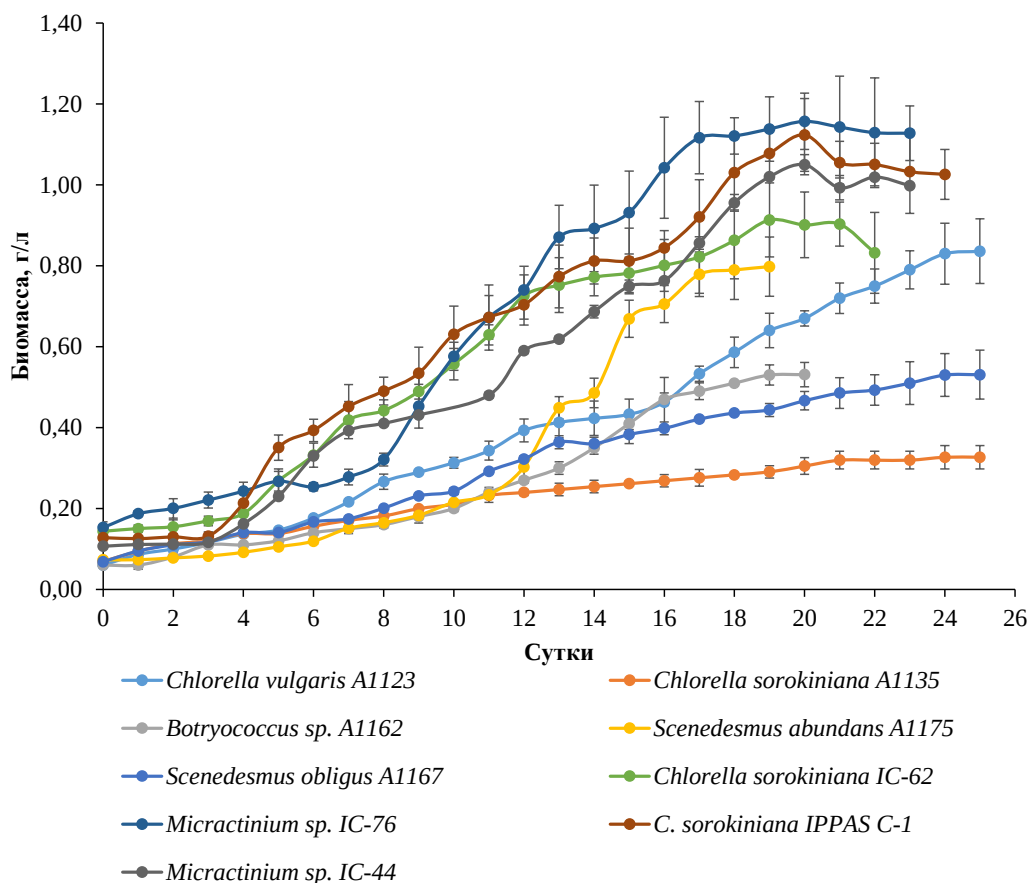


Рисунок 2 – Накопление биомассы штаммами микроводорослей в среде ВВМ при культивировании в колбах. Условия культивирования: среда ВВМ, объем среды 100 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

Наибольшим и быстрым накоплением биомассы при культивировании штаммов микроводорослей в колбах отличались штаммы *Micractinium* sp. IC-76, *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IC-62, *S. abundans* A1175. Из этих штаммов *S. abundans* A1175 обладал наибольшей удельной скоростью накопления биомассы 0.20 ± 0.01 сут⁻¹ и скоростью накопления биомассы 73.82 ± 4.53 мг л⁻¹ сут⁻¹ (Таблица 10), а штамм *C. sorokiniana* A1135 - наименьшей (0.05 ± 0.01 сут⁻¹ и 10.60 ± 0.34 мг л⁻¹ сут⁻¹, соответственно). Высокий уровень накопления биомассы для пяти штаммов соответствовал быстрому снижению концентрации NO₃⁻ в среде (Рисунок 3). Содержание нитратов в среде в конце культивирования оказалось небольшим для всех штаммов, за исключением *C. sorokiniana* A1135 (содержание NO₃⁻ на 25 сутки составило 0.08 г л⁻¹), что связано с низким уровнем накопления биомассы у этого штамма.

Анализ накопления нейтральных липидов при культивировании на среде ВВМ в колбах (Рисунок 4) выявил, что наибольшим достоверным ($p < 0.001$, парный двухвыборочный t-тест) уровнем накопления в стационарной фазе роста обладали штаммы *Micractinium* sp. IC-76,

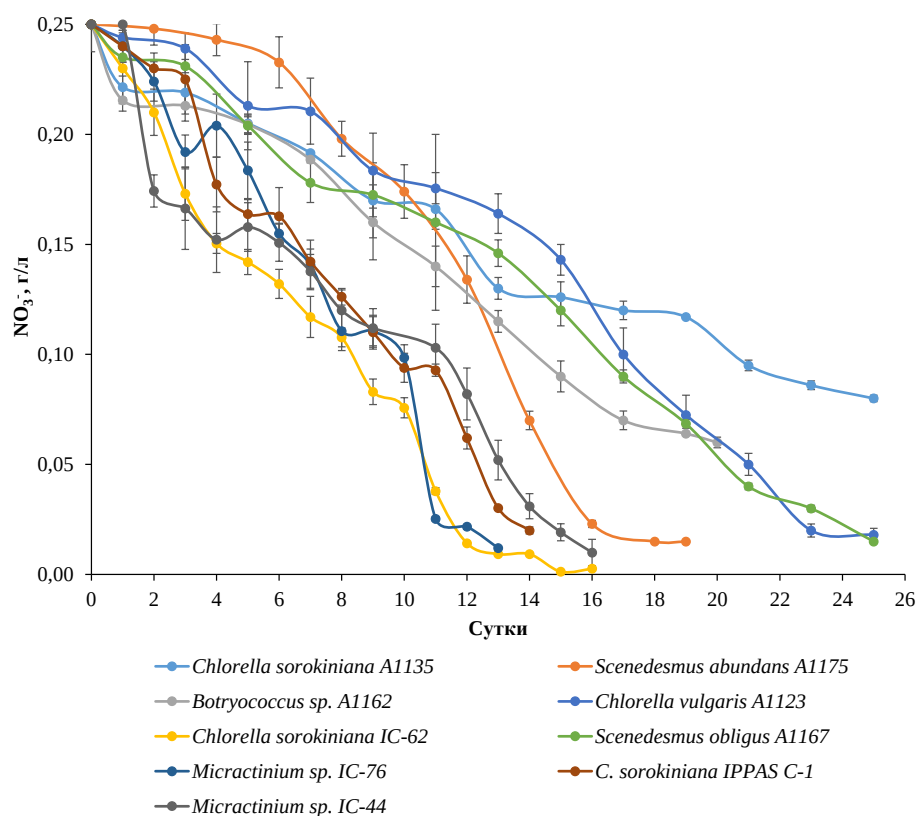


Рисунок 3 – Концентрация NO_3^- при культивировании штаммов микроводорослей в среде BBM в колбах. Условия культивирования: среда BBM, объем среды 100 мл, температура $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 2000 лк

Micractinium sp. IC-44 и *C. vulgaris* A1123, причем у последнего штамма накопление нейтральных липидов начиналось позже по сравнению с остальными. Измерение количества общих липидов (по данным гравиметрического анализа) выявило, что наибольшей $V_{\text{л}}$ ($32.8 \pm 1.5 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) обладал *S. abundans* A1175 (Таблица 10). Штаммы, обладавшие высокой скоростью накопления биомассы, также показали высокую скорость накопления липидов. Таким образом, в качестве потенциальных продуцентов липидов при культивировании в среде BBM могут использоваться штаммы *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *S. abundans* A1175.

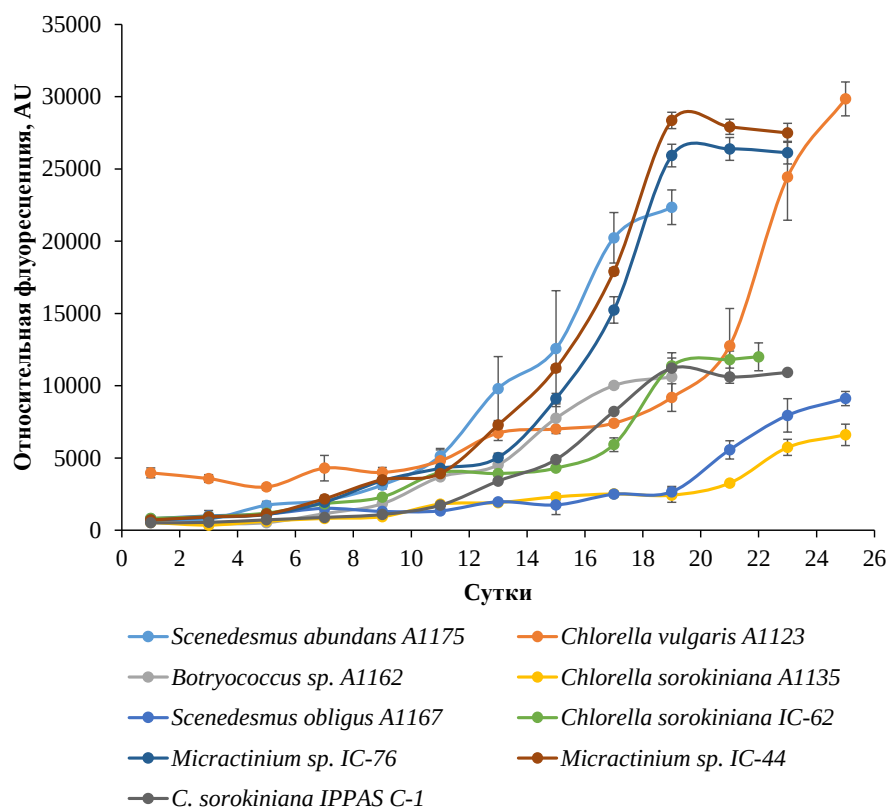


Рисунок 4 – Накопление нейтральных липидов при культивировании штаммов микроводорослей на среде BBM в колбах. Условия культивирования: среда BBM, объем среды 100 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

Анализ состава жирных кислот, входящих в состав биомассы штаммов микроводорослей, для которых был показан высокий уровень накопления липидов при культивировании в колбах в среде BBM, приведен на Рисунке 5. Выявлено, что состав жирных кислот в экспоненциальной и в стационарной фазах в ряде случаев обладает статистически значимыми различиями (по данным двухвыборочного одностороннего t-теста), за исключением штамма *S. abundans* A1175, для которого не было выявлено различий в уровне накопления ненасыщенных и насыщенных жирных кислот.

В экспоненциальной фазе роста наибольшую долю среди жирных кислот, входящих в состав биомассы штаммов, составили C16:0, C18:0, C18:1, в стационарной фазе также наблюдалось увеличение содержания C18:2. Для штамма *Micractinium* sp. IC-76 были выявлены достоверные отличия ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) в накоплении C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 и C18:2 ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест); в накоплении C16:0, C18:0 – *S. obliquus* A1167 и *Botryococcus* sp. A1162; в накоплении C18:0 и C18:1 – *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IPPAS C-1; по уровню C18:0 – все штаммы, за исключением *C. sorokiniana* A1135.

Таблица 10 – Анализ параметров культивирования штаммов микроводорослей в среде ВВМ в колбах

Штамм	μ , сут ⁻¹	T, сут ⁻¹	V_6 , мг л ⁻¹ сут ⁻¹	V_L , мг л ⁻¹ сут ⁻¹
<i>C. vulgaris</i> A1123	0.09 ± 0.01	8.0 ± 0.7	35.8 ± 0.24	13.7 ± 0.2
<i>S. abundans</i> A1175	0.20 ± 0.01	3.6 ± 0.5	73.82 ± 4.53	32.8 ± 1.5
<i>C. sorokiniana</i> A1135	0.05 ± 0.01	13.5 ± 0.1	10.60 ± 0.34	3.3 ± 0.1
<i>S. obliquus</i> A1167	0.07 ± 0.01	9.5 ± 1.0	20.85 ± 0.71	8.6 ± 0.7
<i>Botryococcus</i> sp. A1162	0.11 ± 0.01	6.1 ± 0.5	29.61 ± 1.46	9.9 ± 0.3
<i>C. sorokiniana</i> IC-62	0.14 ± 0.01	4.8 ± 0.3	60.18 ± 0.48	27.6 ± 1.3
<i>Micractinium</i> sp. IC-76	0.15 ± 0.01	4.5 ± 0.2	67.41 ± 0.33	29.1 ± 1.7
<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	0.11 ± 0.01	6.3 ± 0.6	53.70 ± 0.37	23.5 ± 2.1
<i>Micractinium</i> sp. IC-44	0.09 ± 0.01	7.4 ± 0.4	69.3 ± 0.45	30.6 ± 0.9

Условия культивирования: среда ВВМ, объем среды 100 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

Анализ различий в составе жирных кислот показал, что в стационарной фазе роста наблюдалось небольшое статистически значимое ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) разнонаправленное изменение содержания C16:0 у *S. obliquus* A1167, *Botryococcus* sp. A1162, *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76. Содержание C16:1 также изменялось у *C. vulgaris* A1123, *S. obliquus* A1167, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1. Достоверное ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) снижение содержания C18:0 в стационарной фазе было зафиксировано для всех штаммов, кроме *C. sorokiniana* A1135. При этом у *C. vulgaris* A1123 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1, было выявлено наибольшее изменение содержания этой жирной кислоты при смене фаз роста. Для штаммов *C. sorokiniana* A1135, *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1 было отмечено высокое содержание C18:1 в стационарной фазе роста по сравнению с экспоненциальной ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест). Это коррелирует с данными работы [318], где было показано, что штамм *Chlorella* UMACC050 накапливал C16:0, C18:0 и C18:1 при снижении концентрации соединений азота в среде. В другом исследовании при культивировании микроводоросли *Micractinium* G4-9 на среде BG-11 основными жирными кислотами в стационарной фазе роста являлись C16:0 (15.34%), C18:2 (21.65%) и C18:3 (23.95%), что близко к аналогичным значениям, полученным для *Micractinium* sp. IC-76 в этой работе (для C16:0 $14.7 \pm 0.5\%$, для C18:2 $27.4 \pm 2.4\%$), однако для IC-76 наблюдалось значительно ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) меньшее содержание C18:3 ($8.1 \pm 0.4\%$), а также в биомассе была обнаружена C18:0 ($14.6 \pm 0.5\%$).

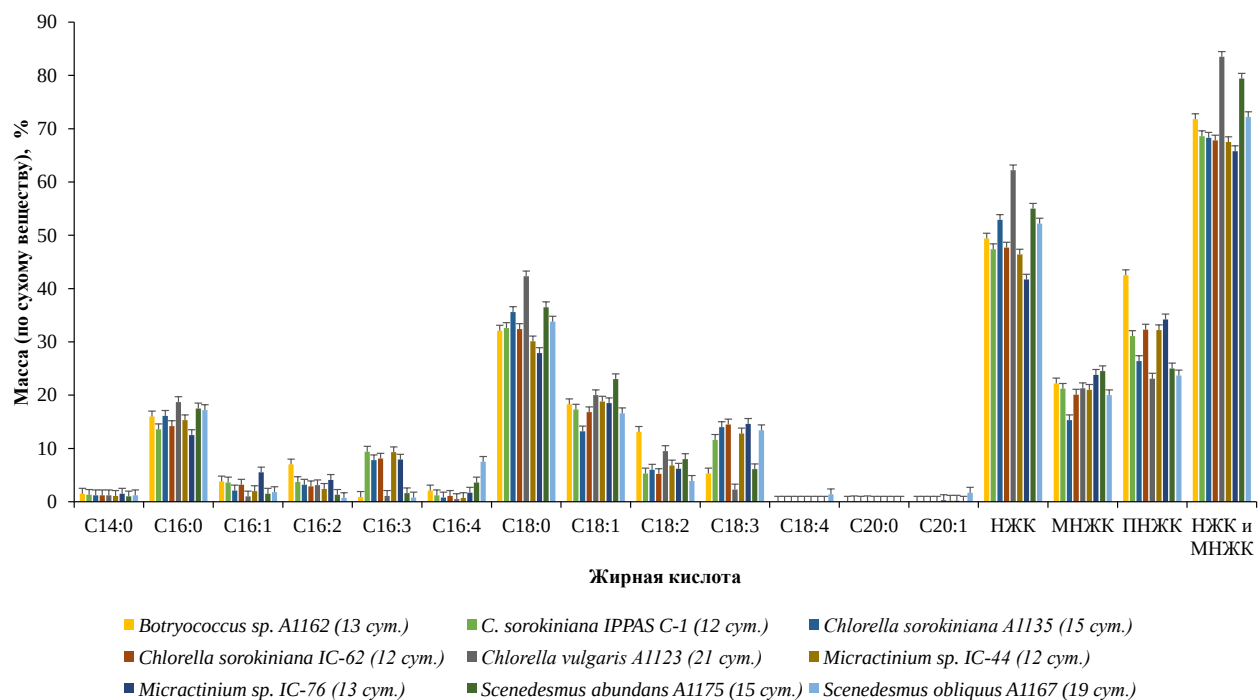
Суммарное содержание НЖК достоверно ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) различалось в стационарной фазе роста для всех штаммов, протестированных в ходе работы, кроме *S. abundans* A1175. Суммарное содержание НЖК и МНЖК достоверно

различалось между фазами роста у *C. vulgaris* A1123, *S. obliquus* A1167, *Botryococcus* sp. A1162, *Micractinium* sp. IC-76 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест). Таким образом, наибольшим достоверным уровнем отличий в профиле жирных кислот в экспоненциальной и стационарной фазах роста обладали штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1, в то время как *S. abundans* A1175 не обладал такими отличиями. Анализ состава жирных кислот, результаты которого приведены на Рисунке 5, показывает, что в стационарной фазе роста у всех штаммов наблюдается снижение содержания НЖК по сравнению с экспоненциальной, наибольшим образом ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) это выражено у *S. obliquus* A1167, меньше – у *C. sorokiniana* A1135. Это соответствует данным, полученным в работе [319], где было продемонстрировано, что содержание НЖК у *Chlorella* UMACC187 было достоверно выше в стационарной фазе роста по сравнению с экспоненциальной. Аналогично для штамма *C. sorokiniana* A1135 было наименьшим образом выражено изменение содержания МНЖК, для этого штамма и штаммов *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IPPAS C-1 в стационарной фазе роста суммарное количество МНЖК было достоверно ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) выше, чем в экспоненциальной фазе роста. Наибольшие достоверные отличия между фазами роста в суммарном содержании НЖК и МНЖК отмечены для *C. vulgaris* A1123, наименьшие – для *Micractinium* sp. IC-76. Таким образом, изменение состава жирных кислот при переходе от экспоненциальной фазы роста к стационарной в целом коррелировало с данными литературы и сопровождалось снижением количества НЖК и повышением ПНЖК.

При сравнении штаммов по суммарному уровню накопления НЖК и МНЖК среди них не было выявлено статистически значимых различий ($p > 0.05$ по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с тестом Тьюки). Штамм *S. abundans* A1175 обладал относительно высоким уровнем накопления НЖК и МНЖК ($72.8 \pm 5.8\%$). По данным теста Тьюки также выявлено, что штаммы *C. vulgaris* A1123, *S. abundans* A1175, *C. sorokiniana* A1135 и *S. obliquus* A1167 обладают достоверным ($p < 0.01$) отличием от остальных по уровню накопления НЖК.

Для уточнения состава биомассы протестированных штаммов в стационарной фазе роста был проведен анализ содержания белка, углеводов и липидов. Результаты приведены в Таблице 11. 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 ($30.8 \pm 3.3\%$). Однако между ними по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений

А.



Б.

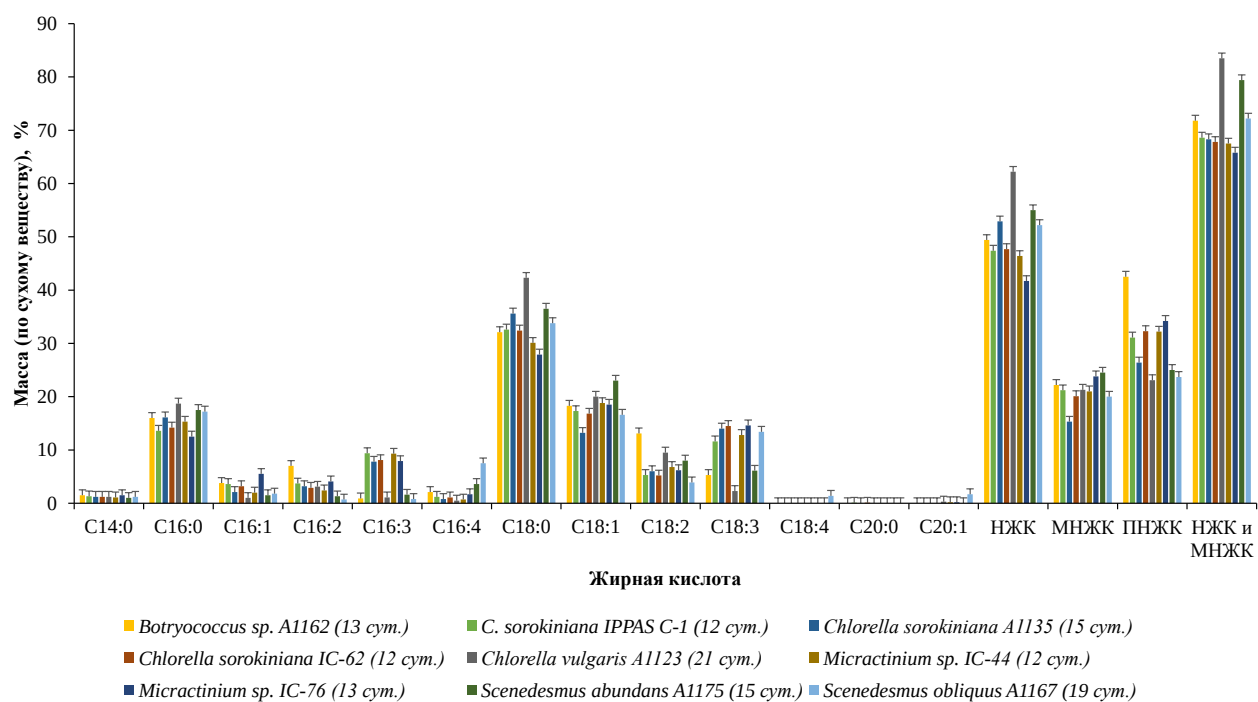


Рисунок 5 – Анализ состава жирных кислот, входящих в состав биомассы штаммов микроводорослей при культивировании в среде ВВМ в колбах (по данным ГХ-МС). А. Экспоненциальная фаза роста. Б. Стационарная фаза роста

Таблица 11 – Состав биомассы штаммов микроводорослей при культивировании в среде ВВМ в колбах в стационарной фазе роста

Штамм	Сутки	% масс. по сухому веществу		
		W _л	W _y	W _б
<i>Botryococcus</i> sp. A1162	20	23.4 ± 2.3	46.3 ± 1.1	31.1 ± 2.2
<i>C. sorokiniana</i> A1135	25	31.2 ± 3.4	40.7 ± 2.8	30.3 ± 1.5
<i>C. sorokiniana</i> IC-62	22	30.5 ± 2.1	42 ± 1.5	28.7 ± 1.4
<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	23	24.8 ± 3.3	39 ± 2.2	38.5 ± 1.7
<i>C. vulgaris</i> A1123	25	38.3 ± 1.0	37.8 ± 1.4	26.0 ± 1.2
<i>Micractinium</i> sp. IC-44	23	39.2 ± 3.8	30.2 ± 1.8	33.2 ± 0.8
<i>Micractinium</i> sp. IC-76	25	35.5 ± 2.8	32.5 ± 1.3	32.9 ± 1.0
<i>S. abundans</i> A1175	19	44.4 ± 2.7	43.3 ± 1.2	15.7 ± 0.7
<i>S. obliquus</i> A1167	25	31.4 ± 2.2	44.1 ± 2.2	27.8 ± 0.7

(тест Тьюки) не было выявлено достоверных различий ($p > 0.05$) по уровню накопления того или иного компонента. Повышенное содержание углеводов в биомассе отмечено для штаммов, относящихся к р. *Scenedesmus* и р. *Micractinium*, а также для *C. sorokiniana* IPPAS C-1, штаммы р. *Scenedesmus* и р. *Micractinium* также обладали высоким содержанием липидов. Штаммы *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 обладают наименьшим содержанием углеводов в биомассе по сравнению с другими штаммами ($p < 0.05$). Большим содержанием углеводов отличается штамм *Botryococcus* sp. A1162 ($46.3 \pm 1.1\%$). Выявлено, что у всех штаммов высокое содержание белка соответствовало низкому содержанию общих липидов. По данным дисперсионного анализа с множественным сравнением по тесту Тьюки выявлено, что достоверно большим ($p < 0.05$) содержанием белка по сравнению с остальными протестированными штаммами обладает *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($38.5 \pm 1.7\%$), меньшим – *S. abundans* A1175 ($15.7 \pm 0.7\%$).

Таким образом, по данным анализа свойств выбранных штаммов, штамм *S. abundans* A1175 обладает относительно высоким уровнем накопления НЖК и МНЖК, а также липидов, что в дальнейшем позволит получать на их основе биотопливо высокого качества. 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 продукцию липидов и углеводов микроводорослями, а также их метаболических особенностей при культивировании в различных средах.

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

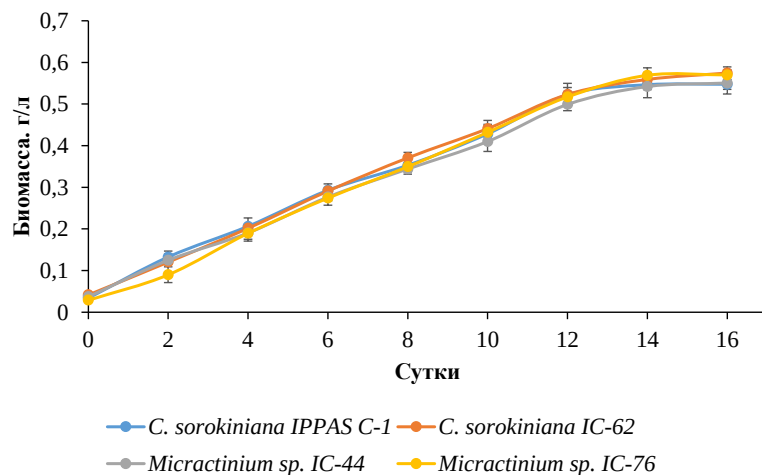
В последних исследованиях было показано, что микроводоросли обладают способностью эффективно удалять различные загрязнения из воды, включая как неорганические компоненты (нитраты, нитриты, соли аммония, фосфаты и сульфаты), так и органические формы углерода [320]. Однако не все штаммы могут одинаково эффективно удалять загрязнители и обеспечивать высокий уровень накопления липидов в биомассе [321]. В связи с этим штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1, отобранные как наиболее перспективные продуценты липидов, были использованы для изучения метаболических особенностей штаммов с высоким уровнем накопления липидов при культивировании на среде WW (миксотрофный режим культивирования). Показано, что в стрессовых условиях (снижение концентрации соединений азота в среде, увеличение содержания солей в среде или интенсивности освещения) происходят значительные метаболические изменения, которые приводят к накоплению липидов под действием переключения метаболизма с синтеза крахмала на синтез липидов (англ. «*lipid switch*») [322]. В то же время метаболические особенности, ведущие к увеличению накопления липидов у разных штаммов в стрессовых условиях, остаются малоизученными. Например, в работе [323] изучались метаболические изменения у шести различных штаммов (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Hindakia* и *Parachlorella*) при их адаптации к сточным водам. Было показано, что накопление липидов в биомассе при культивировании на сточных водах более эффективно происходило у *P. kessleri*, сопровождалось увеличением концентрации каротиноидов и повышенной активностью аскорбатпероксидазы. Однако сложные механизмы, лежащие в основе накопления липидов у штаммов липид-продуцирующих микроводорослей на разных этапах культивирования в сточных водах, остаются неясными.

3.4.1 Исследование свойств микроводорослей при культивировании в среде WW у штаммов с высоким уровнем накопления нейтральных липидов

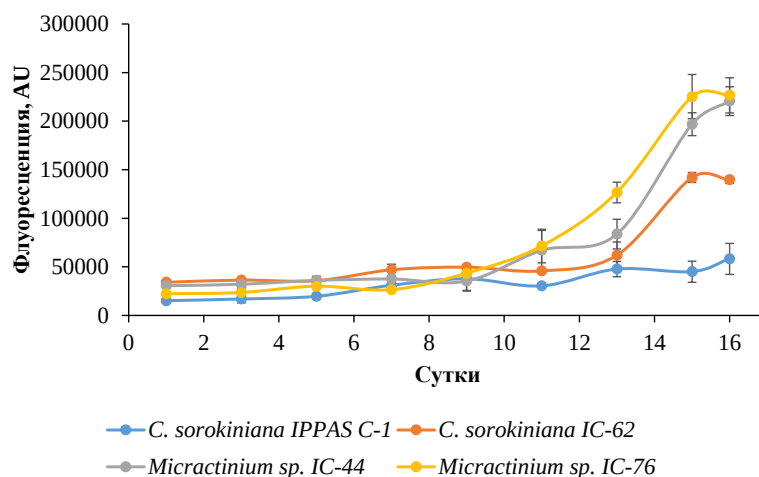
Для уточнения параметров культивирования штаммов *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IPPAS C-1, отобранных (п. 3.2) по наличию высокого уровня накопления нейтральных липидов и биомассы, было проведено их

культивирование на среде WW в колбах. Результаты измерения количества биомассы и липидов приведены на Рисунке 6 и в Таблице 12.

А.



Б.



В.

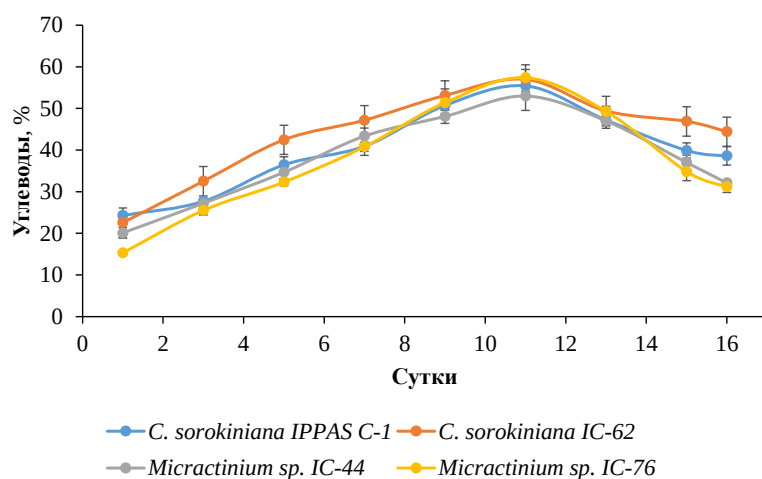


Рисунок 6 – Накопление биомассы и липидов штаммами микроводорослей с высоким уровнем липидов при культивировании на среде WW в колбах. (А) Биомасса, (Б) Липиды, (В) Углеводы.

Условия культивирования: объем среды 150 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

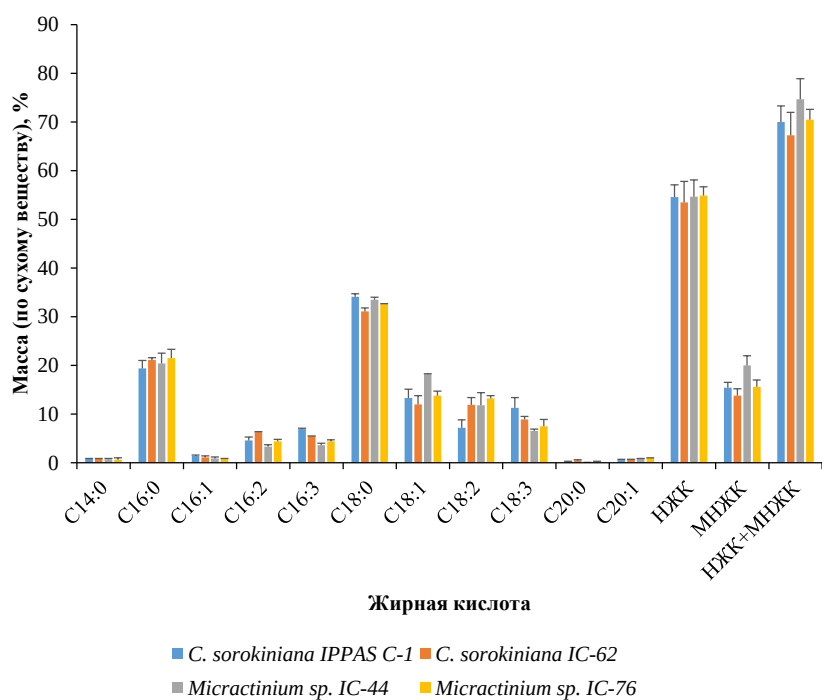
Как видно на Рисунке 6 А-Б, по уровню накопления нейтральных липидов штаммы отличались в стационарной фазе роста. Штаммы *Micractinium* sp. IC-76 и *Micractinium* sp. IC-44 накапливали наибольшее количество нейтральных липидов в стационарной фазе роста, в то время как штамм IPPAS C-1 практически их не накапливал. По данным Рисунка 3А-В, начиная с 11 суток наблюдается снижение накопления углеводов, что совпадает с началом фазы запасаения нейтральных липидов (Рисунок 6А, Б). По полученным результатам можно заключить, что все штаммы обладали сравнимыми удельными скоростями накопления биомассы (Таблица 12). Достоверные ($p < 0.05$, тест Тьюки) различия с другими штаммами по скорости накопления липидов наблюдались лишь для штамма *Micractinium* sp. IC-76 (13.49 ± 1.50 мг л⁻¹ сут⁻¹) с наибольшим $W_{\text{л}}$. Наибольшей скоростью накопления углеводов обладал штамм *C. sorokiniana* IC-62 (24.5 ± 1.7 мг л⁻¹ сут⁻¹), однако достоверных различий со штаммом *Micractinium* sp. IC-76 (22.2 ± 1.1 мг л⁻¹ сут⁻¹) по этому параметру согласно тесту Тьюки ($p > 0.05$) выявлено не было. Достоверно высоким ($p < 0.05$, тест Тьюки) $W_{\text{л}}$ среди протестированных штаммов в стационарной фазе роста обладал штамм *Micractinium* sp. IC-76 ($36.3 \pm 0.1\%$), наименьшим - *C. sorokiniana* IC-62 ($21.4 \pm 2.3\%$). Для этих же штаммов была выявлена обратная зависимость по содержанию углеводов (31.2 ± 1.3 и $44.4 \pm 1.2\%$, соответственно). Штамм *C. sorokiniana* IPPAS C-1, обладавший наименьшим уровнем накопления нейтральных липидов (Рисунок 6А, Б), обладал большим содержанием общих липидов ($25.6 \pm 0.9\%$) по сравнению со штаммом *C. sorokiniana* IC-62. Для выявления различий в жирнокислотном составе биомассы штаммов с высоким содержанием липидов при культивировании на среде WW был проведен ГХ-МС анализ состава биомассы в экспоненциальной и стационарной фазах роста (Рисунок 7).

Таблица 12 – Параметры культивирования штаммов микроводорослей с высоким содержанием липидов и состав их биомассы при выращивании в колбах на среде WW

Параметр	Штамм			
	<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	<i>C. sorokiniana</i> IC-62	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	<i>Micractinium</i> sp. IC-76
μ (сут ⁻¹)	0.12 ± 0	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0	0.12 ± 0.01
T, сут	5.81 ± 0.13	6.01 ± 0.38	6.24 ± 0.26	5.83 ± 0.31
V_6 , мг л ⁻¹ сут ⁻¹	36.62 ± 1.63	38.96 ± 4.79	34.91 ± 2.86	37.18 ± 4.12
$V_{\text{л}}$, мг л ⁻¹ сут ⁻¹	9.38 ± 0.42	8.05 ± 1.53	10.11 ± 0.83	$13.49 \pm 1.50^*$
$V_{\text{у}}$, мг л ⁻¹ сут ⁻¹	20.7 ± 0.8	24.5 ± 1.7	21.4 ± 1.9	22.2 ± 1.1
$W_{\text{л}}$, % (16 сут)	$25.6 \pm 0.9^*$	$21.4 \pm 2.3^*$	$29.0 \pm 0.5^*$	$36.3 \pm 0.1^*$
$W_{\text{у}}$, % (16 сут)	$38.6 \pm 2.2^*$	$44.4 \pm 1.2^*$	$32.1 \pm 0.7^*$	$31.2 \pm 1.3^*$
W_6 , % (16 сут)	$29.9 \pm 1.7^*$	$34.2 \pm 2.3^*$	$38.9 \pm 3.5^*$	$32.51 \pm 2.5^*$

Наблюдаются статистически достоверные (* - $p < 0.05$) значения по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений (тест Тьюки) параметров между штаммами. Условия культивирования: объем среды 150 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

А.



Б.

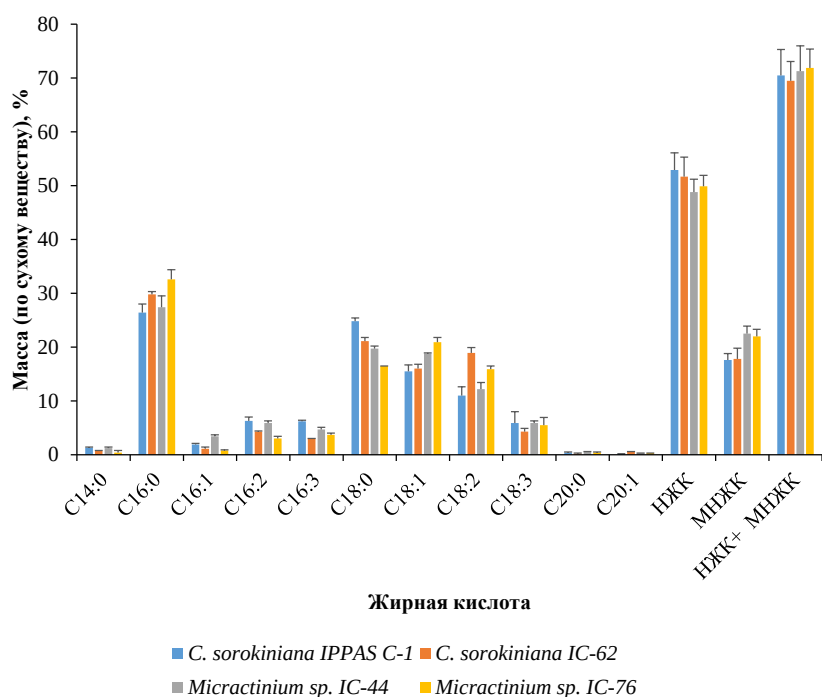


Рисунок 7 – Анализ состава жирных кислот у штаммов микроводорослей с высоким содержанием липидов при выращивании в колбах на среде WW. (А) Экспоненциальная фаза роста (8 сут), (Б) Стационарная фаза роста (16 сут). Для всех значений наблюдаются достоверные различия ($p < 0.05$) по данным двухвыборочного одностороннего t-теста при сравнении значений экспоненциальной и стационарной фаз роста (за исключением отмеченных «х» с $p > 0.05$)

Проведенный анализ показал, что в экспоненциальной фазе роста у всех штаммов наблюдался высокий уровень накопления жирных кислот C16:0, C18:0 и C18:1. В стационарной фазе роста наблюдали достоверные различия ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест), связанные с увеличением содержания C16:0 и C18:1, в то время как содержание C18:0 снизилось у всех штаммов. В этой фазе роста все штаммы обладали сравнимым уровнем накопления НЖК, кроме *Micractinium* sp. IC-44, у которого было выявлено высокое содержание МНЖК и наибольшее суммарное содержание моно- и насыщенных жирных кислот ($74.7 \pm 4.2\%$), которое было больше, чем у *S. abundans* A-1175 при культивировании на среде ВВМ. Выявлено, что протестированные штаммы, относящиеся к *C. sorokiniana* и *Micractinium* sp., при культивировании на среде WW в целом обладают сравнимыми уровнями накопления НЖК и МНЖК.

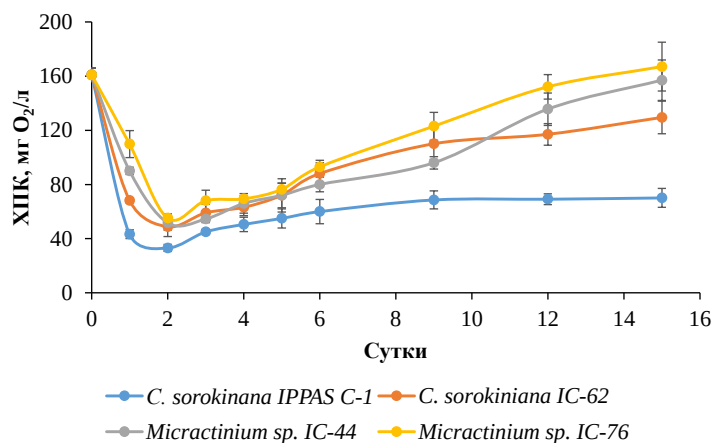
Важными показателями возможности применения отдельных штаммов микроводорослей в процессах водоочистки являются эффективность удаления соединений азота и фосфора из среды, а также снижение показателя ХПК. В данной работе был проведен анализ основных компонентов среды WW (концентрация NH_4^+ и PO_4^{3-} , а также ХПК) в процессе культивирования микроводорослей в колбах. Состав среды в конце культивирования (15 сут) приведен в Таблице 13, результаты - на Рисунке 8. По данным Рисунка 8А, на вторые сутки культивирования наблюдается снижение показателя ХПК в культуральной жидкости для *C. sorokiniana* IPPAS C-1 (на 79.4% от исходного значения). Далее в процессе культивирования наблюдалось достоверное увеличение показателя ХПК для всех штаммов, кроме *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($p < 0.01$, тест Тьюки), для которого показатель ХПК составил $70.1 \text{ мг О}_2 \text{ л}^{-1}$ на пятнадцатые сутки. Этот эффект может быть связан с увеличением концентрации органического компонента в среде вследствие процессов жизнедеятельности клеток, связанных с выделением различных органических веществ

Таблица 13 – Анализ состава культуральной среды в стационарной фазе роста при культивировании штаммов микроводорослей в среде WW (15 сут)

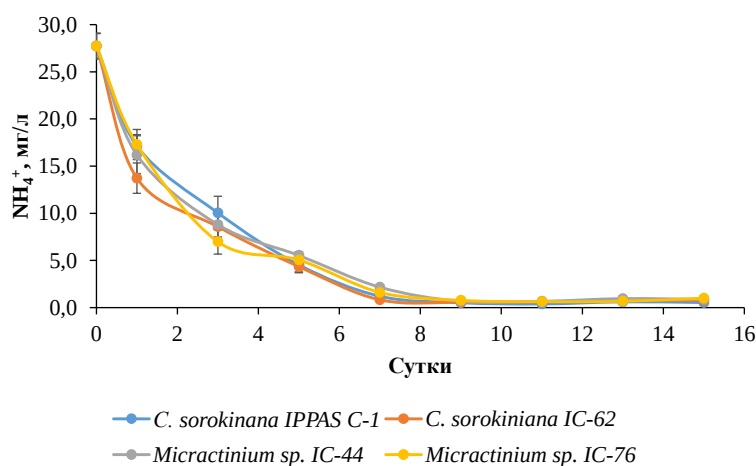
Параметр	Штамм			
	<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	<i>C. sorokiniana</i> IC-62	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	<i>Micractinium</i> sp. IC-76
ХПК, $\text{мг л}^{-1} \text{ О}_2$	$70.1 \pm 7.0^{**}$	129.5 ± 12.0	157.0 ± 15.0	167.0 ± 18.0
NH_4^+ , мг л^{-1}	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2
PO_4^{3-} , мг л^{-1}	0.099 ± 0.078	0.272 ± 0.054	$0.686 \pm 0.14^*$	0.414 ± 0.094

Наблюдаются статистически достоверные (* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$) значения по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений (тест Тьюки) параметров между штаммами. Условия культивирования: объем среды 150 мл, температура $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 2000 лк

А.



Б.



В.

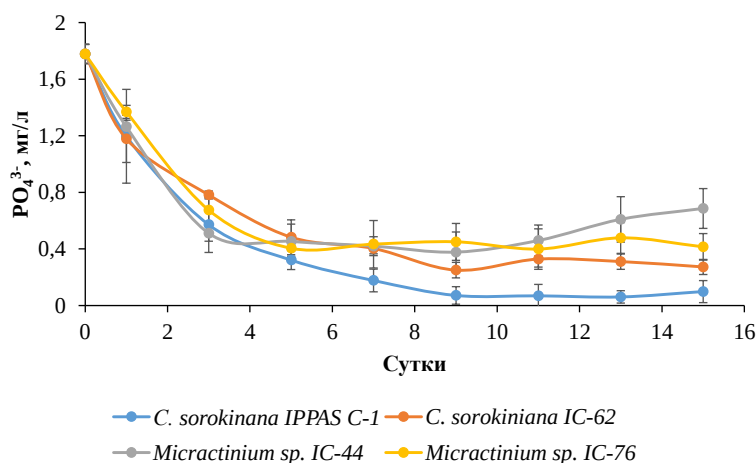


Рисунок 8 – Состав культуральной среды при культивировании штаммов микроводорослей с высоким содержанием липидов на среде WW в колбах: (А) ХПК, (Б) NH_4^+ , (В) PO_4^{3-} . Условия культивирования: объем среды 150 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

[324]. Показано (Рисунок 8Б), что все штаммы одинаково эффективно поглощали NH_4^+ из среды вплоть до восьмых суток культивирования. Характер поглощения клетками PO_4^{3-} (Рисунок 8В)

отличался для всех штаммов в стационарной фазе роста. Наименьшее значение концентрации PO_4^{3-} в среде, равное 0.1 мг л^{-1} , было выявлено для штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1, а максимальное - для *Micractinium* sp. IC-44 (0.7 мг л^{-1} , $p < 0.05$ тест Тьюки) в конце культивирования.

3.4.2 Анализ метаболических профилей микроводорослей с высоким содержанием липидов при культивировании в среде WW

С целью изучения метаболических особенностей штаммов микроводорослей с высоким уровнем накопления нейтральных липидов при культивировании на среде WW, была проведена оценка изменений в метаболическом профиле штаммов *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76, в экспоненциальной (четвертые сутки) и стационарной (пятнадцатые сутки) фазах роста. Культивирование проводили в объеме среды 150 мл, температуре $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ и освещенности 2000 лк. Дополнительно был проанализирован метаболомный профиль штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1 с низким уровнем накопления липидов, что позволяет изучить различия на этом уровне между штаммами с высоким и низким уровнями накопления нейтральных липидов при снижении концентрации соединений азота и фосфора в среде.

При метаболическом профилировании выявлено 46 соединений, относящихся к углеводам, аминокислотам, органическим кислотам, липидам и другим классам веществ. Многомерный статистический анализ полученных данных с использованием метода главных компонент (PCA) и метода дискриминантного анализа на основе частных наименьших квадратов (PLS-DA) позволил установить статистически значимые различия в метаболических профилях и идентифицировать отдельные вещества, которые в значительной степени связаны с метаболическими изменениями, наблюдающимися при накоплении нейтральных липидов. График матрицы счетов в пространстве первой (F1) и второй (F2) главных компонент PCA (Рисунок 9) позволяет выявить сходства и различия в метаболических профилях исследуемых штаммов. При анализе метаболитов, обнаруженных в биомассе штаммов в экспоненциальной и стационарной фазах роста, сумма первых двух основных компонент PCA составила 40.35% от общей дисперсии, что говорит о существенных различиях в метаболизме всех штаммов в обеих фазах роста (Таблица 14). Метаболические профили всех штаммов в стационарной фазе роста были смещены относительно главной компоненты F1, что связано с высоким содержанием метаболитов углеводного и липидного обмена, за исключением штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1 с наименьшим содержанием липидов. Выраженными различиями метаболизма в фазах роста

наблюдались у штамма *Micractinium* sp. IC-76 (штамм с самым высоким содержанием нейтральных и общих липидов в стационарной фазе роста, Таблица 10, Рисунки 6, 9).

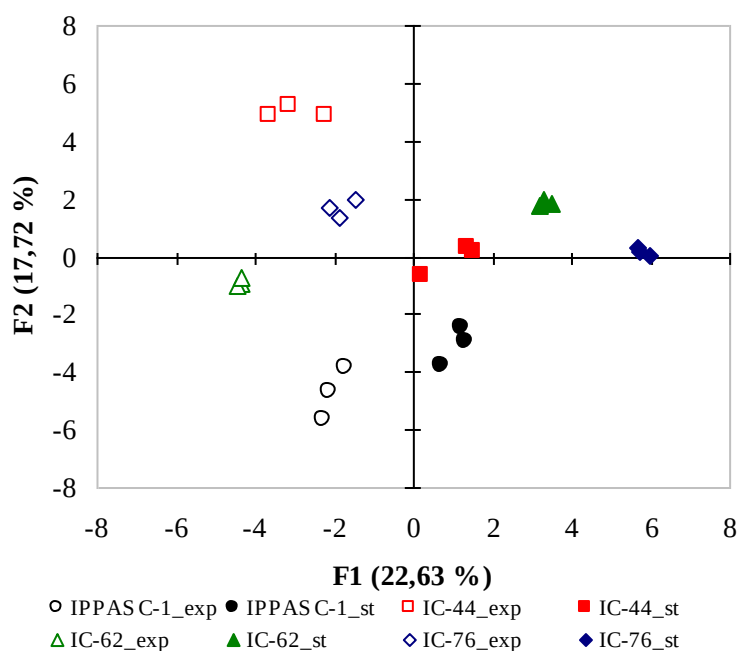
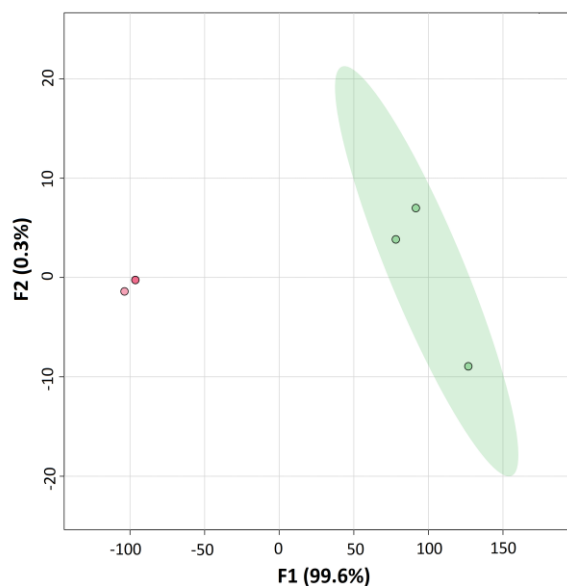


Рисунок 9 – Анализ метаболизма микроводорослей в экспоненциальной и стационарной фазе роста при культивировании на среде WW методом PCA. Условные обозначения: exp – экспоненциальная фаза роста (4 сут), st – стационарная фаза роста (15 сут)

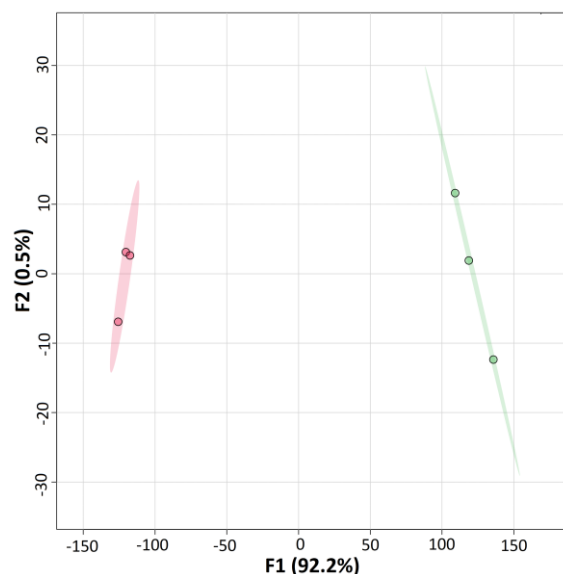
Анализ каждого из четырех штаммов методом PLS-DA для выявления наиболее значимых изменений в метаболизме между экспоненциальной и стационарной фазами роста показал, что наибольшие различия выявляются в отношении компоненты F1 (Рисунок 10), при этом суммарно F1 и F2 объясняют большую часть дисперсии (Таблица 14). В связи с этим более подробный анализ был выполнен для F1 компоненты для штамма *Micractinium* sp. IC-76, как штамма с наибольшим уровнем накопления нейтральных липидов.

Полученные значения VIP (показатель важности независимой переменной в проекции, Приложение Б) для первой компоненты при PCA анализе метаболизма *Micractinium* sp. IC-76 выявил, что двенадцать метаболитов, изменяющихся при переходе экспоненциальной фазы к стационарной 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).

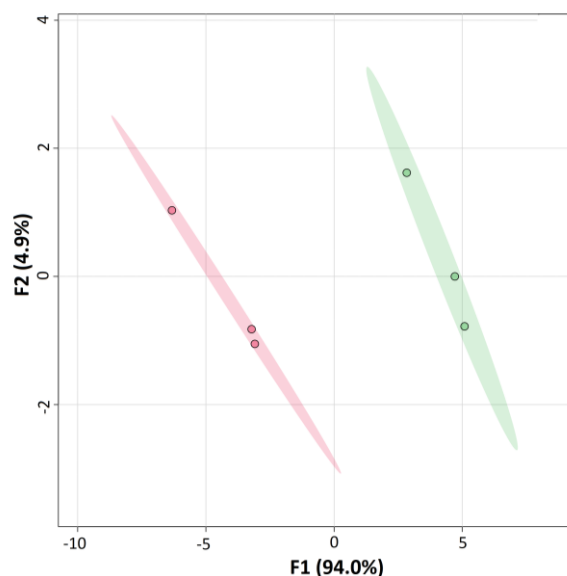
А.



Б.



В.



Г.

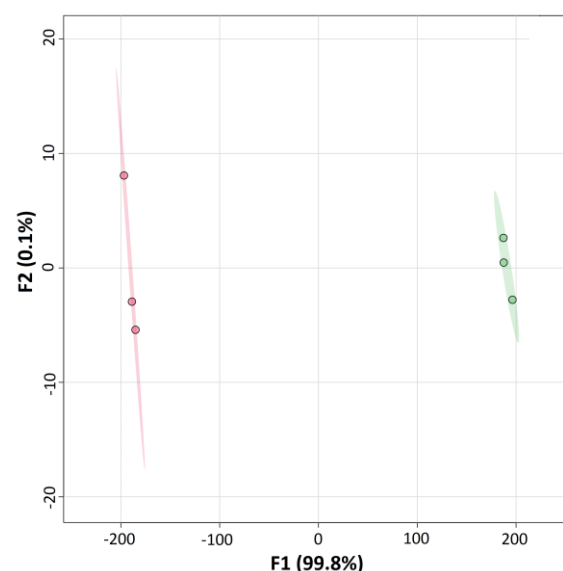


Рисунок 10 – PLS-DA анализ метаболизма штаммов микроводорослей при культивировании на среде WW. (А) *C. sorokiniana* IPPAS C-1, (Б) *C. sorokiniana* IC-62, (В) *Micractinium* sp. IC-44, (Г) *Micractinium* sp. IC-76. Красным обозначена экспоненциальная фаза, зеленым – стационарная фаза роста

Для выявления метаболических путей с наибольшими изменениями в процессе накопления нейтральных липидов у *Micractinium* sp. IC-76 на среде WW, было проведено обогащение по метаболическим путям по данным базы KEGG в соответствии с их топологией для всех выявленных метаболитов с $VIP > 1$ и $p < 0.05$ (двухвыборочный односторонний t-тест, Приложение Б) с использованием Metaboanalyst 5.0. Результаты анализа приведены в Таблице 15.

Таблица 14 – Оценка уровня качества PCA и PLS-DA анализа метаболизма штамма *Micractinium* sp. IC-76 при культивировании на среде WW

Метод, параметр	Штамм				
	Все штаммы	IC-76	IC-44	IPPAS C1	IC-62
PCA (сумма 1 и 2 компонент, % от общей дисперсии)	40.35%	99.8%	99.12%	99.6%	99.24%
PLS-DA (сумма 1 и 2 компонент, % от общей дисперсии)	38.1%	99.8%	98.9%	99.6%	99.2%
R ²	0.998	0.998	0.9948	0.9783	0.9955
Q ²	0.988	0.988	0.9643	0.9459	0.9897

Метаболические пути с наибольшими изменениями при индукции накопления нейтральных липидов отбирали по следующим критериям: индекс воздействия > 0 , FDR < 0.05 и $p < 0.05$. Таким образом, наибольшим изменениям в процессе индукции накопления липидов *Micractinium* sp. IC-76 на среде WW были подвержены пути, связанные с метаболизмом сахаров (крахмала и сахарозы, а также в меньшей степени метаболизма галактозы), аминокислот (аланина, аспартата и глутамата), а также с метаболизмом глутатиона. На Рисунке 11 приведена обобщенная схема изменения метаболизма *Micractinium* sp. IC-76 в процессе индукции накопления нейтральных липидов при культивировании на среде WW по данным PLS-DA анализа.

Наибольшим влиянием на метаболизм *Micractinium* sp. IC-76 в процессе накопления нейтральных липидов при культивировании на среде WW обладают метаболические пути, связанные с метаболизмом крахмала и сахарозы. Это подтверждает тот факт, что в стационарной фазе роста концентрация сахарозы в биомассе этого штамма была почти в тринадцать раз больше по сравнению с экспоненциальной фазой (Рисунок 11). Также показано наличие рафинозы и эритроновой кислоты только в стационарной фазе роста. Похожий эффект увеличения внутриклеточной концентрации сахарозы был показан для микроводоросли *Haematococcus pluvialis* [325], что характерно для внутриклеточных процессов, связанных с осморегуляцией [326] и запасанием энергии в условиях недостатка питательных веществ. Снижение концентрации аспарагиновой и пироглутаминовой кислот у *Micractinium* sp. IC-76 связано со стационарной фазой роста, что, по-видимому, также обусловлено снижением поступления NH_4^+ в цикл мочевины (Рисунок 11), а также было продемонстрировано ранее в отношении снижения концентрации белка при культивировании микроводорослей на среде BBM в условиях недостатка соединений азота.

Таблица 15 – Обогащение по метаболическим путям, выполненное для штамма *Micractinium* sp. IC-76, в процессе накопления нейтральных липидов (по данным Metaboanalyst 5.0)

Метаболический путь	Общее количество метаболитов в метаболическом пути (по KEGG)	Количество совпадений с метаболическим путем	p -значени $e \times 10^{-3}$	$FDR^{\S} \times 10^{-3}$	Индекс воздействия
Метаболизм крахмала и сахарозы	21	2	0.00638	0.44003	0.22421
Метаболизм аланина, аспартата и глутамата	20	1	0.11643	1	0.20115
Метаболизм галактозы	27	2	0.010477	0.44003	0.07588
Метаболизм глутатиона	27	1	0.15434	1	0.01195
Биосинтез монобактамов	8	1	0.04806	1	0
Биосинтез лизина	11	1	0.065564	1	0
Метаболизм никотината и никотинамида	12	1	0.071337	1	0
Биосинтез аргинина	17	1	0.099747	1	0
Метаболизм бета-аланина	20	1	0.11643	1	0
Фиксация углерода в фотосинтезирующих организмах	21	1	0.12194	1	0
Метаболизм инозитолфосфата	24	1	0.13827	1	0
Метаболизм глицина, серина и треонина	28	1	0.15964	1	0
Метаболизм цистеина и метионина	43	1	0.23578	1	0
Биосинтез аминокислот-тРНК	48	1	0.25981	1	0
Биосинтез жирных кислот	52	1	0.27857	1	0

[§] FDR – коэффициент ложного обнаружения

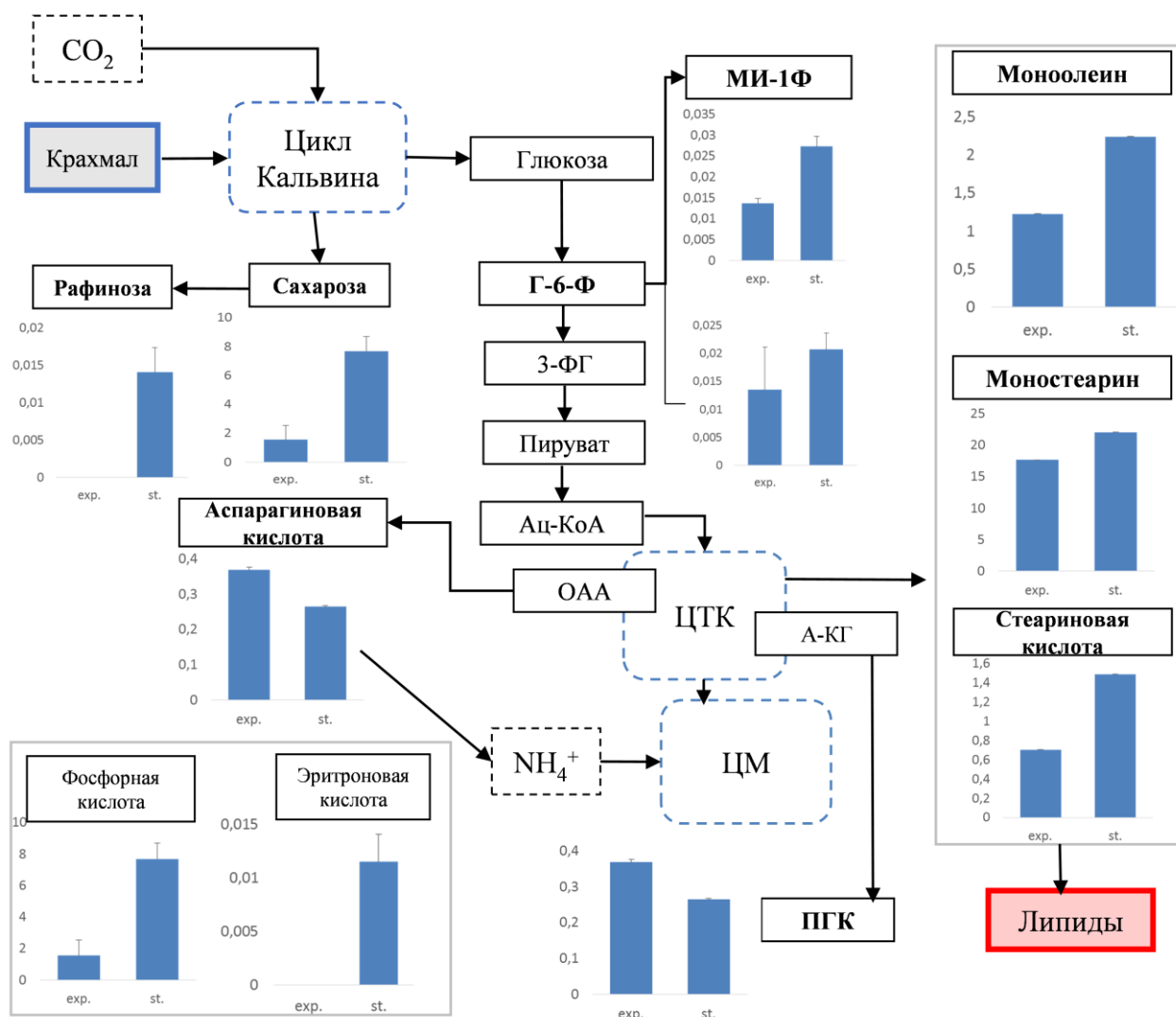


Рисунок 11 – Схема метаболизма *Micractinium* sp. IC-76 с наиболее значимыми изменениями в процессе индукции накопления нейтральных липидов при культивировании на среде WW по данным PLS-DA анализа. Условные обозначения: МИ-1Ф – миоинозитол-1-фосфат; Г-6-Ф – глюкозо-6-фосфат; 3-ФГ – 3-фосфоглицерат; Ац-КоА – ацетилкоэнзим А; ОАА – оксалоацетат; А-КГ – альфа-кетоглутарат; ПГК – пироглутаминовая кислота; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; ЦМ – цикл мочевины

Ранее было показано, что накопление липидов из-за снижения концентрации соединений азота в среде может быть связано с задержкой в синтезе белков наряду с избыточным накоплением углерода посредством фотосинтеза и его дальнейшим превращением в триацилглицериды [327]. В данной работе в стационарной фазе роста также было зафиксировано накопление предшественников синтеза липидов при одновременном увеличении запаса нейтральных липидов (Рисунок 6А, Б). Увеличение концентрации мио-инозитол-1-фосфата в 4.14 раза в стационарной фазе по сравнению с экспоненциальной свидетельствует об активации метаболических путей, связанных биосинтезом липидов, одним из предшественников которого

является фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат [328]. В стационарной фазе роста также наблюдалось статистически значимое увеличение концентрации других предшественников липидов – моноолеина, моностерарина и стеариновой кислоты. При этом ранее по результатам анализа жирнокислотного состава было отмечено, что в стационарной фазе роста у *Micractinium* sp. IC-76 наблюдается снижение содержания стеариновой кислоты и увеличение олеиновой (Рисунок 7). В стрессовых условиях это несоответствие может быть ассоциировано как с перестройкой мембраны, связанной с увеличением в ее составе ненасыщенных жирных кислот, необходимых для увеличения текучести мембран [329], так и с переключением метаболизма на синтез отдельных классов липидов, изменяющих свойства мембран.

Таким образом, анализ метаболизма штаммов *Chlorella* и *Micractinium* выявил отличия в метаболизме между экспоненциальной и стационарной фазами роста. На примере высоколипидного штамма *Micractinium* sp. IC-76 впервые показано, что наибольшим изменениям в процессе накопления нейтральных липидов подвержены циклы, связанные с метаболизмом крахмала и углеводов, а также наблюдаются изменения в концентрации метаболитов, относящихся к аминокислотам и жирным кислотам. Исследование метаболизма штаммов помогут понять природу метаболических изменений, ответственных за накопление биомассы и липидов у микроводорослей при культивировании на сточных водах.

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

Для увеличения содержания липидов в биомассе микроводорослей используются несколько подходов. Применение генетической инженерии для модификации микроводорослей может улучшить накопление липидов за счет увеличения их синтеза [330] или снижения активности бета-окисления жирных кислот [331], а также снижения катаболизма липидов [332]. Другим подходом к увеличению синтеза нейтральных липидов является создание стрессовых условий путем снижения концентрации соединений азота, фосфора, серы в среде и изменением солености или освещенности [333]. На клеточном уровне в ответ на стресс этот эффект обусловлен переключением метаболизма с процесса накопления углеводов (включая крахмал) на накопление нейтральных липидов. Это явление отчасти изучено у ряда микроводорослей, включая *C. reinhardtii* [87], *P. kessleri* [334], *Pseudochlorococcum* sp. [335], как на уровне экспрессии генов, так и на уровне метаболизма, но метаболизм микроводорослей при культивировании в сточных водах и индукция переключения на синтез липидов в присутствии

стрессовых факторов в этой среде остаются малоизученными. С практической точки зрения необходимо определить ключевые метаболические циклы, которые активируются в ответ на стресс не на стандартных синтетических средах, а в сточных водах, как наиболее доступном субстрате для культивирования. Кроме того, представляется интересным оценить влияние отдельных стрессовых факторов не только на метаболизм штаммов с высоким уровнем продукции нейтральных липидов, но также и на метаболизм штаммов, которые преимущественно продуцируют углеводы в стандартных условиях. Подобный подход не только позволит изучить фундаментальные особенности метаболизма, наблюдающиеся в процессе индукции синтеза нейтральных липидов у штаммов микроводорослей с низким уровнем их продукции, но также в дальнейшем расширить возможности создания продуцентов липидов микроводорослей, ранее не применявшихся с этой целью. С практической точки зрения изучение механизма накопления липидов в микроводорослях в сточных водах с высоким содержанием солей может способствовать разработке новых способов очистки сточных вод в химической, пищевой и сельскохозяйственной промышленности, поскольку использование стандартных микробиальных сообществ с этой целью часто оказывается неэффективным [336].

3.5.1 Выбор модельного штамма для оценки влияния стрессовых условий на способность синтезировать нейтральные липиды

Проведенный ранее анализ накопления нейтральных липидов и биомассы показал, 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, а также низким содержанием нейтральных липидов в стационарной фазе роста по сравнению другими протестированными штаммами (Рисунок 1). Выбор модельного штамма для оценки влияния различных стрессовых факторов на индукцию липидов был проведен среди этих штаммов, результат представлен на Рисунке 12. Анализ содержания углеводов у этих штаммов ранее показал, что штаммы с относительно высоким уровнем нейтральных липидов обладали низким уровнем накопления углеводов в стационарной фазе роста.

Для выбранных штаммов было оценено влияние различных стрессовых факторов на состав их биомассы, включая низкую концентрацию NO_3^- и PO_4^{3-} , изменение освещенности и высокую соленость среды. Эти факторы были выбраны как наиболее часто используемые в качестве индукторов синтеза нейтральных липидов у микроводорослей [334], [337]. Анализ

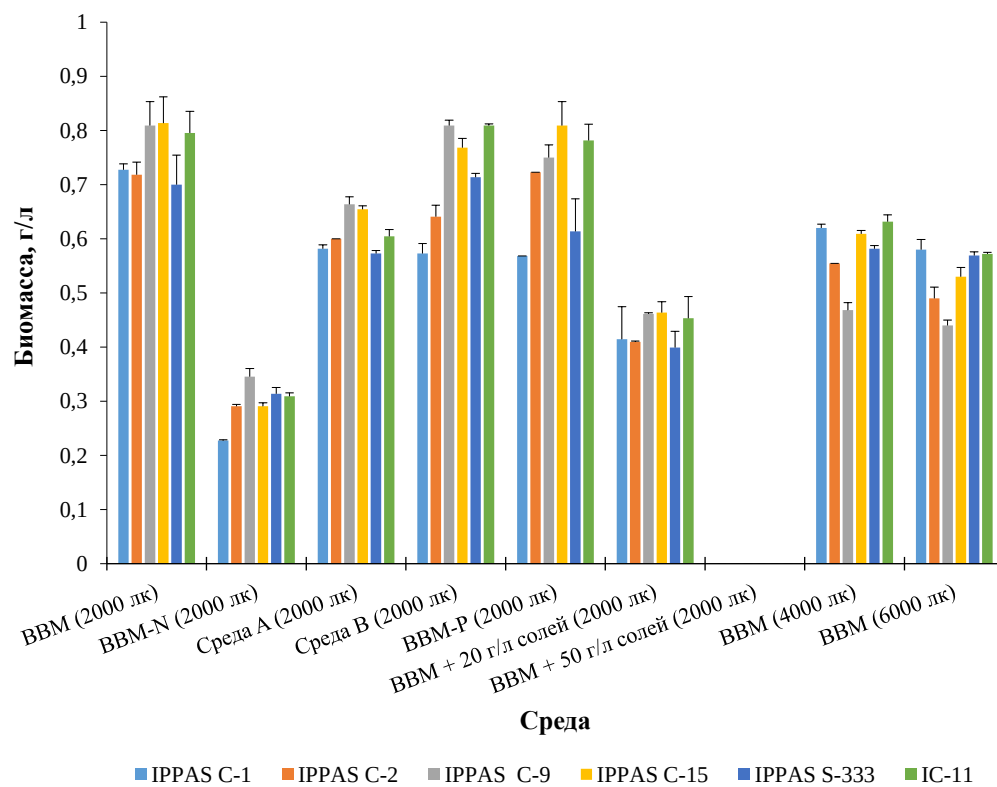
уровня накопления биомассы (Рисунок 12) у тестируемых штаммов в базовом эксперименте (среда BBM и освещение 2000 лк) показал, что снижение концентрации соединений азота в среде (среда BBM-N), добавление соли (свыше 20 г л⁻¹) и увеличение освещенности более 2000 лк приводят к достоверному ($p < 0.05$, тест Тьюки) снижению накопления биомассы у всех штаммов микроводорослей (Приложение В) по сравнению с другими стрессовыми факторами. Стоит отметить, что при увеличении концентрации солей в среде до 50 г л⁻¹ на вторые сутки культивирования наблюдался лизис клеток. Ранее было показано, что концентрация солей, соответствующая 20 - 30 г л⁻¹, обычно используется для индукции накопления липидов в микроводорослях в определенных средах и сточных водах [87]. Снижение концентрации соединений фосфора в основном не оказало существенного влияния по сравнению с другими факторами на накопление биомассы для всех штаммов, за исключением штаммов *P. kessleri* IPPAS C-2 и *P. kessleri* IPPAS S-333 ($p < 0.05$, тест Тьюки). Максимальное накопление биомассы отмечено у штаммов *P. kessleri* IPPAS C-9, *P. kessleri* IPPAS C-15 и *P. kessleri* IC-11 на исходной среде BBM (0.80 ± 0.04 , 0.81 ± 0.05 и 0.79 ± 0.06 г л⁻¹, соответственно).

Накопление нейтральных липидов было наиболее выраженным при культивировании в среде BBM с 20 г л⁻¹ соли (Рисунок 12Б) и статистически значимо отличалось от накопления липидов при влиянии других факторов у всех штаммов ($p < 0.05$, тест Тьюки, Приложение В). Штамм *C. sorokiniana* IPPAS C-1 достоверно ($p < 0.05$, тест Тьюки) отличался по уровню продукции нейтральных липидов на всех средах за исключением BBM-N и среды А.

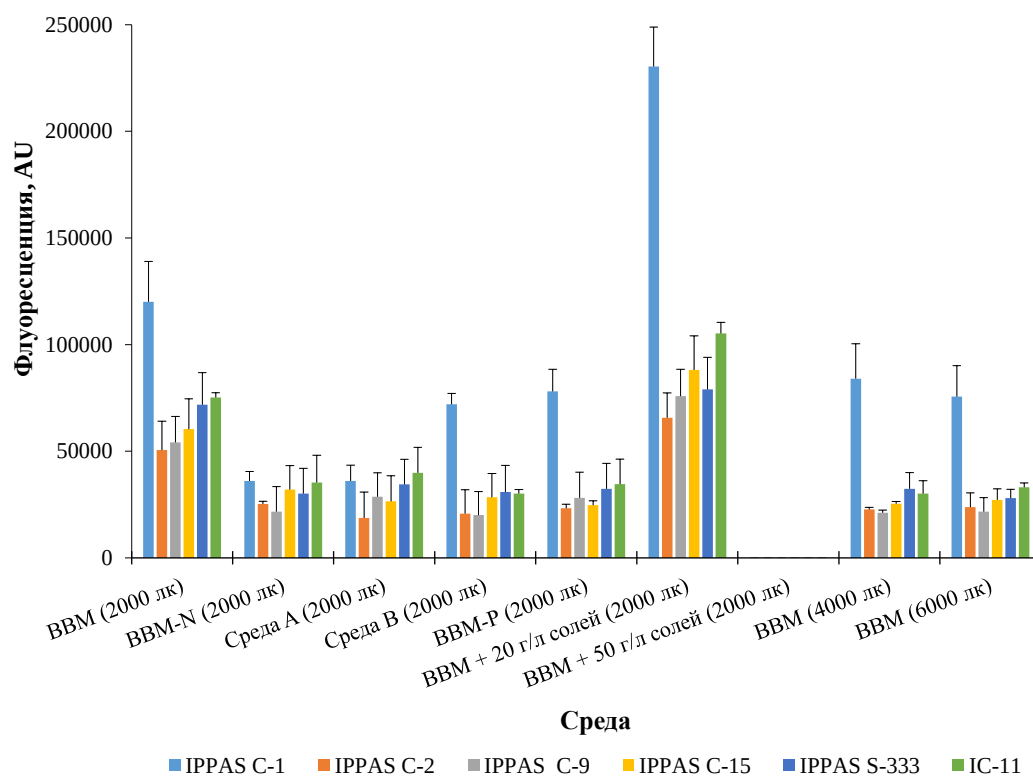
Содержание углеводов варьировалось в исследованных стрессовых условиях для всех отобранных штаммов (Рисунок 12С). Статистически достоверные отличия влияния между стрессовыми факторами выявлены для культивирования штаммов микроводорослей на базовой среде BBM (2000 лк) и при добавлении 20 г л⁻¹ солей ($p < 0.05$, тест Тьюки, Приложение В). Максимальное увеличение W_y до $29.5 \pm 0\%$ наблюдалось для штамма *P. kessleri* IC-11 при низком содержании соединений фосфора в среде (среда В) по сравнению с W_y $19.3 \pm 0\%$ при культивировании на базовой среде BBM ($p < 0.001$, двухвыборочный односторонний t-тест).

Таким образом, штамм микроводоросли *P. kessleri* IC-11 был выбран для дальнейших исследований параметров роста и динамики изменения биохимического состава биомассы под влиянием стрессовых условий. Показано, что выбранный штамм накапливает углеводы в процессе культивирования на среде BBM и имеет низкое содержание нейтральных липидов в стационарной фазе роста. В качестве стрессовых условий для проведения последующих экспериментов были выбраны: среда BBM-N (не наблюдалось увеличения синтеза нейтральных

А.



Б.



В.

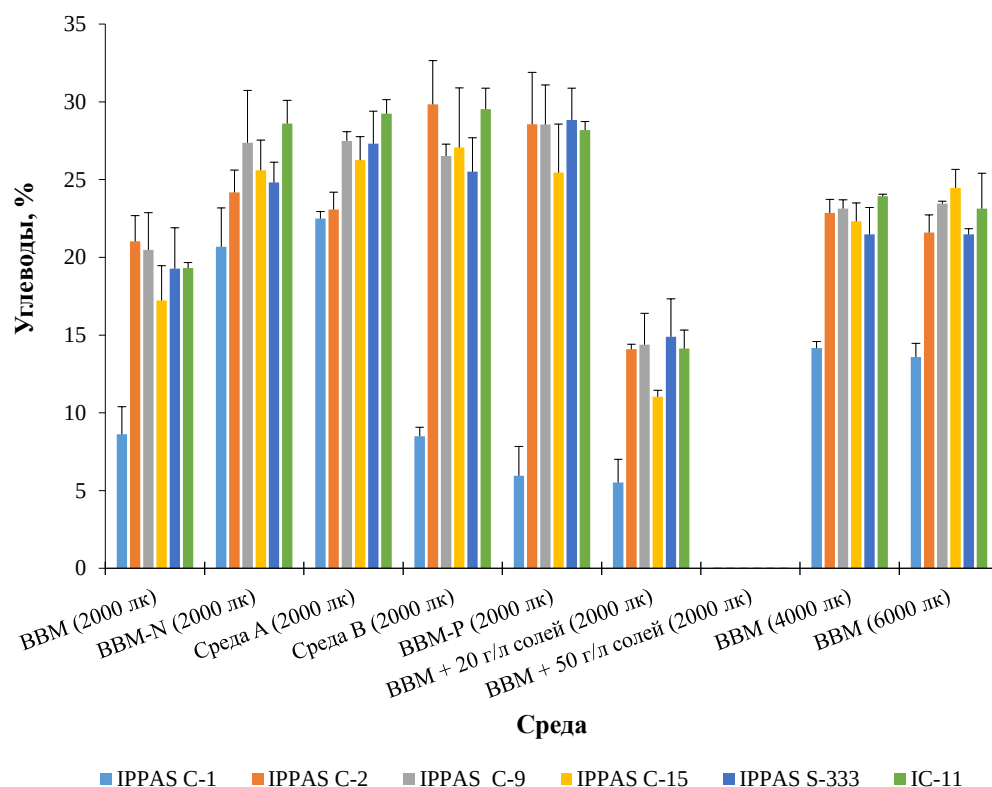


Рисунок 12 – Состав биомассы штаммов микроводорослей с низким уровнем накопления нейтральных липидов под влиянием различных стрессовых факторов. (А) Биомасса, (Б) Нейтральные липиды, (В) Углеводы. Условия культивирования: объем среды 25 мл, температура 28 ± 1 °C

липидов у всех исследованных штаммов микроводорослей) и добавление в среду солей (при ее концентрации 20 г л^{-1} выявлено увеличение синтеза нейтральных липидов у всех штаммов, Рисунок 12Б). В качестве сред для культивирования также использовали BBM (базовая синтетическая среда) и WW (стерилизованные муниципальные сточные воды), что позволяет оценить различия в метаболизме штамма на разных средах.

3.5.2 Оценка влияния концентрации солей и дефицита соединений азота в среде на состав биомассы *P. kessleri* IC-11

Для определения концентрации соли, которая оказывает достоверное влияние на индукцию синтеза нейтральных липидов у штамма *P. kessleri* IC-11 при культивировании на среде BBM, в работе был использован диапазон концентраций $10 - 30 \text{ г л}^{-1}$. Дополнительно

использовали среду BBM-N ($0 \text{ г л}^{-1} \text{ NO}_3^-$), моделирующую недостаток соединений азота при культивировании.

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 (Рисунок 13Б) в стационарной фазе роста и достоверно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) снижает

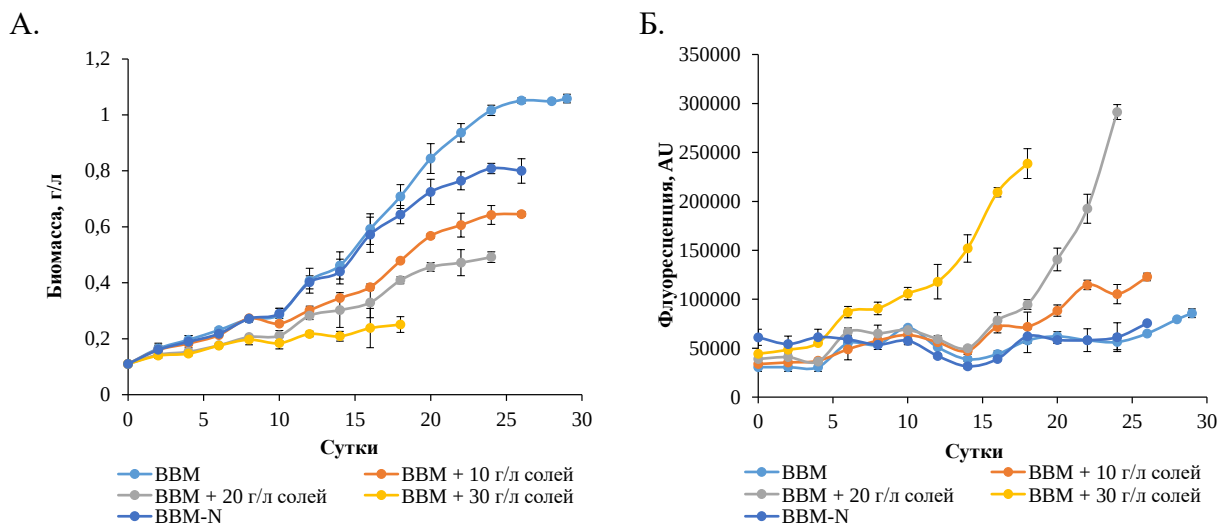


Рисунок 13 – Состав биомассы *P. kessleri* IC-11 при культивировании на среде BBM с различной концентрацией NO_3^- . (А) Биомасса, (Б) Нейтральные липиды. Условия культивирования: объем среды 25 мл, температура $28 \pm 1^\circ \text{C}$, 2000 лк

удельную скорость накопления биомассы (Рисунок 13А) с 0.093 ± 0.009 до $0.038 \pm 0.003 \text{ сут}^{-1}$ (Таблица 16). Напротив, использование среды BBM-N для культивирования не привело к накоплению нейтральных липидов у этого штамма (Рисунок 13Б), но снизило удельную скорость накопления биомассы для *P. kessleri* IC-11 до 0.079 ± 0.006 ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест, Таблица 16).

Таблица 16 – Кинетические параметры культивирования *P. kessleri* IC-11 в среде BBM в стрессовых условиях

Среда	$V_6, \text{ г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$	$\mu, \text{ сут}^{-1}$	T, сут
BBM (базовая среда)	0.053 ± 0.002	0.093 ± 0.009	7.4 ± 0.7
BBM-N	$0.040 \pm 0.004^{**}$	$0.079 \pm 0.006^{**}$	8.8 ± 0.7
BBM (с добавлением 10 г л^{-1} солей)	$0.029 \pm 0.001^*$	$0.069 \pm 0.002^*$	$10.0 \pm 0.3^*$
BBM (с добавлением 20 г л^{-1} солей)	$0.022 \pm 0.002^{**}$	$0.062 \pm 0.006^*$	$11.2 \pm 1.0^*$
BBM (с добавлением 30 г л^{-1} солей)	$0.015 \pm 0.001^{**}$	$0.038 \pm 0.003^{**}$	$18.3 \pm 1.6^{**}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ двухвыборочный односторонний t-тест. Условия культивирования: объем среды 25 мл, температура $28 \pm 1^\circ \text{C}$, 2000 лк

Анализ жирнокислотного состава биомассы *P. kessleri* IC-11 при культивировании в условиях высокой солености среды в стационарной и экспоненциальной фазах роста приведен в Таблице 17. Показано, что в присутствии 30 г л⁻¹ солей (среда BBM-S) в стационарной фазе роста штамм накапливает относительно небольшое количество ПНЖК 54.7 ± 0.8% по сравнению с биомассой, полученной при культивировании на среде BBM без солей (65.6 ± 1.2%). Было показано достоверное снижение содержания насыщенных жирных кислот C16:0 и C18:0 в стационарной фазе на всех средах, в то время как содержание ненасыщенных жирных кислот C18:1 и C18:2 достоверно увеличивалось ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест). Такой же эффект был обнаружен в работе [93], где исследовали влияние солевого стресса на накопление липидных капель у *P. kessleri*. 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 ± 0.7%.

Таблица 17 – Состав жирных кислот биомассы *P. kessleri* IC-11 при культивировании на среде BBM в присутствии стрессовых факторов

ЖК	%					
	Exp	St	Exp	St	Exp	St
	BBM (16 сут)	BBM (26 сут)	BBM-N (16 сут)	BBM-N (26 сут)	BBM-S (10 сут)	BBM-S (16 сут)
C14:0	1.1±0.1***	1.4±0.1** *	1.0±0	1.2±0	0.9±0	1.0±0
C16:0	28±0.9*	22.1±2.4*	28.8±1.9**	22.8±3.1**	33.8±2.1***	20.7±2***
C16:1	2.3±0.2*	2.1±0.3*	2.7±0.1***	1.2±0.2***	1.8±0.1	1.7±0.3
C16:2	5.1±0.3*	6.0±0.8*	5.1±0.1**	2.5±0.7**	2.7±0.2***	2.5±0.2***
C16:3	2.5±0.1	2.7±0.1	2.7±0.2*	2.1±0.4*	1.2±1	0.9±0.1
C18:0	15±0.1***	7.3±0.3** *	16.7±0.4***	7.7±0.5***	19.6±1.1***	7.7±0.2***
C18:1	1.0±0.1**	1.5±0.2**	0.9±0.2**	10.4±1.3**	1.7±0.8***	14.1±1.3***
C18:2	15.9±0.9**	25.1±2.2* *	14.8±2**	25.6±0.5**	17.7±1.9**	30.2±0.8**
C18:3	28.9±1.1***	31.8±1***	27.2±1.5	26.4±3	20.4±1	21.1±0.1
C20:0	0.2±0***	0.1±0***	0.1±0	0.1±0	0.2±0	0.3±0.1
НЖК	44.3±0.8***	30.9±0.8* **	46.6±1.2***	31.8±0.7***	54.5±1.6***	29.7±0.6***
ПНЖК	52.4±1.4***	65.6±1.2* **	49.8±1.0***	56.6±0.9***	42.0±1.2***	54.7±0.8***
МНЖК	3.3±0.2*	3.6±0.3*	3.6±0.2***	11.6±0.4***	3.5±0.2***	15.8±0.2***
НЖК +МНЖК	47.6±2.8**	34.5±1.1* *	50.2±1.1*	43.4±0.5*	58±1.7*	45.5±0.7*

Exp – экспоненциальная фаза роста, st – стационарная фаза роста.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ двухвыборочный односторонний t-тест (при сравнении экспоненциальной и стационарной фаз роста)

3.5.3 Метаболическое профилирование биомассы *P. kessleri* IC-11 в процессе культивирования на средах BBM и WW при солевом стрессе

Метаболическое профилирование биомассы при индукции накопления нейтральных липидов у 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 (объем среды BBM-S с 30 г л⁻¹ солей 150 мл, температура 28 ± 1 °С, 2000 лк). В процессе метаболического профилирования параллельно оценивали накопление биомассы, нейтральных липидов и углеводов (Рисунок 14, Таблица 18). Образцы для метаболического профилирования были взяты в экспоненциальной (7 сут без добавления солей и с солью) и в стационарной фазах (BBM и WW на 32 сут, WW-S на 16 сут, BBM-S на 19 сут) [338].

Результаты показали, что накопление биомассы при культивировании в среде WW было меньше, чем в среде BBM (Рисунок 14А, Таблица 18). Этот эффект отчасти можно объяснить сложным составом сточных вод [339]. У *P. kessleri* IC-11 накопление нейтральных липидов в среде WW-S превышало этот параметр в среде WW (Рисунок 14Б). Содержание углеводов в клетках в стационарной фазе роста было больше, чем в клетках, культивируемых в среде без добавления солей (Рисунок 14В), что также выражалось в увеличении скорости накопления углеводов в исходной среде (Таблица 18). Анализ динамики накопления нейтральных липидов и углеводов (Рисунок 14Б, В) выявил наличие феномена переключения метаболизма с синтеза углеводов на синтез нейтральных липидов при добавлении солей в культуральную среду. Об этом свидетельствует максимальное содержание углеводов в экспоненциальной фазе, а липидов - в стационарной фазе роста.

Анализ состава биомассы (Таблица 19) 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 ± 1.8%, соответственно), тогда как содержание углеводов в этот период оставалось относительно низким ($W_{\text{у}}$ 12.1 ± 2.6 и 10.3 ± 0.4%, соответственно). Стоит отметить, что содержание белка в стационарной фазе роста было достоверно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) выше в экспоненциальной фазе роста по сравнению со стационарной в средах без добавления солей.

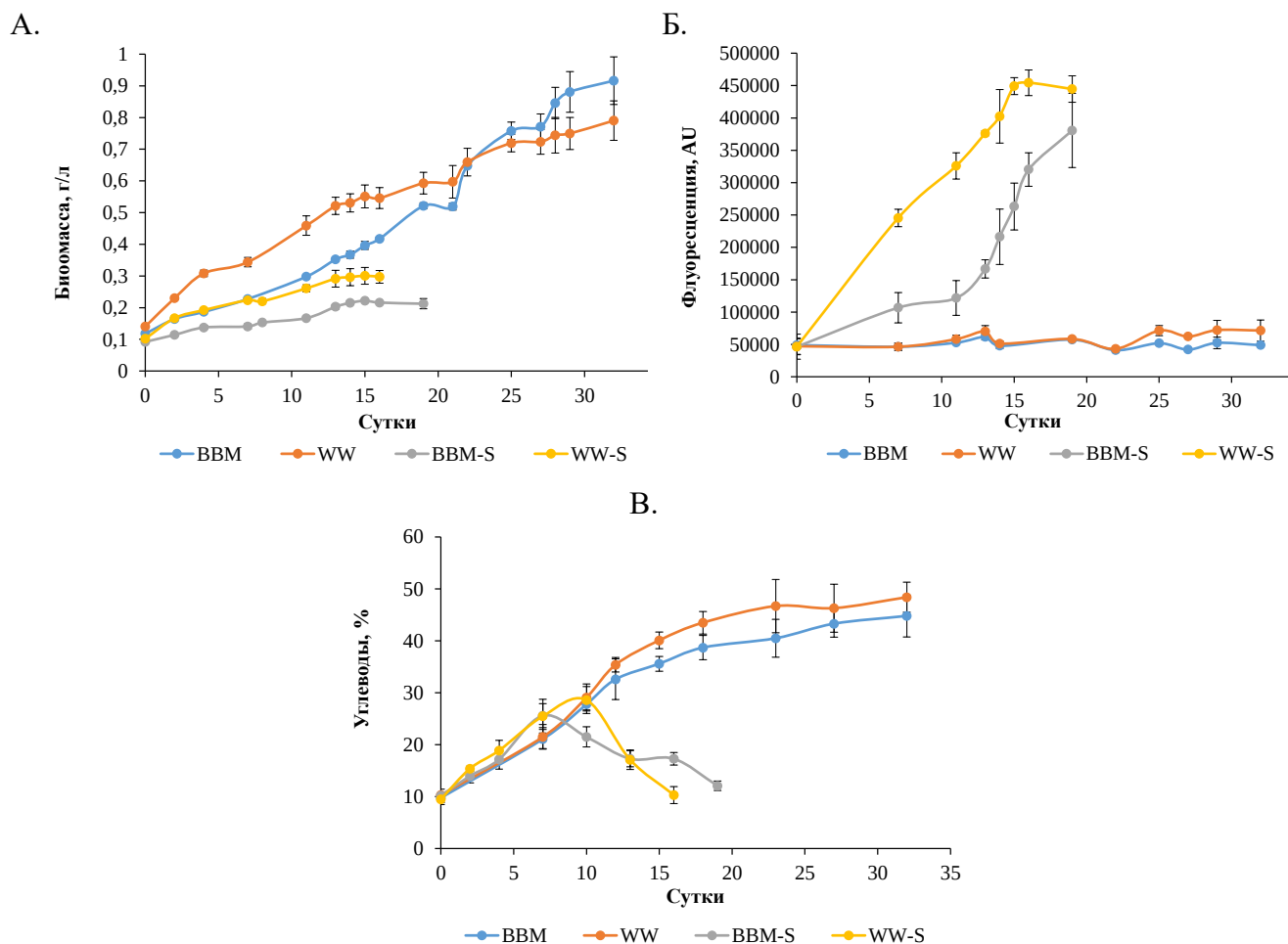


Рисунок 14 – Состав биомассы *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе при культивировании в средах BBM и WW: (А) Биомасса, (Б) Нейтральные липиды, (В) Углеводы. Условия культивирования: объем среды 150 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

Таблица 18 – Кинетические параметры культивирования *P. kessleri* IC-11 (метаболическое профилирование)

Параметр	Среда			
	BBM	WW	BBM-S	WW-S
V_6 , мг л ⁻¹ сут ⁻¹	$24.0 \pm 2.0^{**}$	17.0 ± 1.0	$18.0 \pm 1.0^{**}$	15.0 ± 1.0
μ , сут ⁻¹	0.056 ± 0.002	$0.058 \pm 0.002^{**}$	0.056 ± 0.003	$0.049 \pm 0.004^{**}$
T, сут	12.4 ± 1.1	$13.3 \pm 0.8^*$	12.4 ± 1.1	$14.1 \pm 1.1^*$
V_y , мг л ⁻¹ сут ⁻¹	$21.1 \pm 1.3^{***}$	$17.4 \pm 1.5^{**}$	$4.9 \pm 0.4^{***}$	$6.0 \pm 0.4^{**}$

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ двухвыборочный односторонний t-тест (при сравнении среды без и с добавлением 30 г л⁻¹ солей). Условия культивирования: объем среды 150 мл, температура 28 ± 1 °C, 2000 лк

Далее был проведен анализ состава культуральной жидкости в процессе культивирования *P. kessleri* IC-11 в среде WW, чтобы оценить возможность его применения для очистки сточных вод с высоким содержанием солей. Показано, что добавление солей в концентрации 30 г л⁻¹

значительно снижает эффективность удаления нитратов и ионов аммония из среды WW (Рисунок 15).

Таблица 19 – Состав биомассы *P. kessleri* IC-11 при метаболическом профилировании

Среда	W _y , %		W _л , %		W _б , %	
	exp	St	exp	st	exp	st
BBM	21.1±2.1**	44.8±4.0**	21.7±2.3*	17.3±0.5*	47.5±9.6*	32±1.6*
BBM-S	25.6±1.5**	12.1±2.6**	18.9±0.5***	33.3±1.3***	45.9±7.1	44.1±8.9
WW	21.5±2.4**	48.4±5.4**	16.8±1.1*	20.5±2.2*	46.6±8.5*	25±1.5*
WW-S	25.6±1.9**	10.3±0.4**	21.2±2.3***	31.0±1.8***	47.5±5.2	47.8±7.3

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ двухвыборочный односторонний t-тест при сравнении значений в экспоненциальной и стационарной фазах роста

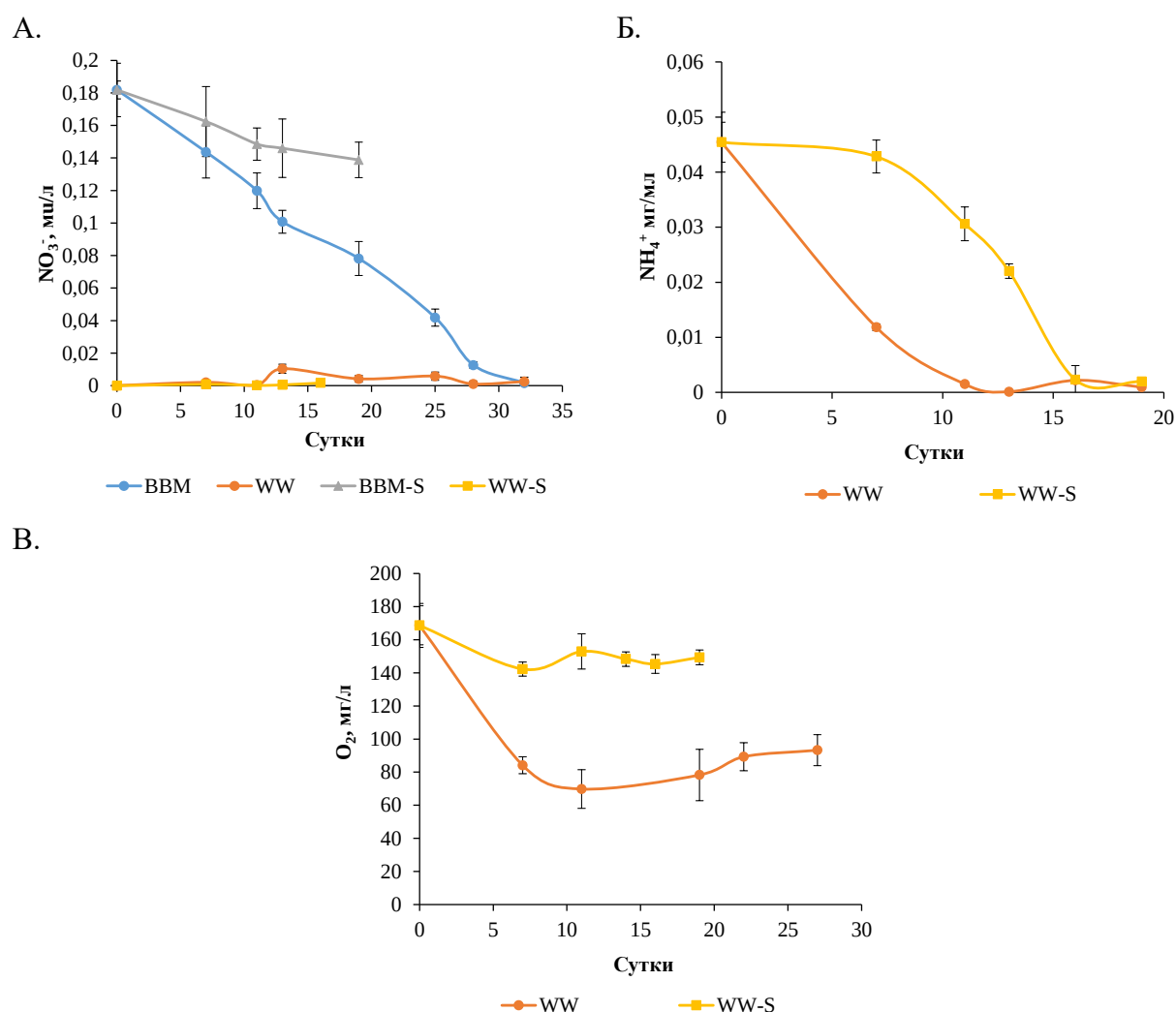


Рисунок 15 – Анализ параметров очистки воды при культивировании *P. kessleri* IC-11 в среде WW и WW-S: (А) NO₃⁻, (Б) NH₄⁺, (С) ХПК

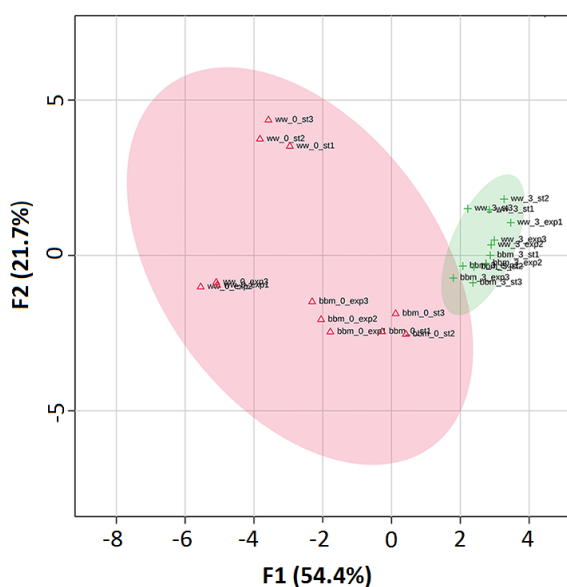
При культивировании *P. kessleri* IC-11 в среде BBM-S наблюдалось небольшое снижение потребления штаммом NO₃⁻ (на 23.6 ± 1.2%), в то время как в среде BBM полное снижение NO₃⁻

было достигнуто к концу культивирования. Незначительное количество NO_3^- было обнаружено в среде WW к концу культивирования, при этом NH_4^+ полностью поглощался к одиннадцатым и шестнадцатым суткам в среде WW без и с добавлением солей, соответственно. 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 (Рисунок 14А).

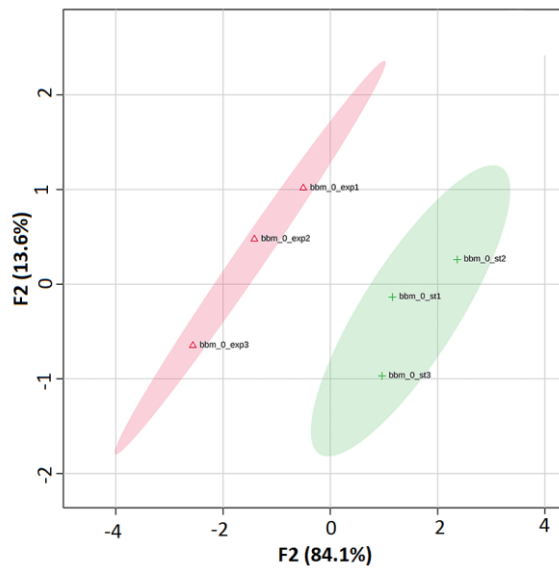
3.5.3.1 Анализ данных метаболического профилирования биомассы *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе

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) выявил 90 соединений, среди которых 11 не было идентифицировано. Для первоначального анализа был использован анализ РСА, что позволило снизить размерность данных (Рисунок 16).

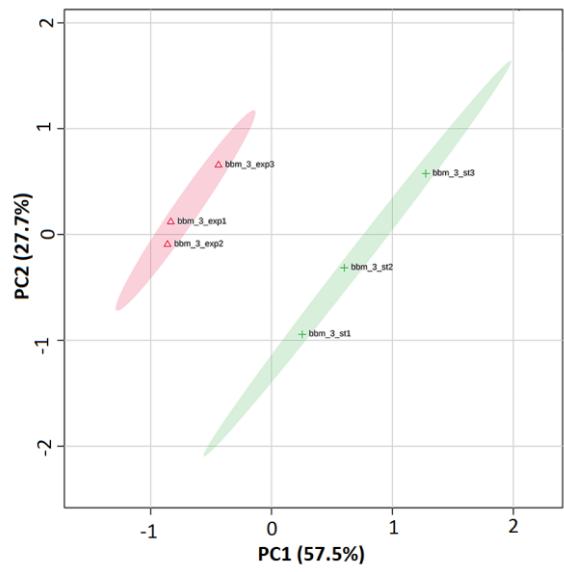
А.



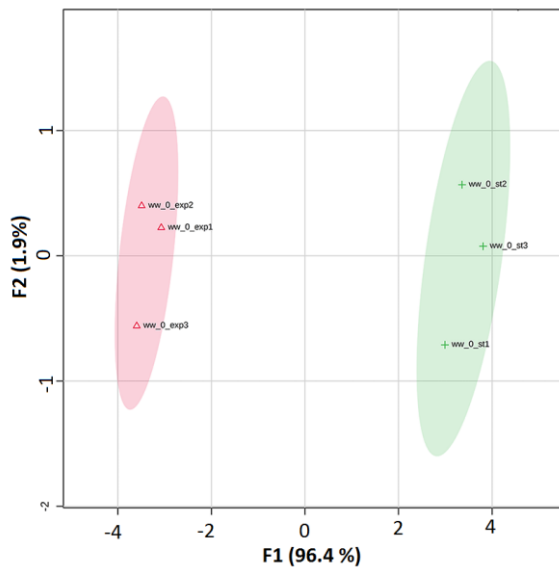
Б.



В.



Г.



Д.

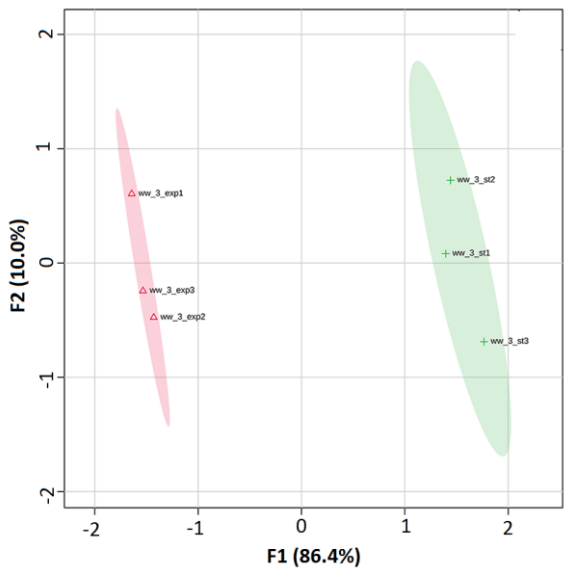
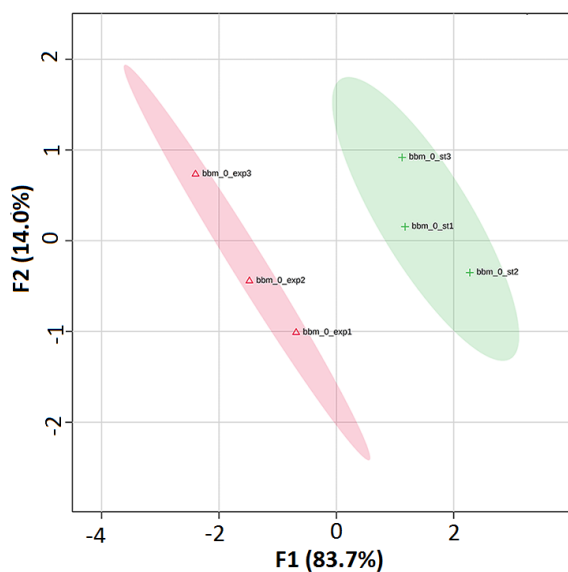


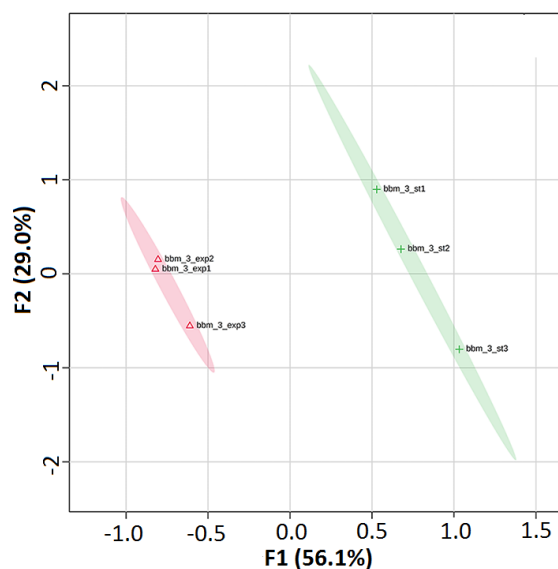
Рисунок 16 – Оценка влияния различных факторов на метаболизм *P. kessleri* IC-11 в экспоненциальной и стационарной фазах роста методом PCA. (А) Фаза роста, концентрация соли и тип среды, (Б) Фаза роста (среда BBM), (В) Фаза роста (среда BBM-S), (Г) Фаза роста (среда WW), (Д) Фаза роста (среда WW-S). Красным цветом отмечена экспоненциальная фаза роста, зеленым – стационарная

Для нормализации данных применялось центрирование по среднему, которое позволило наиболее точно разделить выборку на группы. Анализ различий в метаболизме показал, что на две основных компоненты приходится 54.4% дисперсии выборки (Рисунок 16). Также было обнаружено, что метаболиты при культивировании на средах без и с 30 г л⁻¹ солей образуют два отдельных кластера. Три дополнительных кластера были образованы метаболитами в обеих фазах роста на среде BBM.

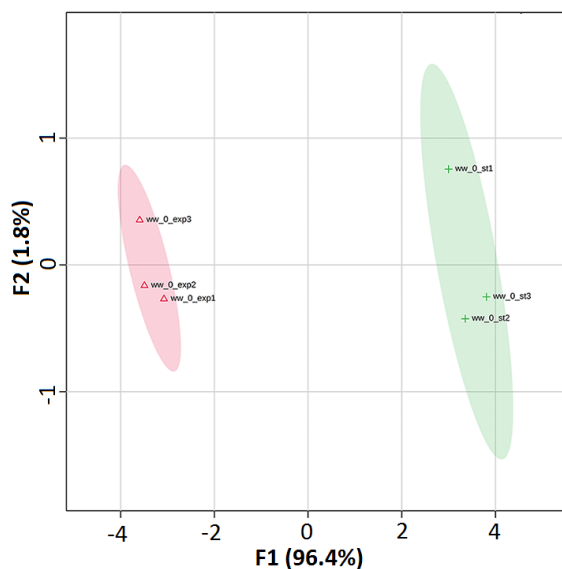
А.



Б.



В.



Г.

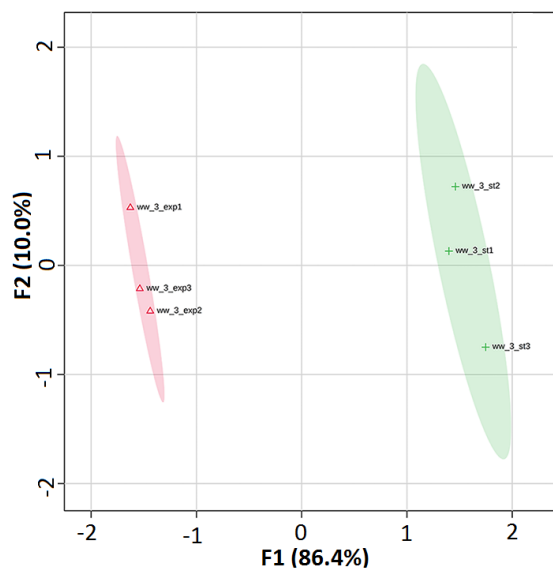


Рисунок 17 – PLS-DA анализ метаболизма *P. kessleri* IC-11 в экспоненциальной и стационарной фазах роста. (А) Среда BBM, (Б) Среда BBM-S, (В) Среда WW, (Г) Среда WW-S. Красным цветом отмечена экспоненциальная фаза роста, зеленым – стационарная

С целью оценки влияния солей на метаболизм *P. kessleri* IC-11 при культивировании на средах BBM и WW был проведен анализ различий метаболизма между экспоненциальной и стационарной фазами роста для всех четырех сред методом PLS-DA, результаты приведены на Рисунке 17. Значения R^2 и Q^2 (Таблица 20) показывают, что различия между группами, соответствующих экспоненциальной и стационарной фазам роста культур на разных средах, могут быть определены по сумме компонент F1 и F2. Соединения с $VIP > 1.0$ и $p < 0.05$ (Приложение Г) являются определяющими для поиска различий между профилями метаболизма в двух фазах роста и были рассчитаны на основе PLS-DA. Анализ показал, что эти метаболиты в основном включают углеводы, липиды и аминокислоты. Образцы, полученные на среде BBM без и с добавлением солей, имели значимую вариабельность концентрации метаболитов в разных фазах роста. Для выявления метаболических путей с наибольшими изменениями в процессе индукции синтеза нейтральных липидов при солевом стрессе проведено обогащение по метаболическим путям для всех соединений с $VIP > 1$ и $p < 0.05$ (Приложение Г). Метаболические пути, подверженные наибольшему изменению, были отобраны по следующим критериям: индекс воздействия > 0 , $FDR < 0.05$ и $p < 0.05$ (Таблица 21). На основании топологического анализа и ключевых метаболитов, выявленных при индукции накопления нейтральных липидов по показателям $VIP > 1$ и $p < 0.05$, была построена метаболическая карта *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе при культивировании в средах BBM (Рисунок 18) и WW (Рисунок 19).

Таблица 20 – Оценка уровня качества PCA и PLS-DA анализа метаболизма *P. kessleri* IC-11

Метод	Среда				
	BBM	BBM-S	WW-S	WW-S	Все среды
PCA (1 и 2 компонента, % от общей дисперсии)	81.4%	57.5%	96.4%	86.4%	54.4%
PLS-DA (1 и 2 компонента, % от общей дисперсии)	83.7%	56.1%	96.4%	86.4%	53.8%
R^2	0.8569	0.9538	0.993	0.9983	0.8456
Q^2	0.6774	0.8172	0.9836	0.9923	0.8156

Согласно полученным результатам (Таблица 21), метаболизм *P. kessleri* IC-11 при культивировании на средах BBM и WW без добавления соли не имеет существенных различий, за исключением метаболизма глицеролипидов (индекс воздействия > 0.1). Глицерин является основным компонентом этого метаболического цикла, его концентрация снижается в стационарной фазе роста при культивировании на среде BBM и увеличивается в 4.2 раза на среде WW (Рисунки 18-19). 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.

Анализ метаболизма на среде BBM-S (Рисунок 18) выявил увеличение концентрации галактозы и раффинозы (в 17.3 и 43.3 раза, соответственно) в стационарной фазе роста по сравнению со средой BBM. На обеих средах также наблюдалось снижение содержания

Таблица 21 – Анализ различий в метаболических путях *P. kessleri* IC-11 при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста в условиях солевого стресса

Среда	Метаболический путь	Количество веществ в цикле (общее)	Количество совпадений	<i>p</i> -значение $\times 10^{-3}$	$-\log(p)$	$FDR \times 10^{-3}$	Воздействие (индекс)
BBM	Метаболизм глицеролипидов	20	1	0.207	-3.68388	0.266	0.15113
	Метаболизм крахмала и сахарозы	21	1	7.283	4.9223	7.283	0.08967
	Метаболизм галактозы	27	4	0.648	7.3415	0.729	0.05538
BBM-S	Метаболизм пуринов	65	1	0.966	6.9419	1.0872	0.0766
	Метаболизм галактозы	27	3	0.0513	12.181	0.0462	0.0735
	Метаболизм серы	14	1	0.795	7.1377	1.0216	0.06452
	Метаболизм цистеина и метионина	43	1	0.795	7.1377	1.0216	0.05549
	Метаболизм глутатиона	27	1	0.795	7.1377	1.0216	0.0075
WW	Метаболизм глицеролипидов	20	1	0.422	7.7693	0.634	0.15113
	Метаболизм галактозы	27	5	0.0204	10.798	0.0613	0.10238
	Метаболизм крахмала и сахарозы	21	1	18.49	3.9906	18.49	0.08967
WW-S	Метаболизм аргинина и пролина	31	1	0.166	8.7017	0.277	0.11688
	Цикл трикарбоновых кислот	20	1	28.148	3.5703	28.148	0.09038
	Метаболизм галактозы	27	3	0.0524	12.159	0.0262	0.09018
	Метаболизм глиоксиловой кислоты	31	1	28.148	3.5703	28.148	0.02667

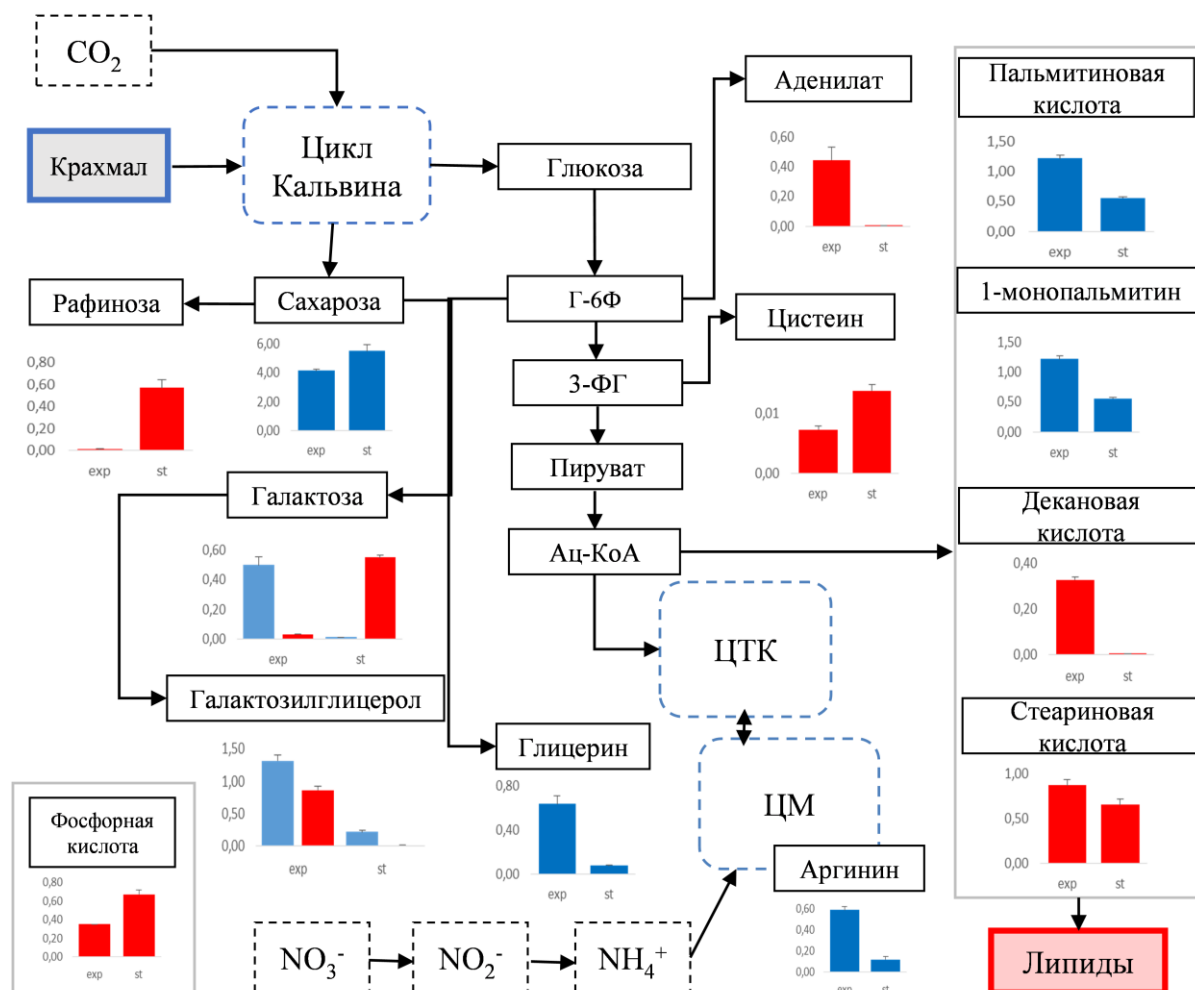


Рисунок 18 – Схема метаболизма *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе на среде ВВМ. Условные обозначения: Красными столбцами отмечена среда ВВМ-S, синими – ВВМ. Эксп – экспоненциальная фаза роста, st – стационарная

насыщенных моноглицеридов и жирных кислот, что коррелирует с жирнокислотным составом биомассы (Таблица 17). Отмечено увеличение концентрации цистеина (в 1.9 раза) в среде ВВМ-S. По сравнению со средой ВВМ, в среде WW-S во время накопления липидов отмечено выраженное снижение концентрации аденилата как части пуринового метаболизма (Таблица 21). Это указывает на переключение процесса накопления энергии в стационарной фазе с синтеза энергетических эквивалентов на синтез липидов, что ранее было предположено в отношении увеличения концентрации аденозина у микроводоросли *P. tricornutum* [340]. Накопление моносахаридов в клетках стационарной фазы роста при культивировании на среде ВВМ (Рисунок 18) указывает на запуск процесса катаболизма углеводов, который приводит к накоплению нейтральных липидов как части механизма переключения метаболизма на синтез липидов (Рисунок 14Б).

Изучение метаболизма *P. kessleri* IC-11 при культивировании в среде WW показало, что вклад различных циклов в метаболизм отличается от среды BBM. Наибольшие изменения 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 (Рисунок 18), что указывает на снижение накопления сложных углеводов в клетках (Рисунок 14В). Эти данные также коррелируют с данными [93], где анализ транскриптома показал, что накопление нейтральных липидов у *P. kessleri* на среде TAP с 350 мМ NaCl связано с увеличением экспрессии генов метаболизма пролина и повышением антиоксидантной активности при одновременном снижении активности липазы. Это явление связано с глобальной перестройкой биохимических циклов и морфологии клеток микроводорослей. Подобные эффекты также наблюдались при культивировании *C. reinhardtii* на среде TAP при добавлении солей [341]. Следовательно, метаболизм *P. kessleri* на среде TAP может быть близок к метаболизму при культивировании в среде WW.

Анализ метаболизма *P. kessleri* IC-11 показал, что накопление липидов в ответ на солевой стресс имеет существенные различия между стандартной средой BBM и средой WW. Учитывая, что WW содержит больше органических веществ, чем BBM, синтез липидов в среде с добавлением солей происходит более интенсивно (Рисунок 14Б). В этом случае накопление липидов на WW-S, вероятно, связано с накоплением эквивалентов энергии в цикле лимонной кислоты в экспоненциальной фазе, а также с окислением пролина с образованием 30 молекул АТФ [342]. Эти метаболиты можно рассматривать как индикаторы процесса переключения метаболизма на синтез нейтральных липидов, происходящего в солевой среде. Более того, накопление нейтральных липидов во время культивирования *P. kessleri* IC-11 на среде BBM-S может происходить из-за истощения пула эквивалентов энергии (АТФ), образующегося в других метаболических циклах, включая метаболизм глюкозы в цикле гликолиза.

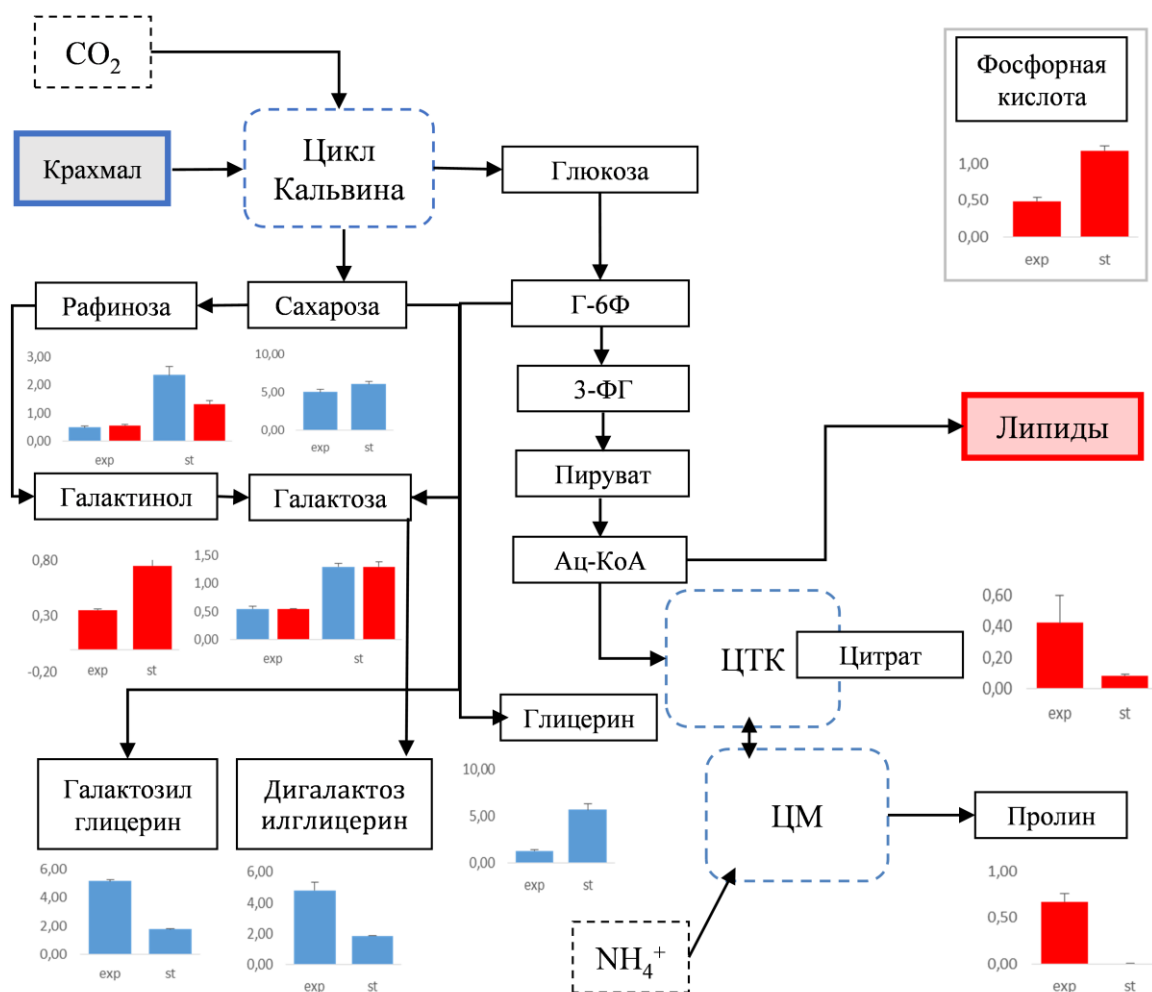


Рисунок 19 – Схема метаболизма *P. kessleri* IC-11 при солевом стрессе на среде WW. Красными столбцами отмечена среда WW-S, синими – WW. Exp – экспоненциальная фаза роста, st – стационарная

3.6 Сравнительная характеристика штаммов микроводорослей, исследованных в работе

3.6.1 Сравнение кинетических параметров культивирования штаммов микроводорослей и их биохимических свойств

Для анализа характеристик штаммов микроводорослей, исследованных в работе, было проведено сравнение их свойств со штаммами, выращенными в аналогичных условиях, описанных в литературе. Результаты представлены в Таблице 22. Из приведенной таблицы можно заключить, что использованные в работе штаммы с высоким уровнем накопления липидов на среде ВВМ обладали почти в два раза большей скоростью накопления биомассы по сравнению со штаммами, выращенными на среде WW ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест). В

то время как процентное содержание липидов в биомассе в стационарной фазе роста при культивировании на обеих средах остается сравнимым, скорость накопления липидов значительно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) снижалась на среде WW. Содержание углеводов и белков носило лишь индивидуальные различия у отдельных штаммов. Добавление 30 г л⁻¹ соли в среду для культивирования *P. kessleri* IC-11 привело к увеличению содержания липидов и к снижению накопления углеводов в биомассе.

Таблица 22 – Ключевые кинетические и биохимические параметры культивирования штаммов, исследованных в работе

Сред а	Штаммы (исследованные в работе)	Биомасса	Липиды		Углеводы		Белок	Аналог/ссылка на источник
		V _б , мг л ⁻¹ сут ⁻¹	V _л , мг л ⁻¹ сут ⁻¹	W _л , %	V _у , мг л ⁻¹ сут ⁻¹	W _у , %	W _б , %	
BBM	<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	53.70 ±0.37 ***	23.5±2.1 **	24.8±3.3	-	39±2.2	38.5±1.7	<i>C. sorokiniana</i> [343]; <i>C. sorokiniana</i> CS-01 [344], <i>C. sorokiniana</i> UTEX 1230 [344] <i>C. sorokiniana</i> 2714 [344] <i>C. sorokiniana</i> UTEX 1230 [345] <i>C. sorokiniana</i> NIES-2168 [346]
	<i>C. sorokiniana</i> IC-62	60.18 ±0.48 **	27.6±1.3 ***	30.5±2.1 ***	-	42±1.5**	28.7±1.4 **	<i>C. sorokiniana</i> [343]; <i>C. sorokiniana</i> CS-01 [344], <i>C. sorokiniana</i> UTEX 1230 [343] <i>C. sorokiniana</i> 2714 [344] <i>C. sorokiniana</i> UTEX 1230 [345] <i>C. sorokiniana</i> NIES-2168 [346]
	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	69.3±0.45* *	30.6±0.9 **	39.2±3.8 *	-	30.2±1.8 *	33.2±0.8 *	<i>M. reisseri</i> [347]
	<i>Micractinium</i> sp. IC-76	67.41 ±0.33 **	29.1±1.7 ***	35.5±2.8	-	32.5±1.3 ***	32.9±1.0	<i>M. reisseri</i> [347]
	<i>C. vulgaris</i> A1123	35.8±0.24	13.7±0.2	38.3±1.0	-	37.8±1.4	26.0±1.2	<i>Chlorella</i> UMACC001 [329] <i>Chlorella</i> sp. AE10 [348]
	<i>S. abundans</i> A1175	73.82 ±4.53	32.8±1.5	44.4±2.7	-	43.3±1.2	15.7±0.7	<i>S. abundans</i> [349], [350] <i>Scenedesmus</i> sp. NT1d и <i>S. dimorphus</i> NT8 [351]
	<i>C. sorokiniana</i> A1135	10.60 ±0.34	3.3±0.1	31.2±3.4	-	40.7±2.8	30.3±1.5	<i>C. sorokiniana</i> [343]; <i>C. sorokiniana</i> CS-01, UTEX 1230 и 2714 [344] <i>C. sorokiniana</i> UTEX 1230 [345] <i>C. sorokiniana</i> NIES-2168 [346]
	<i>S. obliquus</i> A1167	20.85 ±0.71	8.6±0.7	31.4±2.2	-	44.1±2.2	27.8±0.7	<i>S. obliquus</i> [352]

	<i>Botryococcus</i> sp. A1162	29.61 ±1.46	9.9±0.3	23.4±2.3	-	46.3±1.1	31.1±2.2	<i>Botryococcus</i> sp. MCC 32 [353]
	<i>P. kessleri</i> IC-11	24.0±2.0**	-	17.3±0.5*	21.1±1.3***	44.8±4.0*	32±1.6** *	<i>P. kessleri</i> CCALA 255 [334], <i>P. kessleri</i> UTEX2229 [354]
BBM-S	<i>P. kessleri</i> IC-11	18.0±1.0** *	-	33.3±1.3**	4.9±0.4* **	12.1±2.6***	44.1±8.9	<i>P. kessleri</i> [93]
WW	<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	36.62 ±1.63***	9.38±0.42**	25.62±0.87	20.7±0.8	38.6±2.2	29.88±1.7	[343]
	<i>C. sorokiniana</i> IC-62	38.96 ±4.79**	8.05±1.53***	21.43±2.32***	24.5±1.7	44.4±1.2**	34.17±2.3**	[343], [355]
	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	34.91 ±2.86**	10.11±0.83**	28.97±0.49*	21.4±1.9	32.1±0.7*	38.93±3.5*	<i>M. reisseri</i> [356]
	<i>Micractinium</i> sp. IC-76	37.18 ±4.12**	13.49±1.50***	36.29±0.11	22.2±1.1	31.2±1.3***	32.51±2.5	<i>M. reisseri</i> [365]
	<i>P. kessleri</i> IC-11	17.0±1.0**	-	20.5±2.2*	17.4±1.5***	48.4±5.4*	25±1.5** *	<i>P. kessleri</i> -I [357]
WW-S	<i>P. kessleri</i> IC-11	15.0±1.0** *	-	31.0±1.8**	6.0±0.4* **	10.3±0.4* **	47.8±7.3	<i>P. kessleri</i> [93]

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ - двухвыборочный односторонний t-тест (при сравнении кинетических параметров на среде BBM и WW)

3.6.1.1 Культивирование в среде BBM

Согласно литературным данным, относительно хорошо изучен вопрос о накоплении биомассы и липидов у отдельных штаммов микроводорослей при культивировании на среде BBM. Сравнение характеристик использованных в работе штаммов со свойствами аналогичных штаммов, выращенных в сходных условиях и описанных в литературе показало, что скорость накопления биомассы *C. sorokiniana* в работе [343] на среде BBM составила $35.5 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, что меньше, чем значения, полученные для *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. sorokiniana* IC-62 и *C. sorokiniana* A1135 (Таблица 10). Уровень накопления липидов для штаммов, исследуемых в этой работе, был меньше ($W_{\text{л}} 24.8 \pm 3.3 - 31.2 \pm 3.4\%$), чем у штамма *C. sorokiniana* UTEX 1230 ($W_{\text{л}} 38.7 \pm 0.9\%$) при культивировании на среде BBM [345]. Измерения количества липидов у штамма *C. vulgaris* A1123 ($W_{\text{л}} 38.3 \pm 1.0\%$) [358] показали, что их содержание было сравнимо со значением, полученным для штамма *Chlorella* UMACC001 ($W_{\text{л}} 41.77 \pm 1.83\%$) в стационарной фазе роста [319]. Содержание общих липидов *C. sorokiniana* в стационарной фазе роста в среде BBM в работе [344] составило свыше 50%, что превышает показатели аналогичных штаммов в

настоящей работе и может быть связано с использованием для культивирования более эффективного тубулярного фотобиореактора.

Содержание общих липидов у штаммов, характеризующихся их наибольшим накоплением (*Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76), было меньше, чем у штамма *M. reisseri* ($W_{\text{л}} 40 \pm 3.1\%$) при культивировании в среде BBM [347]. Количество липидов в биомассе *S. abundans* A1175 ($W_{\text{л}} 44.4 \pm 2.7\%$) превышало аналогичный показатель для *S. abundans* в работе [349], составляющий $32.77 \pm 0.6\%$, однако оно было меньше, чем в работе [350] при его культивировании в среде BBM без добавления соединений азота ($W_{\text{л}} 67.59 \pm 2.17\%$) и было близко при исходной концентрации NO_3^- ($W_{\text{л}} 49.93 \pm 0.97\%$). Показано, что штамм *S. abundans* A1175, полученный в этой работе, имеет схожую скорость накопления биомассы и большее содержание липидов (Таблицы 10 - 11), чем штамм *S. abundans* NCIM 2897 ($V_6 70.23 \pm 0.001 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) [27].

Для *S. obliquus* A1167 было выявлено меньшее содержание липидов в сравнении с описанными в литературе штаммами. Количество липидов в биомассе штамма *S. obliquus* в работе [352] составило около 22.3% при культивировании на среде BBM, что меньше, чем содержание липидов у штамма *S. obliquus* A1167, которое составило $31.4 \pm 2.2\%$. При этом содержание липидов и углеводов у штамма *Botryococcus* sp. MCC 32 на 30 сутки культивирования в среде BBM составило 42.81 ± 0.3 и $38.05 \pm 0.15\%$, соответственно [353]. У исследованного в настоящей работе штамма *Botryococcus* sp. A1162 содержание липидов было меньше ($W_{\text{л}} 23.4 \pm 2.3\%$), а углеводов – больше ($W_{\text{у}} 46.3 \pm 1.1\%$) по сравнению с *Botryococcus* sp. MCC 32. Скорость накопления биомассы *Botryococcus* sp. MCC 32 при культивировании на среде BBM составила $6.14 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, что значительно меньше аналогичного значения у *Botryococcus* sp. A1162.

Штаммы, по данным первичного отбора характеризовавшиеся высоким уровнем накопления углеводов и относящиеся к *P. kessleri*, исследованные в этой работе, мало накапливали нейтральные липиды (Рисунок 1Б). Ранее было показано, что особый режим культивирования штамма *P. kessleri* CCALA 255, основанный на переносе клеток, выращенных в богатой среде, на обедненную, позволил увеличить содержание липидов в биомассе до 60% при содержании липидов в стандартных условиях не более 10% [334]. В работе [354] было показано, что при снижении концентрации азотистых соединений в среде штамм *P. kessleri* UTEX2229 способен накапливать 38-46% липидов. Таким образом, не у всех штаммов *P. kessleri* может наблюдаться высокий уровень продукции липидов при использовании стандартных сред для культивирования, что подтверждают результаты, полученные в этой работе (Рисунок 1Б).

Штамм *C. sorokiniana* NIES-2168 при культивировании в миксотрофных условиях (на среде с ацетатом натрия) обладал скоростью накопления углеводов, равной $695 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, что превышает аналогичный показатель в фотоавтотрофных условиях для штаммов, относящихся к

C. sorokiniana, исследованных в этой работе [346]. Различия могут быть связаны с использованием полунепрерывного процесса культивирования в миксотрофных условиях. В работе [348] показано увеличение накопления углеводов у штамма *Chlorella* sp. AE10 до 42% по массе при использовании двухстадийного процесса, при котором на второй стадии увеличивали концентрацию CO₂ и интенсивность освещения.

Показано, что концентрация белка в биомассе была относительно высокой у протестированных в работе штаммов, относящихся к р. *Chlorella* (W_6 26.0±1.2 - 38.5±1.7%), а также у *Botryococcus* sp. A1162 (W_6 31.1 ± 2.2%) при культивировании на среде BBM. Полученные значения были несколько меньше, чем упомянутые в работе [319], где содержание белка в биомассе штамма *Chlorella* UMACC001 в стационарной фазе роста составило более 45%. Для штаммов *C. sorokiniana* CS-01, UTEX 1230 и 2714 [344] при культивировании на среде BBM содержание белка составило 25–35%, что близко к значениям для штаммов *C. sorokiniana*, использованных в этой работе (Таблица 11). Содержание белка у *S. abundans* A1175 было ниже, чем у других близкородственных видов, например, *Scenedesmus* sp. NT1d (W_6 33,08%) и *Scenedesmus dimorphus* NT8c (W_6 22.66%) [351]. Среди протестированных в работе штаммов *C. sorokiniana* IPPAS C-1 обладает самым высоким уровнем накоплением белка (W_6 38.5 ± 1.7%), причем это значение сравнимо с описанными в литературе штаммами [344].

3.6.1.2 Культивирование в среде WW

По полученным результатам можно заключить, что все штаммы, относящиеся к *C. sorokiniana*, протестированные в работе, обладали сравнимыми V_6 и μ при культивировании на среде WW (Таблицы 12, 22). Тем не менее, эти значения были меньше, чем у *C. sorokiniana* (μ = 0.801 сут⁻¹) в работе [355], при его культивировании в сточных водах в реакторе колонного типа. Удельная скорость накопления биомассы для штамма *C. sorokiniana* UTEX1230 в работе [343] при выращивании на разбавленных стерилизованных сточных водах составила 0.06 ч⁻¹, что превышает значения, полученные в данной работе для штаммов *C. sorokiniana* IPPAS C-1 (μ = 0.12 ± 0.00 сут⁻¹) и *C. sorokiniana* IPPAS IC-62 (μ = 0.12 ± 0.01 сут⁻¹) (Таблица 10). Таким образом, условия, использованные в данной работе для культивирования на сточных водах штаммов, относящихся *C. sorokiniana*, были менее благоприятными для роста биомассы, чем в других исследованиях, что привело к ее меньшему накоплению. Тем не менее, для *C. sorokiniana* в работе [343] V_d составляет 2.38 мг л⁻¹ сут⁻¹, что меньше, чем аналогичные значения для *C. sorokiniana* IPPAS C-1 и *C. sorokiniana* IC-62 (V_d 9.38 ± 0.42 и 8.05 ± 1.53 мг л⁻¹ сут⁻¹, соответственно). В работе

[256] применили штамм *M. reisseri* для очистки предварительно очищенных и фильтрованных бытовых сточных вод. Показано, что *M. reisseri* накапливал до 40% липидов в этих условиях, что превышает показатели высоколипидных штаммов *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 ($W_{\text{л}} 28.97 \pm 0.49$ и $36.29 \pm 0.11\%$, соответственно). Данные по культивированию *P. kessleri* на муниципальных сточных водах в литературе ограничены. Известно, что для штамма *P. kessleri*-I [357] была достигнута концентрация биомассы 0.308 г л^{-1} в экспоненциальной фазе роста, что меньше, чем аналогичное значение для *P. kessleri* IC-11 ($0.79 \pm 0.6 \text{ г л}^{-1}$), исследования уровня накопления липидов и углеводов в этих условиях не проводили.

3.6.1.3 Культивирование штаммов на средах с высоким содержанием солей

Изучение влияния солей на состав биомассы микроводорослей на сточных водах носит ограниченный характер. В проведенных ранее исследованиях проводили оценку состава биомассы, полученной в основном на синтетических средах, а не на реальном субстрате. В работе [93] показано, что при добавлении 350 мМ NaCl в среде TAP в стационарной фазе роста биомасса *P. kessleri* содержала: липиды – 51%, углеводы – 28.6%, белок – 17.1%. В сравнении с этим штаммом содержание липидов у *P. kessleri* IC-11 при культивировании в BBM-S было меньше ($W_{\text{л}} = 33.3 \pm 1.3\%$), как и углеводов ($W_{\text{у}} = 12.1 \pm 2.6\%$), что может объясняться различиями в используемых для культивирования средах и индивидуальными особенностями штаммов (*P. kessleri* IC-11 на среде BBM преимущественно накапливал углеводы). Например, для штамма *C. sorokiniana* SLA-04 при культивировании на среде BG-11 при недостатке в среде Ca^{2+} и Mg^{2+} было показано трехкратное увеличение синтеза липидов и полуторакратное увеличение синтеза углеводов [359]. При культивировании штамма *C. sorokiniana* CG12 [360] в среде BBM выявлено, что увеличение концентрации CaCl_2 приводит к увеличению содержания липидов с 12.56% (5 мМ CaCl_2) до 40.02% (25 мМ CaCl_2), что объясняется участием Ca^{2+} в множестве внутриклеточных сигнальных путей [361].

3.6.2 Сравнительный анализ состава жирных кислот в биомассе штаммов микроводорослей

3.6.2.1 Состав биомассы при культивировании в среде BBM

Для выявления статистически значимых отличий между штаммами по накоплению отдельных жирных кислот при культивировании был проведен однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным множественным сравнением по тесту Тьюки (Рисунок 5) для штаммов, которые были ранее протестированы на среде BBM. По данным анализа состава биомассы наибольшим достоверным ($p < 0.05$) содержанием C16:0 в стационарной фазе роста по сравнению с другими штаммами обладал штамм *S. abundans* A1175 ($72.8 \pm 5.8\%$). Наибольшим достоверным содержанием C18:0 по сравнению с остальными протестированными штаммами ($p < 0.05$) обладают *C. vulgaris* A1123 ($27.8 \pm 4.9\%$), *S. abundans* A1175 ($27.5 \pm 0.1\%$) и *C. sorokiniana* A1135 ($29.3 \pm 4.6\%$). Высоким содержанием C18:1 по сравнению с остальными штаммами ($p < 0.05$) отличаются *C. sorokiniana* IC-62 ($24.4 \pm 1.9\%$), *Micractinium* sp. IC-76 ($27.4 \pm 2.4\%$), *Micractinium* sp. IC-44 ($26.1 \pm 1.3\%$) и *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($25.7 \pm 1.2\%$). Наибольшее количество C18:2 ($p < 0.05$) по сравнению с другими штаммами отмечено у штаммов *Botryococcus* sp. A1162 ($20.2 \pm 4.7\%$) и *C. vulgaris* A1123 ($21.5 \pm 3.4\%$), однако между ними статистически значимых отличий не выявлено. По содержанию НЖК достоверно ($p < 0.05$) отличались от других штаммов *C. vulgaris* A1123 ($47.6 \pm 2.4\%$), *S. abundans* A1175 ($46.7 \pm 1.9\%$) и *C. sorokiniana* A1135 ($35.2 \pm 2.8\%$), но не между собой. По данным статистического анализа также было установлено, что *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1 также достоверно ($p < 0.05$) отличаются от остальных штаммов (но не между собой) по уровню накопления МНЖК (27.2 ± 1.6 , 31.2 ± 2.2 , 30.3 ± 2.7 и $30.3 \pm 1.2\%$, соответственно). По уровню ПНЖК достоверных отличий между штаммами не было обнаружено.

По данным литературы, основными жирными кислотами, обнаруживаемыми у микроводорослей при культивировании на среде BBM, являются: C16:0, C16:3, C18:2 и C18:3 [362]. В стационарной фазе роста основными жирными кислотами у исследуемых в работе штаммов были C16:0, C18:0, C18:1 и C18:2 (Рисунок 5). При культивировании штаммов *C. sorokiniana* CS-01, UTEX 1230 и UTEX 2714 как в среде BBM, так и в 10% муниципальных сточных водах, уровни C16:0, C18:1 и C18:2 увеличивались, в то время как содержание C16:3 и C18:3 снижалось [344]. В отличие от этих штаммов у *C. sorokiniana*, использованных в этой работе, изменения содержания C18:3 не наблюдалось (Рисунок 5). Штаммы, относящиеся к р. *Chlorella* и р. *Micractinium*, исследованные в этой работе (Рисунок 5), при культивировании на среде BBM обладали меньшим суммарным уровнем накопления НЖК и МНЖК в стационарной

фазе роста ($61.6 \pm 1.5 - 67.0 \pm 3.4\%$), однако имели более высокое содержание ПНЖК ($33.0 \pm 3.3 - 38.3 \pm 1.8\%$), чем *S. abundans* A1175 ($27.1 \pm 2.7\%$). Таким образом, применение штаммов в процессах получения биомассы с высоким содержанием липидов, относящихся к р. *Chlorella* и р. *Micractinium*, возможно только при дальнейшей оптимизации условий культивирования, а также изучения их метаболизма с целью последующего его направленного изменения. Стоит отметить, что содержание C18:2 у *Micractinium* sp. IC-76 и *Micractinium* sp. IC-44 было почти в два раза меньше, чем у штамма *M. reisseri* при культивировании в среде BBM в оптимальных условиях (41.85%) [363].

Наибольшее суммарное содержание НЖК и МНЖК в стационарной фазе роста при культивировании на среде BBM зафиксировано для *S. abundans* A1175 ($72.8 \pm 5.8\%$, Рисунок 5), что является самым высоким значением для исследуемых в данной работе штаммов микроводорослей. Суммарное содержание МНЖК и НЖК для *S. abundans* A-1175 было близко к значениям, полученным для *S. abundans* в других исследованиях - 76% [350] и 74.21% [27]. При этом количество основных жирных кислот у *S. abundans* A1175 составило C16:0 – $14.3 \pm 0.9\%$, C18:0 – $19.7 \pm 0.7\%$, C18:1 – $18.3 \pm 4.5\%$, что отличается от аналогичных штаммов: у *S. abundans* в работе [350] оно составило C16:0 ~ 17.5%, C18:0 ~ 11.5%, C18:1 > 35%; а у *S. abundans* NCIM 2897 в работе [27] C16:0 – 32.53%, C18:0 – 0%, C18:1 – 22.96%. Таким образом, количество НЖК у *S. abundans* A1175 превышает показатели аналогичных штаммов, что делает биодизельное топливо на его основе более устойчивым к окислению.

3.6.2.2 Сравнение состава жирных кислот микроводорослей при культивировании в средах BBM и WW

Среда BBM является базовой для проведения экспериментов по анализу состава биомассы микроводорослей, однако может отличаться от состава, получаемого при культивировании на реальном субстрате (сточных водах). В связи с этим было проведено дополнительное сравнение жирнокислотного состава штаммов микроводорослей, относящихся к *C. sorokiniana* и *Micractinium*, которые также характеризуются высоким уровнем накопления нейтральных липидов при культивировании на среде BBM и WW (Таблица 23).

Сравнительный анализ состава жирных кислот биомассы при культивировании на средах BBM и WW выявил статистически значимое ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) увеличение содержания НЖК в стационарной фазе роста при культивировании всех штаммов на среде WW (до $53.5 \pm 4.3 - 54.9 \pm 1.8\%$), а также содержания C16:0 и C18:0 ($p < 0.05$,

Таблица 23 – Жирнокислотный состав штаммов с высоким уровнем накопления нейтральных липидов в стационарной фазе роста при культивировании на среде BBM и WW

Среда	ЖК	Штамм			
		IPPAS C-1	IC-62	IC-44	IC-76
BBM	C16:0	14.4 ± 1.0**	15.3 ± 0.7***	14.8 ± 0.7*	14.7 ± 0.5**
	C16:1	4.2 ± 0.3***	2.9 ± 0.2***	4.2 ± 0.1***	3.9 ± 0.3***
	C16:2	5.2 ± 0.2*	3.6 ± 0.2***	4.1 ± 0.2*	5.3 ± 0.2**
	C16:3	9.3 ± 0.7**	7.2 ± 0.3**	7.0 ± 0.4	6.3 ± 0.3***
	C18:0	18.1 ± 1.2***	19.6 ± 1.5***	19.4 ± 1.5***	14.6 ± 0.5***
	C18:1	25.7 ± 1.2***	24.4 ± 1.9***	26.1 ± 1.3**	27.4 ± 2.4**
	C18:2	7.3 ± 0.6	7.3 ± 0.5**	7.5 ± 0.4*	8.1 ± 0.4***
	C18:3	12.4 ± 0.8	17.4 ± 1.2***	14.2 ± 0.8***	17.2 ± 1.0***
	C20:0	0.1 ± 0.0	-	-	-
	C20:1	0.2 ± 0.0***	-	-	-
	НЖК	33.9 ± 1.4***	36.3 ± 1.8**	35.7 ± 2.1***	30.2 ± 1.5***
	МНЖК	30.3 ± 1.2***	27.2 ± 1.6***	30.3 ± 2.7***	31.2 ± 2.2***
	ПНЖК	35.8 ± 3.6***	36.7 ± 1.8**	34 ± 3.4***	38.3 ± 1.8***
	НЖК + МНЖК	64.2 ± 1.5	63.5 ± 5.7	66 ± 5.9	61.6 ± 1.5
WW	C16:0	19.4 ± 1.6**	21.1 ± 0.5***	20.4 ± 2.1*	21.5 ± 1.8**
	C16:1	1.4 ± 0.2***	1.1 ± 0.3***	0.9 ± 0.3***	0.8 ± 0.1***
	C16:2	4.6 ± 0.7*	6.3 ± 0.1***	3.3 ± 0.4*	4.4 ± 0.4**
	C16:3	6.9 ± 0.2**	5.5 ± 0**	3.6 ± 0.4	4.4 ± 0.3***
	C18:0	34.1 ± 0.6***	31.1 ± 0.7***	33.5 ± 0.5***	32.7 ± 0***
	C18:1	13.3 ± 1.8***	12 ± 1.8***	18.2 ± 0.1**	13.8 ± 0.9**
	C18:2	7.2 ± 1.6	11.9 ± 1.5**	11.8 ± 2.6*	13.2 ± 0.6***
	C18:3	11.3 ± 2.1	8.9 ± 0.6***	6.5 ± 0.4***	7.5 ± 1.4***
	C20:0	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0	0.2 ± 0.1
	C20:1	0.7 ± 0***	0.7 ± 0	0.9 ± 0	1.0 ± 0
	НЖК	54.6 ± 2.5***	53.5 ± 4.3**	54.7 ± 3.4***	54.9 ± 1.8***
	МНЖК	15.4 ± 1.1***	13.8 ± 1.4***	20 ± 2***	15.6 ± 1.4***
	НЖК + МНЖК	70.0 ± 3.3***	67.3 ± 4.7**	74.7 ± 4.2***	70.5 ± 2.1***

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ двухвыборочный односторонний t-тест (при сравнении состава ЖК при культивировании штамма на BBM и WW)

двухвыборочный односторонний t-тест). Дополнительно у штаммов *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 в полтора раза увеличивалось содержание C18:2 ПНЖК ($p < 0.05$) При этом суммарное содержание НЖК и МНЖК при культивировании штаммов на WW превышало аналогичное значение при культивировании на BBM ($p < 0.01$). Наибольшим суммарным значением НЖК и МНЖК при культивировании на WW отличался штамм *Micractinium* sp. IC-44 ($74.7 \pm 4.2\%$), что близко аналогичному показателю для *S. abundans* A1175 ($72.8 \pm 5.8\%$) при культивировании на среде BBM (Рисунок 5). Аналогичный эффект был

описан в работе [364], где биомасса микроводоросли *C. sorokiniana* при выращивании в среде BG11 содержала больше ПНЖК ($26.9 \pm 11.09\%$), чем при выращивании на сточных водах ($22.01 \pm 6.96\%$). Биомасса микроводорослей, исследованных в работе, выращенная на WW, содержала более высокий уровень НЖК и МНЖК, чем на среде BBM. Этот эффект может быть связан с низким содержанием соединений азота в сточных водах, что приводит к увеличению содержания НЖК [355]. Таким образом, использование среды WW для культивирования благоприятствует накоплению НЖК по сравнению со средой BBM, что также позволяет увеличить суммарное содержание ненасыщенных и мононенасыщенных жирных кислот и улучшить качество липидов, предназначенных для использования в процессах получения биотоплива.

По данным Рисунка 7, основными жирными кислотами при культивировании штаммов с высоким содержанием липидов *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 на среде WW, как и в случае культивирования на BBM, являются C16:0, C18:0, C18:1 и C18:2, при этом в ряде штаммов, описанных в литературе, при культивировании в сходных условиях также обнаруживается C18:3 [364]. При выращивании в среде WW штамм *Micractinium* sp. IC-44 обладает наибольшим суммарным содержанием МНЖК и ЖК ($74.7 \pm 4.2\%$). В работе [356] было показано, что при культивировании штамма *M. reisseri* на фильтрованных и вторично очищенных муниципальных сточных водах наблюдалось невысокое содержание НЖК (40.13%) и МНЖК (11.55%), что значительно ниже, чем суммарное содержание НЖК и МНЖК у штаммов, относящихся к *Micractinium* sp., исследованных в этой работе. При культивировании штамма *C. sorokiniana* pa.91 на муниципальных сточных водах достигалось высокое содержание C18:3 (17.652%) [366]. В работе [367] проведен анализ состава биомассы штаммов, где было отмечено низкое содержание НЖК в биомассе при культивировании на фильтрованных сточных водах: *Micractinium pusillum* S27 (НЖК – 11.6%, МНЖК – 42.2%, ПНЖК – 24.7%), *C. sorokiniana* W2 (НЖК – 20.8%, МНЖК – 15.4%, ПНЖК – 51.9%), *Micractinium* sp. S34 (НЖК – 12.9%, МНЖК – 54.9%, ПНЖК – 23.1%). Таким образом, штаммы *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 при культивировании на среде WW обладают более высоким уровнем накопления НЖК на сточных водах по сравнению со штаммами, описанными в литературе.

3.6.2.3 Культивирование на средах с высоким содержанием солей

Добавление солей в концентрации 30 г л^{-1} увеличивало общее содержание НЖК и МНЖК у *P. kessleri* IC-11 до $45.5 \pm 0.7\%$ при культивировании на среде BBM (Таблица 17). Подобный

эффект накопления НЖК (до 70.2%) ранее наблюдался у микроводоросли *C. reinhardtii* [68] при добавлении в среду 250 мМ NaCl. Пальмитиновая кислота (35%) также была одной из основных жирных кислот, обнаруженных в биомассе *Chlamydomonas mexicana* при культивировании в среде BBM с добавлением 25 мМ NaCl [337]. При этом анализ состава жирных кислот, входящих в состав биомассы другого штамма *P. kessleri* [93], при солевом стрессе (350 мМ NaCl) в среде ТАР в стационарной фазе роста выявил увеличение C18:1 с 0 до 15.58% и C18:2 с 30.54 до 56.02%, что сопровождалось сверхэкспрессией генов, кодирующих аминокликозид N6'-ацетилтрансферазу и Δ -12-десатуразу, при этом количество C18:3 уменьшилось с 25.27 до 0.07%. Аналогично при культивировании штамма *C. sorokiniana* CG12 [360] выявлено, что добавление в среду BBM 25 мМ CaCl₂ приводит к увеличению накопления C18:1 (до 64.18%). При культивировании *C. vulgaris* UTEX 2714 на среде BBM при солевом стрессе выявлено увеличение содержания C16:0 по сравнению с исходной средой (14.9 и 18.3%), C18:1 (14.9 и 18.3%), C18:2 (13.6 и 20.8%) и C18:3 (17.2 и 25.6%) [67]. При этом количество НЖК увеличилось с 17.0 до 21.5% при повышении концентрации NaCl от 0 до 45 г л⁻¹. Доля полиненасыщенных липидов снижалась с увеличением концентрации солей. Таким образом, увеличение солености среды увеличивало содержание НЖК в биомассе протестированных штаммов, что коррелирует с результатами, описанными в литературе.

3.6.3 Сравнительный анализ эффективности применения исследуемых штаммов микроводорослей в процессах водоочистки

Для сравнительного анализа эффективности применения исследованных в работе штаммов микроводорослей в процессах водоочистки проведено сравнение характеристик штаммов (по остаточному содержанию компонентов среды в процессе культивирования) со штаммами-аналогами, описанными в литературе. Результаты представлены в Таблице 24.

Согласно полученным данным, все протестированные в работе штаммы были достаточно эффективны при удалении соединений азота и фосфора из сточных вод. Ранее в работе [368] было показано, что при оптимизации режима культивирования *C. vulgaris* 211-11C была достигнута эффективность удаления NO₃⁻ и PO₄³⁻ из среды, имитирующей по составу сточные воды, равная 93 и 86%, соответственно. В работе [369] было достигнуто удаление 89.90% NO₃⁻ из среды BBM при выращивании *C. vulgaris* и 100% удаление NO₃⁻ из той же среды при выращивании *S. obliquus*. Анализ литературы также показал, что эффективность удаления NO₃⁻ из среды при использовании *C. sorokiniana* UTEX 1670 составила 35% при его начальной концентрации 10

Таблица 24 – Сравнение состава среды в стационарной фазе роста при культивировании штаммов микроводорослей

Штамм/Состав исходной среды	BBM	BBM-S	WW				WW-S			Ссылка на штамм-аналог
	NO ₃ ⁻ мг л ⁻¹		ХПК мг O ₂ л ⁻¹	NH ₄ ⁺ мг л ⁻¹	NO ₃ ⁻ мг л ⁻¹	PO ₄ ³⁻ мг л ⁻¹	ХПК мг O ₂ л ⁻¹	NH ₄ ⁺ мг л ⁻¹	NO ₃ ⁻ мг л ⁻¹	
	293.7±19.3		161.0±5.0	27.7±1.3	0.2±0.0	1.8±0.1	161.0±5.0	27.7±1.3	0.2±0.0	
<i>C. vulgaris</i> A1123	18.0±3.0	-	-	-	-	-	-	-	-	[368], [369]
<i>S. abundans</i> A1175	0.015±0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	[369]
<i>C. sorokiniana</i> A1135	80.0±1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	[370]
<i>S. obliquus</i> A1167	15.0±0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	[369]
<i>Botryococcus</i> sp. A1162	60.0±2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	[371]
<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	20.0±1.6	-	70.1±7.0	0.5±0.2	-	0.09±0.07	-	-	-	[370]
<i>C. sorokiniana</i> IC-62	2.73±0.16	-	129.5±12.0	0.7±0.1	-	0.27±0.05	-	-	-	[370]
<i>Micractinium</i> sp. IC-44	100.0±6.0	-	157.0±15.0	0.9±0.2	-	0.68±0.14	-	-	-	[356]
<i>Micractinium</i> sp. IC-76	12.0±0.36	-	167.0±18.0	1.0±0.2	-	0.41±0.09	-	-	-	[356]
<i>P. kessleri</i> IC-11	1.6±3.6	138.8±10.9	93.2±9.3	0.9±0.1	0.01±0.0	-	149.3±4.5	1.9±0.2	1.7±0.1	[372], [357], [373], [374]

мг л⁻¹ [370], что меньше, чем эффективность удаления NO₃⁻ из среды WW при использовании штамма *C. sorokiniana* A1135 (начальная концентрация 293.7 ± 19.3 мг л⁻¹, эффективность удаления NO₃⁻ составила 72.8%). При этом в тех же условиях эффективность удаления NH₄⁺ *C. sorokiniana* UTEX 1670 составила 75%, что меньше, чем для *C. sorokiniana* IC-62 и *C. sorokiniana* IPPAS C-1 (Таблица 24). Поглощение NO₃⁻ и PO₄³⁻ из среды для штамма *M. reisseri* из фильтрованных сточных вод составило 86 и 95%, соответственно [356], что близко к показателям *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 (Рисунок 8). При анализе эффективности применения *B. braunii* в работе [371] было выявлено, что в среднем за 14 суток было удалено 88% общего азота и 98% общего фосфора из сточных вод, что сравнимо с показателями штамма *Botryococcus* sp. A1162 (Рисунок 4).

Данные по эффективности очистки сточных вод от азотистых соединений разнятся, в частности, для штамма *P. kessleri* IC-11 показано удаление NH₄⁺ полностью к одиннадцатым и шестнадцатым суткам в среде без и с добавлением солей, соответственно (NO₃⁻ был обнаружен в среде WW в незначительных количествах). Это превышает показатели эффективности водоочистки для штамма *P. kessleri* 211–11G (эффективность удаления соединений азота составила 40.9%) [372] при выращивании на стерилизованных сточных водах пивоваренного

производства. Потребление NH_4^+ в среде WW для *P. kessleri* IC-11 было близко к показателям, достигнутым для штамма *P. kessleri*-I при культивировании на сточных водах (89%) [357].

Добавление солей также оказывало влияние на эффективность водоочистки. Данные по применению аналогичных штаммов *P. kessleri* для очистки вод с высоким содержанием солей отсутствуют, однако для этого ранее были применены другие микроводоросли. Например, в работе [373] эффективность удаления NO_3^- из среды с 2% содержанием солей при культивировании *C. sorokiniana* составила $72.5 \pm 1.0\%$, эффективность удаления PO_4^{3-} – $10.4 \pm 0.2\%$, для *C. vulgaris* – 91.6 ± 0.4 и $2.4 \pm 0.1\%$, соответственно, что сравнимо с эффективностью аналогичных штаммов, исследованных в данной работе. Эффективность удаления NO_3^- , NH_4^+ и PO_4^{3-} из муниципальных сточных вод составила от 45 до 88% при использовании *D. salina* и добавлении солей (30 промилле) [374].

Таким образом, можно заключить, что штамм *C. sorokiniana* IPPAS C-1 характеризуется минимальным уровнем накопления нейтральных липидов (Рисунок 6А) при культивировании, но максимальной способностью к удалению соединений азота и фосфора из среды, что позволяет использовать его в процессах водоочистки только как продуцент биомассы. Штамм *Micractinium* sp. IC-76 обладает самым высоким содержанием липидов $36.29 \pm 0.11\%$, что меньше, чем аналогичный показатель для штамма *C. vulgaris* FC-16 (65.3%) при культивировании на муниципальной сточной воде с добавлением глюкозы [374]. Эффективность удаления фосфора из среды WW для штамма *Micractinium* sp. IC-76 ($77.8 \pm 5.6\%$) была близка к результатам, полученным для штамма *Scenedesmus* (70%), который выращивали на муниципальной сточной воде [375]. Показано, что штамм *Micractinium* sp. IC-76 может использоваться для очистки муниципальных сточных вод и производства биомассы с высоким содержанием липидов.

Из приведенных сведений можно заключить, что штаммы *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *C. sorokiniana* IC-62 и *C. sorokiniana* A1135 по данным сравнения с литературными источниками при культивировании на среде BBM оказались менее эффективными в отношении продукции липидов и биомассы. 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 BBM. Штаммы *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76, отличавшиеся наибольшим уровнем накопления липидов из всех протестированных в этой работе штаммов, обладали меньшим уровнем накопления липидов по сравнению с описанными в литературе штаммами при культивировании в BBM, однако большим уровнем НЖК при культивировании в WW. В частности, такие различия могут быть связаны с тем, что для культивирования аналогичных штаммов использовались более благоприятные условия, чем для

штаммов в этой работе, включая культивирование в фотобиореакторах. Из протестированных в работе штаммов лишь *S. abundans* A1175 обладал сходными характеристиками по накоплению липидов с аналогичными штаммами при культивировании на BBM. Также этот штамм обладает более высоким содержанием C18:0 и меньшим C18:1 по сравнению с остальными штаммами, что позволит получать на его основе более устойчивое к окислению биотопливо с большей энергетической емкостью. Штаммы *P. kessleri*, описанные в литературе, в основном изначально обладали высоким уровнем накопления липидов, поэтому отличались по этому параметру от подробно протестированного в этой работе штамма *P. kessleri* IC-11, преимущественно накапливающего углеводы на среде BBM. Сравнение протестированных штаммов по уровню накопления углеводов и белка при культивировании на среде BBM выявило, что штаммы, относящиеся к р. *Chlorella*, исследованные в этой работе, в целом обладают высоким уровнем накопления углеводов и белка по сравнению с аналогичными штаммами, описанными в литературе. Штамм *C. sorokiniana* IPPAS C-1 по своим показателям продукции углеводов и липидов сравним с показателями аналогичных штаммов. Штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 пригодны для получения липидов. Штамм *S. abundans* A1175 применим для получения липидов с высоким содержанием НЖК и МНЖК и относительно высоким содержанием углеводов на среде BBM.

При сравнении штаммов, исследованных в работе при культивировании на среде WW, относящихся к *C. sorokiniana*, *Micractinium* sp. и *P. kessleri*, выявлено, что в целом они обладают меньшей эффективностью продукции биомассы и липидов по сравнению с аналогичными штаммами, описанными в литературе. Это может быть связано, как и в случае культивирования этих штаммов на среде BBM, с использованием в других работах более эффективных способов культивирования. В работе выявлено, что суммарное содержание НЖК и МНЖК при культивировании исследованных штаммов на WW превышало аналогичное значение при культивировании на BBM, в частности, *Micractinium* sp. IC-44 в этих условиях превосходил по этой характеристике штамм *S. abundans* A1175. Выявлено, что при культивировании на средах BBM 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 сточных вод от NH_4^+ , NO_3^- и PO_4^{3-} , при этом мало влияли на ХПК среды.

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. Нарботка биомассы микроводорослей в лабораторной установке

Для получения биомассы микроводорослей для последующей переработки в востребованные вещества были использованы штаммы, которые по данным исследований обладали наибольшим содержанием липидов (нейтральных и общих - *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76) и углеводов (*P. kessleri* IC-11). Выращивание проводили в лабораторной установке, схема которой предоставлена на Рисунке 20 (описание приведено в п. 2.2.1). Данный тип установки наиболее часто применяется для выращивания биомассы микроводорослей [376]. В ходе наработки партий биомассы оценивали ее состав в соответствии с целевым компонентом (липиды или углеводы), а также рассчитывали кинетические параметры. Результаты представлены на Рисунке 21 и Таблицах 25-26.

Выращивание штаммов *Micractinium* sp. IC-44 и *P. kessleri* IC-11 проводили в среде BBM, а *Micractinium* sp. IC-76 – в среде Chu-13 (Таблица 25). Обе среды часто используются для культивирования пресноводных микроводорослей [377]. Общее содержание липидов в биомассе *Micractinium* sp. IC-44 оставалось относительно постоянным во время культивирования (Таблица 26) и составило $11.5 \pm 0.5\%$ при наступлении стационарной фазы роста. Содержание липидов

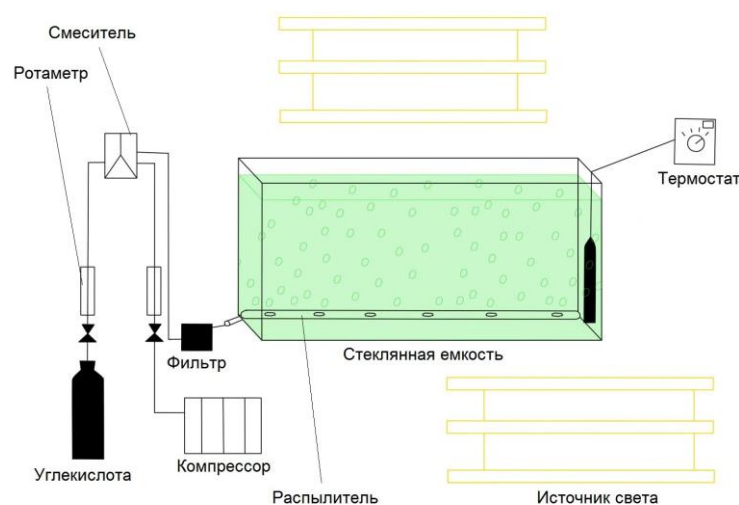


Рисунок 20 – Установка лабораторного масштаба для выращивания биомассы микроводорослей, использованная в работе

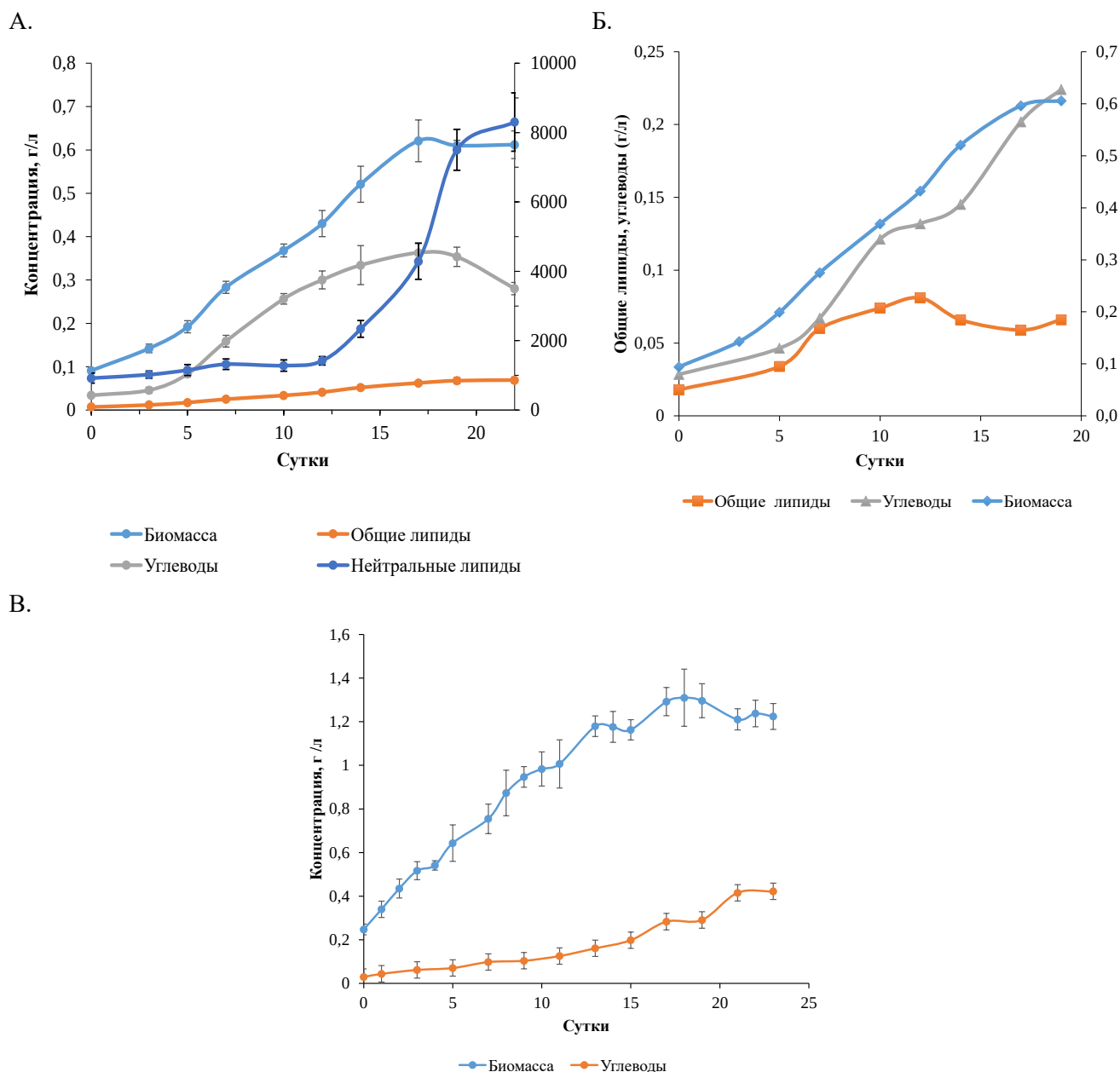


Рисунок 21 – Состав биомассы микроводорослей при выращивании в лабораторной установке.
(А) *Micractinium* sp. IC-44, (Б) *Micractinium* sp. IC-76, (В) *P. kessleri* IC-11

биомассе *Micractinium* sp. IC-44 в конце культивирования было меньше, чем в биомассе *M. reisseri* RAIW01 ($W_{\text{л}}$ 30 - 40%) [356], но сравнимо со штаммом *Micractinium* sp. IC-76. Это различие в отношении штамма *M. reisseri* RAIW01 может быть связано с выращиванием в среде с низким содержанием питательных веществ и с использованием разного масштаба наработки биомассы.

Максимальное накопление нейтральных липидов у *Micractinium* sp. IC-44 наблюдали на двадцать вторые сутки культивирования. Накопление углеводов преимущественно происходило

во время фазы экспоненциального роста. Концентрация биомассы в конце культивирования ($612.0 \pm 32.0 \text{ г л}^{-1}$) была близка к концентрации биомассы *Micractinium* sp. IC-76 ($605.0 \pm 50.0 \text{ г л}^{-1}$), которую выращивали на среде Chu-13. Концентрация биомассы в конце культивирования в этом исследовании была ниже, чем у штамма *Micractinium* sp. ME05, который культивировали в миксотрофных условиях (накопление биомассы $1.20 \pm 0.10 \text{ г л}^{-1}$) [378]. При этом при культивировании штамма *Micractinium* sp. IC-76 на двенадцатые сутки наблюдалось увеличение общего содержания экстрагируемых липидов (до $18.7 \pm 1.2\%$), затем общее содержание липидов снижалось до $10.9 \pm 1.1\%$ на девятнадцатые сутки. Такой же эффект отмечен при культивировании микроводоросли *Haematococcus pluvialis* [379], которую культивировали в условиях высокой интенсивности освещения ($350 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). Стоит отметить, что по данным ТСХ анализа липидных экстрактов *Micractinium* sp. IC-76 в этой работе максимум накопления триацилглицеридов экстрактов *Micractinium* sp. IC-76 в этой работе максимум накопления триацилглицеридов отмечается на семнадцатые сутки от начала культивирования (Рисунок 22). В связи с этим сбор партии биомассы для штамма *Micractinium* sp. IC-76 проводили на семнадцатые сутки культивирования, для *Micractinium* sp. IC-44 - на двадцать вторые сутки культивирования (наблюдался максимум накопления нейтральных липидов, Рисунок 21). Достоверных отличий по штаммам по уровню накопления общих липидов не было выявлено

Таблица 25 – Кинетические параметры культивирования штаммов микроводорослей в лабораторной установке

Штамм	Среда	Компонент	Скорость накопления, $\text{мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$	Количество в конце культивирования, мг л^{-1}	$\mu, \text{сут}^{-1}$	T, сут
IC-44	BBM	Общие липиды	3.0 ± 0	69.0 ± 7.0	-	-
		Углеводы	35.0 ± 2.0	310.0 ± 8.0	-	-
		Биомасса	34.0 ± 1.0	612.0 ± 32.0	0.037 ± 0.02	18.72 ± 1.3
IC-76	Chu-13	Общие липиды	7.0 ± 1.0	60.0 ± 5.2	-	-
		Углеводы	15.0 ± 3.0	202.0 ± 12.0	-	-
		Биомасса	35.0 ± 2.0	605.0 ± 50.0	0.085 ± 0.004	8.06 ± 0.05
IC-11	BBM	Углеводы	7.0 ± 0	422.0 ± 62.0	-	-
		Биомасса	71.6 ± 5.8	1224.0 ± 59.0	0.1 ± 0	6.93 ± 0.41

($p > 0.05$, однофакторный дисперсионный анализ). Анализ содержания белка и углеводов в биомассе микроводорослей (Таблица 26) показывает, что у *Micractinium* sp. IC-44 отмечалось высокое содержание углеводов ($W_y 45.7 \pm 5.3\%$) и низкое содержание белка ($W_b 25.5 \pm 4.7\%$)

Таблица 26 – Состав биомассы микроводорослей при выращивании в лабораторной установке

Штамм	Время культивирования, сут	Массовая доля по сухому веществу, %		
		W_L	W_Y	W_6
IC-44	22	11.5 ± 0.5	$45.7 \pm 5.3^*$	$25.5 \pm 4.7^*$
IC-76	17	11.3 ± 1.2	$38.8 \pm 1.9^*$	$31.8 \pm 1.5^*$
IC-11	23	13.2 ± 1.2	$34.3 \pm 2.3^*$	$36.3 \pm 3.7^*$

* $p < 0.05$; однофакторный дисперсионный анализ (при сравнении концентрации отдельных компонентов биомассы у всех штаммов)

по сравнению с остальными штаммами. Максимум накопления углеводов для *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 отмечался раньше (семнадцатые и десятые сутки, соответственно), чем для липидов (Рисунок 21), что говорит о наличии феномена переключения метаболизма на синтез липидов у этих штаммов.

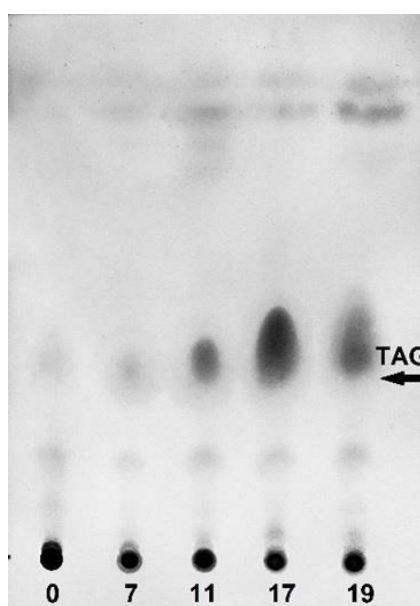


Рисунок 22 – Анализ общих липидов штамма *Micractinium* sp. IC-76 при культивировании в лабораторной установке. TAG - триацилглицериды. Триолеин использовали в качестве внутреннего контроля (данные не приведены)

Для получения биомассы микроводоросли *P. kessleri* IC-11 проводили культивирование в среде ВВМ до достижения стационарной фазы роста. Скорость накопления биомассы для этого штамма ($71.6 \pm 5.8 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$) оказалась в три раза ниже, чем в работе Li и др. [380] из-за меньшей интенсивности освещения. Количество углеводов в биомассе у штамма *P. kessleri* IC-11 составляло $34.3 \pm 2.3\%$, что больше, чем у штамма *P. kessleri* TY02 (28.1%) при его культивировании на среде ТАР при дефиците соединений азота [381].

Исследование состава жирных кислот в образцах партии биомассы *Micractinium* sp. IC-44 (Таблица 26) с последующей статистической обработкой результатов по методу однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой

Холма-Бонферрони выявило, что ее состав был сходен с данными, полученными для других штаммов, принадлежащих к роду *Micractinium* [382]. Двумя основными жирными кислотами, присутствующими в биомассе на всех фазах роста, были C16:0 и C18:2. Содержание C16:2 и других жирных кислот было значительно ниже ($p < 0.05$) в стационарной фазе роста по сравнению с остальными фазами. Содержание C18:1 при культивировании в лабораторной установке, как и при культивировании в колбах (Рисунок 5), значительно увеличилось ($p < 0.001$), а содержание полиненасыщенных жирных кислот C16:2 и C16:3 значительно снизилось ($p < 0.001$) при переходе к стационарной фазе роста.

Анализ состава жирных кислот *Micractinium* sp. IC-76 (Таблица 27) выявил высокое содержание C16:0, C16:2, C18:1 и C18:2. Достоверное ($p < 0.01$) снижение содержания

Таблица 27 – Состав жирных кислот биомассы штаммов *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76 при культивировании в лабораторной установке

ЖК	<i>Micractinium</i> sp. IC-44			<i>Micractinium</i> sp. IC-76		
	Фаза роста (сут)					
	ЛФ (2 сут)	ЭФ (10 сут)	СФ (22 сут)	ЛФ (0 сут)	ЭФ (7 сут)	СФ (17 сут)
C14:0	1.9 ± 0.8	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.8	2.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2
C16:0	24.9 ± 0.3	26.4 ± 0.5	28.1 ± 0.9**	24.9 ± 0.3	25.4 ± 0.6	26 ± 0.4
C16:1	2.6 ± 0.4*	3.3 ± 0.3*	3.5 ± 0.3*	2.6 ± 0.4	2.9 ± 0.4	4.3 ± 1.2
C16:2	16.9 ± 0.3	16.2 ± 0	13.9 ± 0.5***	16.9 ± 0.3	17.2 ± 0.6	15.6 ± 0.5*
C16:3	9.7 ± 0.4***	5.6 ± 0.6***	3.7 ± 0.1***	9.7 ± 0.4**	7.5 ± 0.2**	4.6 ± 0.5***
C18:0	6.3 ± 0.9***	2.8 ± 0.4***	2.2 ± 0.1***	6.3 ± 0.9***	4.4 ± 0***	2.5 ± 0.1***
C18:1	5.7 ± 0.6**	9.1 ± 0.9**	12.4 ± 1.1**	5.7 ± 0.6	5.6 ± 0.3	9.9 ± 0.2***
C18:2	24.4 ± 0.3***	28.1 ± 0.8	29.2 ± 0.4	24.4 ± 0.3***	26.8 ± 0.3***	29.8 ± 0.3***
C18:3	7.7 ± 1.2	6.7 ± 0.5	4.9 ± 0.2	7.7 ± 1.2	8.0 ± 0.5	5.9 ± 0.7
МНЖК	8.3 ± 0.4*	12.4 ± 1.1*	15.9 ± 1.2*	8.3 ± 0.4	8.5 ± 0.5	14.2 ± 0.4***
НЖК	33.1 ± 2.6	30.9 ± 2.7	32.5 ± 2.2	33.1 ± 1.3	32.1 ± 2.5	29.8 ± 2.3
НЖК+МНЖК	41.4 ± 2.8	43.3 ± 2.1	48.4 ± 4.3	41.4 ± 1.2	40.6 ± 2.8	44.1 ± 1.3
ПНЖК	58.7 ± 4.6	56.6 ± 3.3	51.7 ± 4.6	58.7 ± 4.6	59.4 ± 2.3	55.9 ± 1.6

Наблюдаются достоверные (* $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$) различия по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений между ЛФ (лаг-фаза), ЭФ (экспоненциальная фаза), СФ (стационарная фаза роста) с поправкой Холма-Бонферрони.

наблюдалось для C16:3 с 9.7 ± 0.4 до $4.6 \pm 0.5\%$ ($p < 0.001$) в конце культивирования, при этом в этот же период количество C18:1 увеличилось с 5.7 ± 0.6 до $9.9 \pm 0.2\%$ ($p < 0.01$). Количество НЖК оставалось постоянным (29.8 - 33.1%). Оптимальный по составу жирных кислот и

содержанию нейтральных липидов состав биомассы *Micractinium* sp. IC-76 наблюдался на семнадцатые сутки культивирования. Оба штамма *Micractinium* sp. IC-76 и IC-44 при культивировании в лабораторной установке (Таблица 27) обладали более низким суммарным содержанием МНЖК и НЖК по сравнению со штаммами, выращенными в колбах на среде ВВМ (Рисунок 5). Содержание НЖК и МНЖК у *Micractinium* sp. IC-76 в стационарной фазе роста составило $44.1 \pm 1.3\%$, у *Micractinium* sp. IC-44 – $48.4 \pm 4.3\%$.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕАКЦИЯХ ГИДРОЛИЗА И ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

4.1 Получение ферментов, применяемых в реакциях гидролиза органических веществ

Термостабильные ферменты, продуцируемые термофильными микроорганизмами при температурах 50 – 80 °С, широко применяются в современном производстве продуктов питания, а также кожевенной, фармацевтической, целлюлозно-бумажной промышленности [385]. Термостабильные липазы и эстеразы, относящиеся к классу гидролаз, обладают высокой стабильностью в широком диапазоне pH (6.0 - 11.0) [386] и температур (до 96 °С [387]), а также устойчивы к различным химическим соединениям включая: этанол, метанол [388], ионные жидкости [389], поверхностно-активные вещества [390]. Из-за разнообразия свойств ферментов и реакций, которые они катализируют, существует необходимость поиска новых штаммов термофильных микроорганизмов, продуцирующих ферменты с требуемыми характеристиками (в том числе повышенной термостабильностью). Для получения ферментов в необходимом количестве, как правило, требуется клонирование генов, кодирующих ферменты, для их экспрессии в клетках штаммов-продуцентов (*E. coli* или *Pichia pastoris* [391]). Тем не менее, гетерологичная экспрессия зачастую не позволяет получить высокий уровень продукции белка, что, как правило, является результатом токсичности рекомбинантного белка для клеток штамма-продуцента [392], наличия дисульфидных связей в белке [393] или повышенной агрегации белков [394]. Снижение агрегации белков достигается за счет их коэкспрессии с молекулярными шаперонами [395] или повышения их растворимости за счет слияния белков с дополнительными доменами, например ТгхА [396]. Комбинация этих подходов позволяет достигнуть достаточного уровня синтеза фермента.

4.1.1 Выделение термофильных бактерий с липолитической активностью

Выделение культур термофильных микроорганизмов проводили из образцов компоста, отобранных в Новосибирской области и Республике Тыва при 37 – 65 °С на среде LB с 1% трибутирином. Анализ последовательности 16S рРНК образцов с наибольшей зоной просветления на трибутириновом агаре показал (Таблица 28), что выделенные штаммы относятся

к *B. licheniformis* (4 шт.), *G. thermodenitrificans* (3 шт.) а также *Bacillus* sp. (1 шт.), *Geobacillus* sp. (1 шт.), *U. suwonensis* (1 шт.) и *U. thermosphaericus* (1 шт.).

Таблица 28 – Свойства выделенных термофильных бактериальных культур с липолитической активностью

Штамм	Место отбора образца компоста	% идентичности	°C	pH	Гидролиз трибутирина [§]
<i>B. licheniformis</i> BL1	Советский район г. Новосибирск	MG546213, 99%	45-60	7-9	+++
<i>B. licheniformis</i> BL2	Советский район г. Новосибирск	KC755089, 99%	45	7	++
<i>Bacillus</i> sp. Bsp8	Советский район г. Новосибирск	MG461674, 99%	60-65	7-9	+
<i>B. licheniformis</i> BL9	Советский район г. Новосибирск	JN998754, 99%	60-65	7-9	+++
<i>U. suwonensis</i> US3	Советский район г. Новосибирск	LT631780, 99%	60-65	7-9	+
<i>B. licheniformis</i> BL9-1	Советский район г. Новосибирск	KT719913, 99%	60-65	7-9	+
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> GT2	Советский район г. Новосибирск	KP842609, 100%	60-65	7-9	+++
<i>Geobacillus</i> sp. Gsp3	Советский район г. Новосибирск	LT745876, 100%	60-65	7-9	+++
<i>U. thermosphaericus</i> UT1	п. Кудряши, Новосибирская область	AP018335, 99%	60	7-9	+++
<i>G. thermodenitrificans</i> GT3	п. Каа-Хем, Республика Тыва	CP020030, 100%	60-65	7-9	+++
<i>G. thermodenitrificans</i> GT4	п. Каа-Хем, Республика Тыва	CP017694, 99%	60-65	7-9	+++

[§] Степень гидролиза определяли по размеру зоны просветления вокруг колоний.

Штамм *U. thermosphaericus* UT1 растет при относительно высокой температуре (60 °C), а также в диапазоне pH 7.0-9.0, что говорит о возможной высокой стабильности его ферментов при высоких температурах и потенциальной возможности применения в биотехнологических процессах. Кроме того, он был мало изучен в отношении свойств продуцируемых липолитических ферментов, поэтому был выбран для разработки продуцента термостабильного липолитического фермента.

4.1.2 Получение продуцента термостабильной эстеразы *Ureibacillus thermosphaericus* и изучение ее свойств

Для клонирования был выбран ген (estUT1), гомологичный последовательности эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* (WP016838941.1), состоящей из 248 аминокислотных остатков. Анализ последовательности этого гена у выделенного штамма *U. thermosphaericus* UT1 выявил, что он на 100% идентичен с аминокислотной последовательностью WP016838941.1 эстеразы *U. thermosphaericus*. Для определения принадлежности эстеразы estUT1 к отдельному семейству липолитических ферментов, был проведен филогенетический анализ с использованием представителей известных семейств липолитических ферментов по классификации Arpigny 1999 г [397], который выявил, что эстераза estUT1 может относиться к отдельному семейству липолитических ферментов. Сравнение аминокислотных последовательностей estUT1 с последовательностями представителей семейства XIII (идентичность 41 – 47%, схожесть – 61 – 65%) выявило присутствие у этого фермента уникального консервативного мотива GVSLG (Рисунок 23). Согласно новой классификации, введенной Hitch 2019 г [398], к одному семейству относятся ферменты со схожестью > 60%, поэтому эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* предположительно относится к семейству липолитических ферментов номер XIII (Рисунок 24). Для подтверждения этого факта были проанализированы биохимические свойства фермента.

Для клонирования кодирующей последовательности estUT1 использовали вектор pET32b(+), полученная плазмида pET32b-UT1 позволяет получать эстеразу (масса 28.4 кДа), соединенную с дополнительным доменом, состоящим из белка TrxA *E. coli* (массой 11.8 кДа), обозначенную estUT1-TrxA, что повышает растворимость целевого белка (Рисунок 25 А) [396]. Индукцию синтеза estUT1 в *E. coli* проводили при пониженной температуре для снижения образования телец включения, которые ренатурировали постадийным диализом в понижающемся градиенте мочевины (8–0 М) [399]. Постадийная последующая очистка афинной хроматографией (Ni-NTA) и гель-фильтрацией (Sephadex G25) позволила получить фермент с удельной активностью 12.5 ЕА мг⁻¹ (выход 18%). SPS-PAGE анализ полученного белка (Рисунок 25 Б) показал наличие белка с массой, соответствующей массе estUT1-TrxA с дополнительными фрагментами, кодируемыми конструкцией (~ 52 кДа).

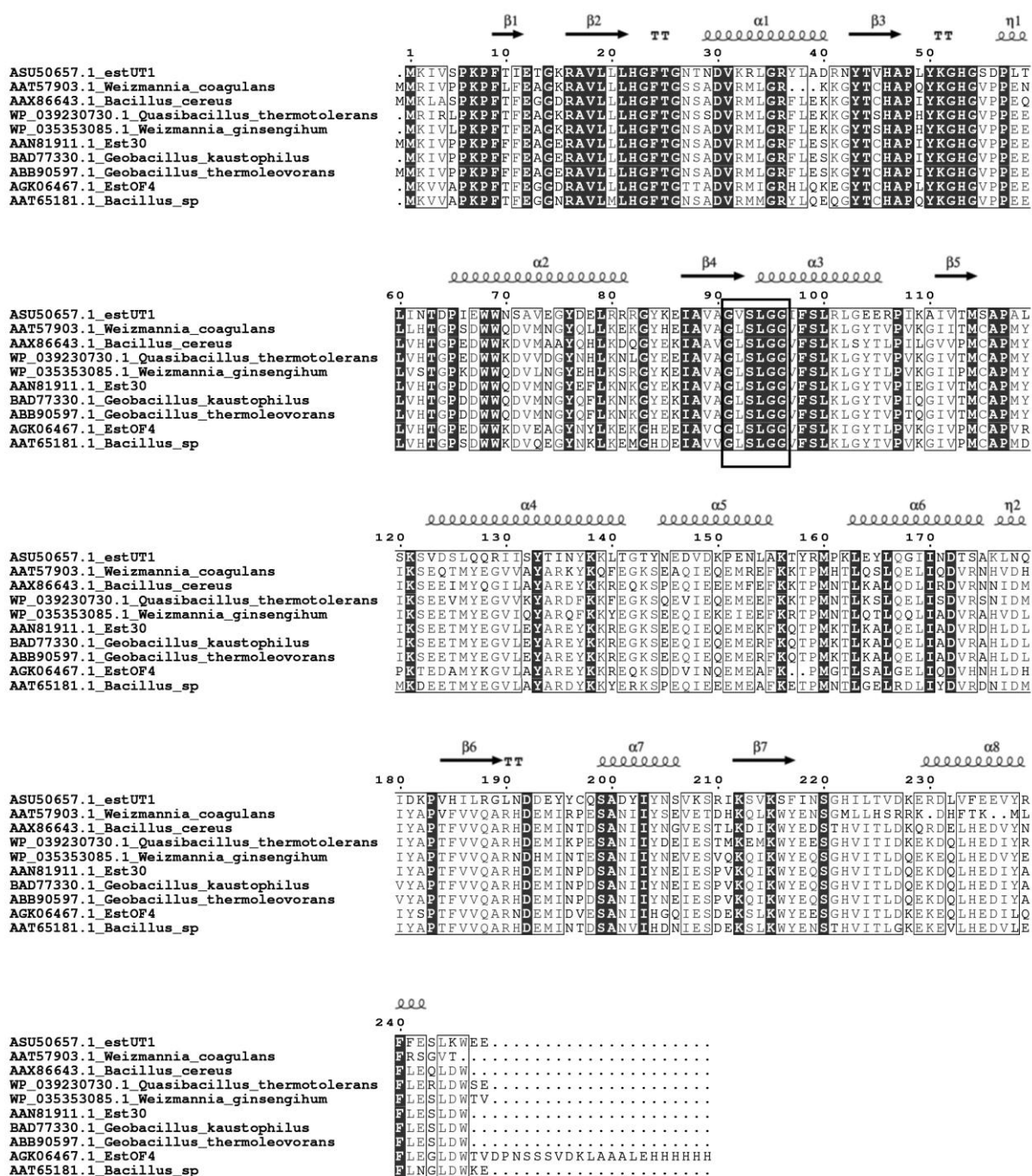


Рисунок 23 – Выравнивание аминокислотной последовательности estUT1 с представителями XIII семейства липолитических ферментов

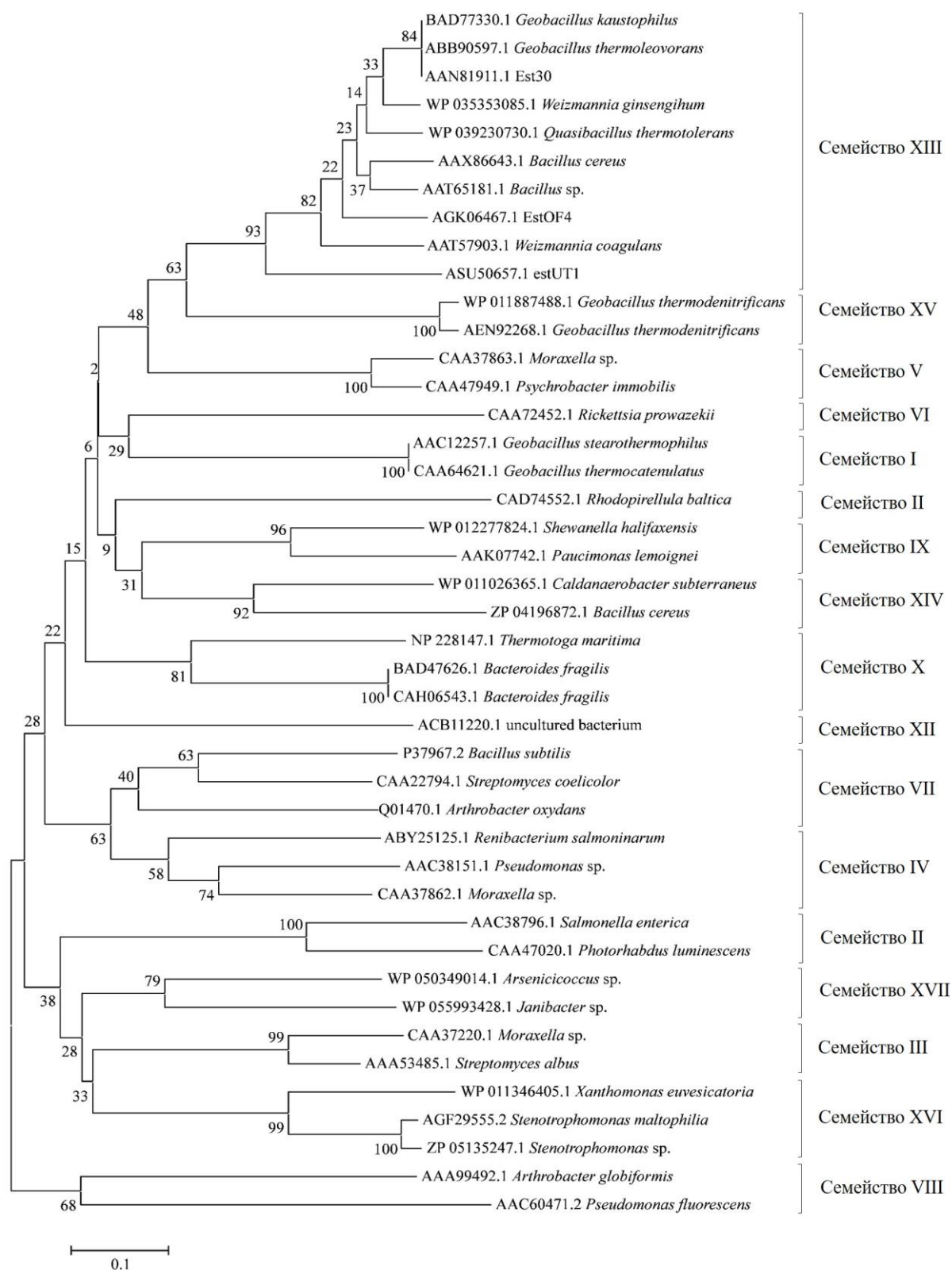
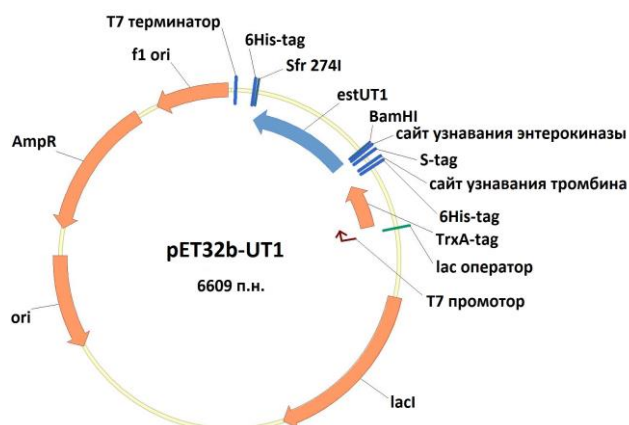


Рисунок 24 – Анализ принадлежности estUT1 к известным семействам липолитических ферментов

А.



Б.

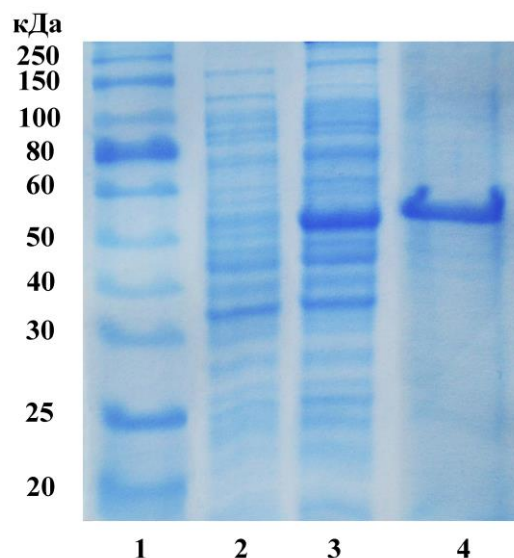


Рисунок 25 – Карта генетической конструкции рЕТ32b-UT1 и анализ экспрессии эстеразы estUT1-TrxA [400]. А. Карта генетической конструкции рЕТ32b-UT1. Б. SDS-PAGE белков. 1 – маркер молекулярного веса белков; 2 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой рЕТ32b(+); 3 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой рЕТ32b-UT1; 4 – очищенная с помощью аффинной хроматографии нерастворимая фракция белка (estUT1-TrxA) после растворения и рефолдинга телец включения

Для построения трехмерной структуры estUT1 в качестве шаблона использовали структуру карбоксилэстеразы *B. stearothermophilus* (PDB 1R1D, идентичность 46%, схожесть 65%), результат представлен на Рисунке 26А. Проверка качества построенной модели с использованием PROCHECK (Таблица 29) выявила, что 93.9% аминокислотных остатков находятся в оптимальных областях значений карты Рамачандрана (Рисунок 26Б). 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 (получены мутантные формы фермента estUT1-S93A-Mut, estUT1-D192N-Mut и estUT1-H222L-Mut) выявил отсутствие липолитической активности у мутантных форм (относительная активность составила 2.2 ± 0.8 , 0.9 ± 0.2 и $1.7 \pm 0.3\%$, соответственно).

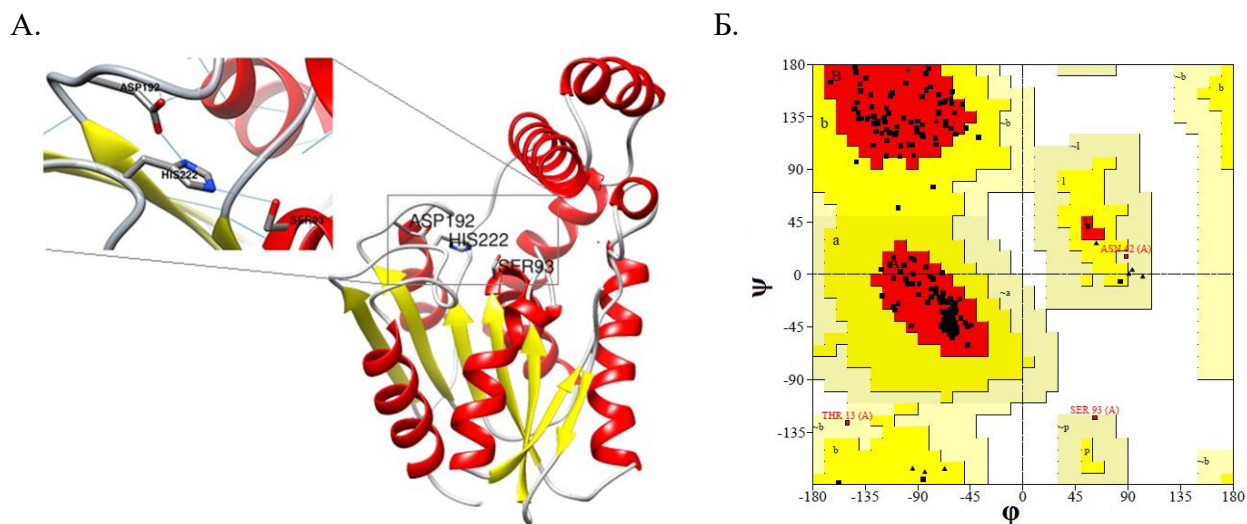


Рисунок 26 – Моделирование структуры эстеразы estUT1. (А) Трехмерная структура, (Б) Карта Рамачандрана

Таблица 29 – Результаты оценки качества модели эстеразы estUT1 программой PROCHECK [400]

Параметр	Количество	% аминокислотных остатков
Остатки в наиболее благоприятных областях [A, B, L]	201	93.9
Остатки в разрешенных областях [a, b, l, p]	10	4.7
Остатки в допустимых областях [$\sim a$, $\sim b$, $\sim l$, $\sim p$]	3	1.4
Остатки в запрещенных областях	0	0
Количество остатков (за исключением глицина и пролина)	214	100
Количество концевых остатков (за исключением глицина и пролина)	2	-
Количество остатков глицина (показано треугольниками)	16	-
Количество остатков пролина	10	-
Общее количество остатков	242	-

После обработки эстеразой estUT1-TrxA для удаления домена TrxA проведенный анализ субстратной специфичности estUT1 показал, что фермент специфичен к короткоцепочечным остаткам жирных кислот (C_2 , C_4) с максимальной специфичностью к C_2 (Рисунок 27). При использовании субстратов с длиной остатка равным или больше двенадцати атомов углерода ферментативной активности не было обнаружено. Таким образом, фермент близок по специфичности к другим бактериальным эстеразам, например, *Geobacillus* sp. JM6, обладающей высокой специфичностью к $pNPC4$ и $pNPC2$ (100 и 82.5% относительной активности, соответственно) [196], однако отличается по этому параметру от представителей XIII семейства – эстеразы est30 бактерии *G. stearothermophilus*, обладающей максимальной

специфичностью к C₄-C₆ [198] и эстеразы EstOF4 бактерии *Bacillus pseudofirmus* с наибольшей специфичностью к C₆ [401].

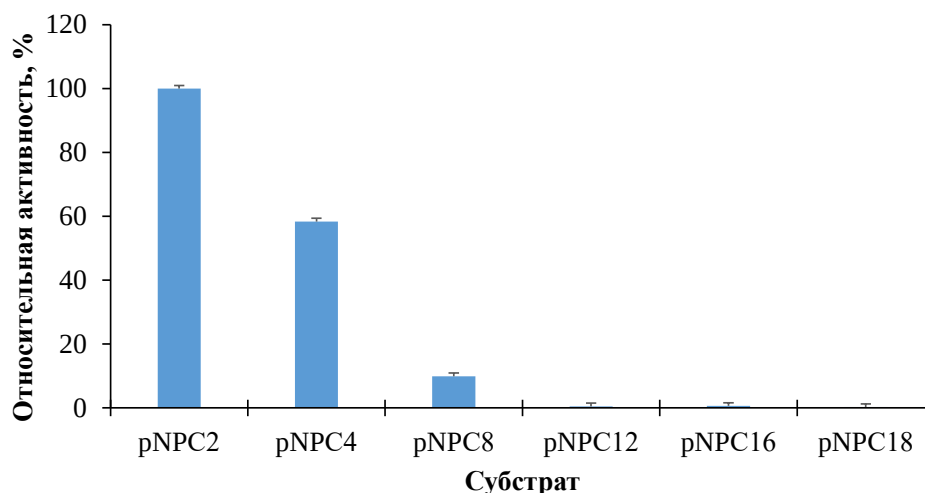


Рисунок 27 – Анализ специфичности эстеразы estUT1. За 100% принята активность при использовании pNPC2

Анализ кинетических параметров estUT1 (Таблица 30) подтвердил, что этот фермент эффективно гидролизует pNPC2 (K_M 0.098 ± 0.013 мМ, $p < 0.01$, однофакторный дисперсионный анализ).

Таблица 30 – Кинетические параметры эстеразы estUT1 [400]

Субстрат	K_M , мМ**	$K_{кат}$, с ⁻¹ ***	$K_{кат}/K_M$, с ⁻¹ мМ ⁻¹ ***
pNPC2	0.098 ± 0.013	26.03 ± 0.57	265.62 ± 24.16
pNPC4	0.581 ± 0.069	44.51 ± 3.22	76.74 ± 4.59
pNPC8	2.136 ± 0.393	62.02 ± 6.80	29.04 ± 0.63

Активность фермента измеряли с использованием различных субстратов (0.05-10 мМ).

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ для однофакторного дисперсионного анализа (при сравнении констант при использовании разных субстратов).

Исследование активности estUT1 при различных значениях pH выявило, что pH-оптимум фермента находится при pH 8.0 (Рисунок 28), что согласуется с данными, полученными для других ферментов, в том числе для эстеразы *Geobacillus* sp. JM6 (pH 7.5) [196], а также близко к pH оптимуму для эстеразы EstOF4 из *B. pseudofirmus* [401] и est30 из *G. stearothermophilus* [198], равному pH 9.0. EstUT1 стабилен в течение 1 ч при 50 °C при pH 5.0 – 9.0 (сохраняет более 95% от начальной активности).

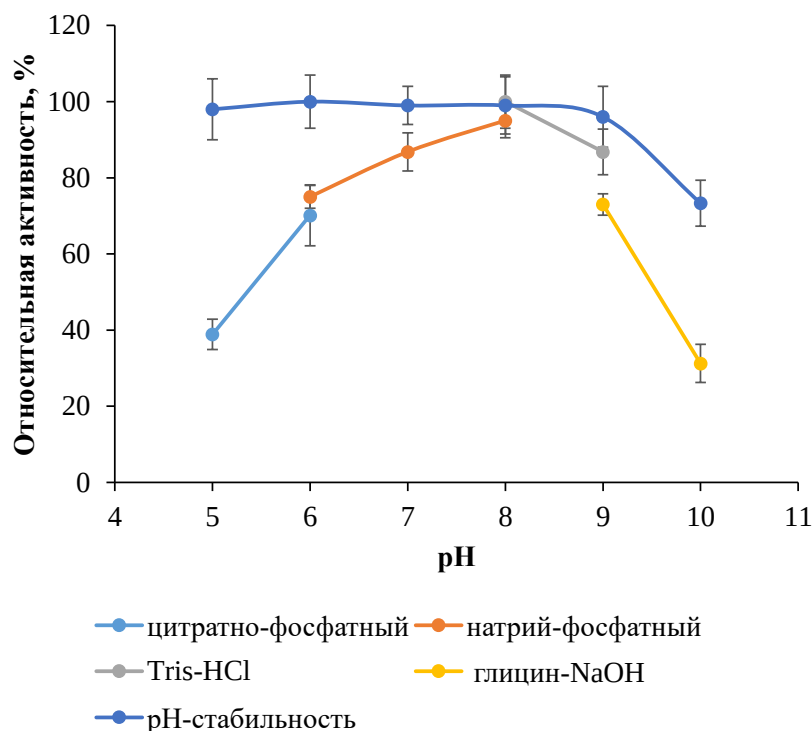


Рисунок 28 – Анализ оптимума pH активности и стабильности estUT1. Влияние pH на активность фермента оценивали относительно pH 8.0 (100% активность). Влияние pH на стабильность эстеразы оценивали по отношению активности через 1 ч инкубации к исходной (принята за 100%). В качестве субстрата использовали *pNPC4*, температура реакции 50 °C

На Рисунке 29А показаны результаты исследования активности эстеразы estUT1 при 30 – 90 °C. Выявлено, что температурный оптимум этой эстеразы находится при 70 – 80 °C (достоверных отличий по тесту Тьюки между измерениями выявлено не было), что превышает типичный оптимум термостабильных эстераз, находящийся при 40 – 60 °C [402]. Сравнение температурного оптимума estUT1 с параметрами представителей XIII семейства липолитических ферментов показало, что оптимум активности est30 из *G. stearothermophilus* составляет 70 °C [198] и 79 °C для EstOF4 из *B. pseudofirmus* [390], что говорит о их сходстве.

Исследование термостабильности EstUT1 (Рисунок 29Б) выявило, что фермент является относительно стабильным. В частности, он сохранял свыше 69% от первоначальной активности при 50 – 70 °C через 6 ч инкубации ($t_{1/2}$ при 60 °C около 15 ч) и близок по этому параметру к эстеразе *Bacillus* sp. 4 [403] или эстеразе EstL5 из *G. thermodenitrificans* T2 [195]. Термостабильность EstUT1 при 60 °C превышала этот показатель для est30 из *G. stearothermophilus*, составлявший 3 ч [198]. Однако estUT1 оказалась менее стабильной, чем эстераза бактерии *Geobacillus* sp. JM6 [402], которая после инкубации в течение 4 ч при 90 °C сохраняет 84% активности. Таким образом, свойства estUT1 (специфичность, pH и

температурный оптимумы) и ее консервативный пентапептид близки по свойствам к представителям XIII семейства бактериальных липолитических ферментов.

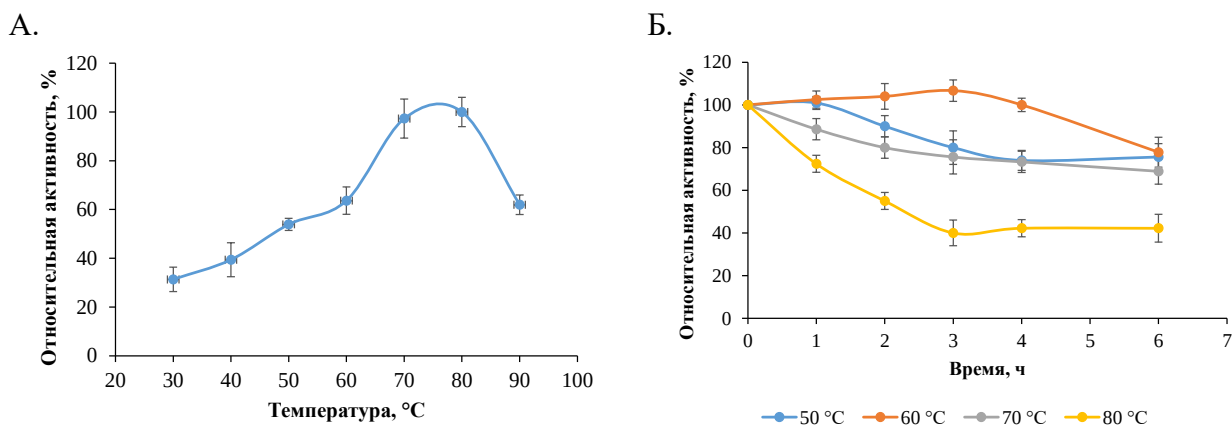


Рисунок 29 – Анализ термостабильности эстеразы estUT1. А. Активность фермента (субстрат - *p*NPC4, активность при 80 °C была принята за 100%). Б. Термостабильность (остаточную активность измеряли с *p*NPC4 в качестве субстрата, активность до прогрева была принята за 100%)

Органические растворители изопропанол, *n*-бутанол и ацетонитрил практически не влияли (Рисунок 30) на активность эстеразы в концентрации 10 - 30 % (относительная активность составляла 96 – 99%), 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.

Исследование влияния солей металлов на активность EstUT1 показало, что фермент был относительно стабилен (относительная активность 76 - 90%) в присутствии 1 mM CaCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, FeSO₄ и Al₂(SO₄)₃. Соли CuSO₄ и MgSO₄ достоверно ($p < 0.05$) ингибировали его активность, которая в этих условиях составила 30 – 45 и 37 – 38% (для 1 и 10 mM солей), соответственно. Наоборот, FeSO₄ в концентрации 10 mM 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 (зафиксирована относительная активность $21.7 \pm 3.4\%$), при этом 10 mM SDS оказывал на фермент лишь небольшое влияние ($85.8 \pm 2.2\%$). Присутствие 10 mM PMSF снижало активность эстеразы до $11.9 \pm 1.1\%$, что является следствием его взаимодействия с остатком серина в активном центре фермента. Малое влияние ЭДТА ($p < 0.05$) на ферментативную активность подтверждает то, что estUT1 не является металлоферментом.

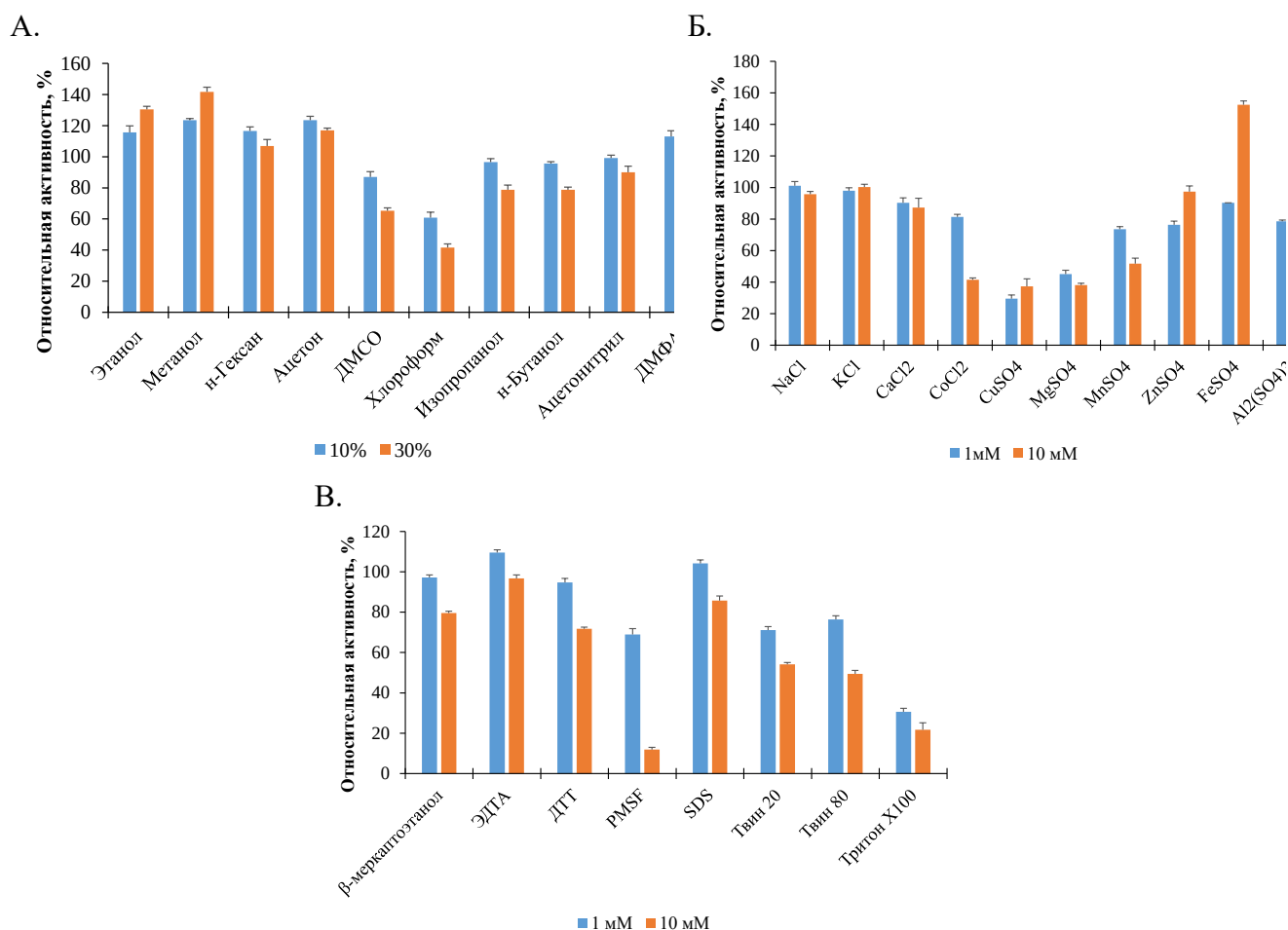


Рисунок 30 – Анализ влияния химических веществ на стабильность эстеразы estUT1. (А)

Органические растворители, (Б) Соли металлов, (В) Детергенты и ПАВ. Стабильность оценивали через 1 ч инкубации с веществом при 50 °С и *pNPC4* в качестве субстрата. За 100% активности была принята активность исходного фермента. $p < 0.05$ для всех значений, кроме отмеченных НС, для которых $p > 0.05$ (сравнение с контролем путем парного двухвыборочного t-теста)

Таким образом, проведено клонирование новой термостабильной эстеразы estUT1 с оптимумом активности при 70 – 80 °С, относящейся к XIII семейству липолитических ферментов (по классификации Hitch 2019 г [398]). Выявлено, что фермент устойчив при 50 – 60 °С, pH 5.0 – 9.0, обладает специфичностью к короткоцепочечным жирнокислотным остаткам в составе сложных эфиров (преимущественно C₂), стабилен в присутствии метанола, этанола, *n*-гексана, ацетона и ДМФА (10 – 30% мас. об.⁻¹). Характеристики фермента позволяют применять его в различных процессах, связанных с гидролизом сложноэфирных соединений с коротким радикалом.

4.1.3 Изучение подходов к увеличению экспрессии термостабильной эстеразы *Ureibacillus thermosphaericus* и оценка их влияния на активность фермента

4.1.3.1 Коэкспрессия эстеразы с шаперонами

Для увеличения экспрессии рекомбинантной эстеразы в клетках *E. coli* в работе применена коэкспрессия с белками-шаперонами, что позволяет повысить растворимость целевого белка [299]. Для этого использовали шапероны *E. coli* KJE, ClpB и ELS, составляющие одну из наиболее эффективных систем фолдинга. Шаперон DnaK (DnaK вместе с кошаперонами DnaJ и GrpE входит в систему шаперонов KJE) снижает агрегацию и стимулирует протеолиз неправильно свернутых белков [404]. Би-шаперонная система шаперонов KJE и ClpB улучшает растворимость белков [405]. Система шаперонинов GroEL (GroEL вместе с кошаперонином GroES, ELS) способствует переходу белка из нерастворимой фракции в растворимую [406]. На Рисунке 31 приведен SDS-PAGE электрофорез растворимой и нерастворимой клеточной фракции белка estUT1-TrxA при экспрессии без и с шаперонами. Обнаружено, что коэкспрессия estUT1-TrxA с шаперонами повысила удельную активность estUT1 в растворимой фракции белка в лизате клеток штамма-продуцента до 200.7 ± 15.5 ЕА мг⁻¹ (дорожка 4) по сравнению с клетками, не экспрессирующими белки фолдинга (дорожка 3, активность белка 22.6 ± 1.7 ЕА мг⁻¹), что коррелирует с данными [407], где коэкспрессия KJE и ELS с липазой *Psychrobacter* sp. привела к увеличению ее удельной активности с 66.51 ± 3.84 до 108.77 ± 4.62 ЕА мг⁻¹. Таким образом, применение коэкспрессии с шаперонами позволило увеличить удельную активность фермента estUT1-TrxA в растворимой фракции белка *E. coli* BL21(DE3), трансформированной плазмидой pET32b-UT1 и плазмидами с шаперонами. Увеличение удельной активности растворимой фракции белка позволит упростить выделение эстеразы за счет исключения стадии рефолдинга телец включения.

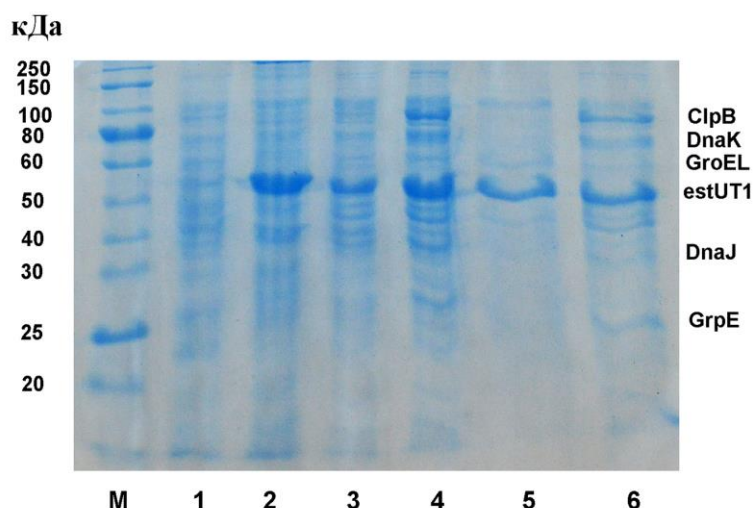


Рисунок 31 – Коэкспрессия эстеразы estUT1-TrxA с шаперонами *E. coli* [400]. М – маркер молекулярного веса; 1 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b(+); 2 – нерастворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1; 3 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1; 4 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1 и плазмидами с шаперонами; 5 – очищенная с помощью аффинной хроматографии эстераза estUT1-TrxA; 6 – очищенная с помощью аффинной хроматографии эстераза estUT1-TrxA, полученная коэкспрессией с шаперонами

4.1.3.2 Оценка влияния дополнительного процессируемого домена TrxA на свойства estUT1

Дополнительный процессируемый домен TrxA часто используют для экспрессии рекомбинантных белков [408], который затем при необходимости отделяют от целевого белка путем обработки протеазами (энтерокиназой или TEV). Известно, что TrxA является внутриклеточным термостабильным белком, обладающим антиоксидантными свойствами [409] и повышающим растворимость рекомбинантных белков, однако до сих пор не было исследовано его влияния на свойства термостабильных ферментов в составе единого белка.

Для оценки влияния TrxA на экспрессию исследуемого фермента было проведено клонирование кодирующей последовательности estUT1 в составе вектора pET28a, не содержащего TrxA, и получена плазида pET28a-UT1. На Рисунке 32 приведен SDS-PAGE электрофорез до и после индукции синтеза estUT1 с pET28a-UT1 и pET32b-UT1. Экспрессия

estUT1 была обнаружена только при использовании плазмиды pET32b-UT1, что говорит о том, что наличие домена TgxA, слитого с estUT1, оказывает кардинальное влияние на продукцию рекомбинантной эстеразы бактерии *U. thermosphaericus*, удельная активность которой в лизате составила 20.7 ± 0.8 ЕА мг⁻¹. Полученные результаты коррелируют с данными работы [410], где было показано десятикратное увеличение продукции липазы бактерии *Serratia marcescens* в составе вектора pET32a, содержащего домен TgxA, по сравнению с вектором без TgxA (pET28a).

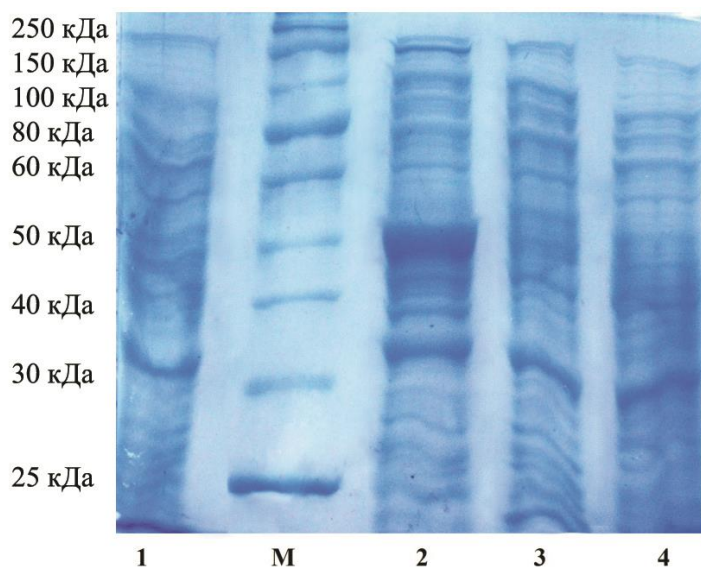


Рисунок 32 – SDS-PAGE электрофорез клеточных лизатов *E. coli* BL21(DE3) при индукции синтеза estUT1 в конструкциях без и с дополнительным доменом TgxA. Условные обозначения:

М – маркер молекулярного веса; 1 и 2 – суммарный белок клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных pET32b-UT1 до и после индукции, соответственно; 3 и 4 – суммарный белок клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных pET28a-UT1 до и после индукции, соответственно

Несмотря на увеличение экспрессии рекомбинантных белков в клетках штаммов-продуцентов ранее было показано, что в ряде случаев дополнительные домены способны изменять конформацию белка, что может негативно отразиться на активности и стабильности целевых белков. Например, в работе [411] было показано, что термостабильная эстераза археи *Pyrococcus furiosus*, экспрессированная в *E. coli* BL21(DE3)-pLysS в составе вектора pET32a в виде белка с дополнительным доменом TgxA, обладает оптимумом активности при 60 °C и в два раза большей активностью по сравнению с ферментом без этого домена. В связи с этим в данной работе было проведено исследование влияния дополнительно домена TgxA на активность и свойства эстеразы estUT1. Исследование активности и термостабильности эстеразы estUT1,

соединенной с TrxA, до и после обработки энтерокиназой, проводили при 30 – 90 °С, результат приведен на Рисунке 33.

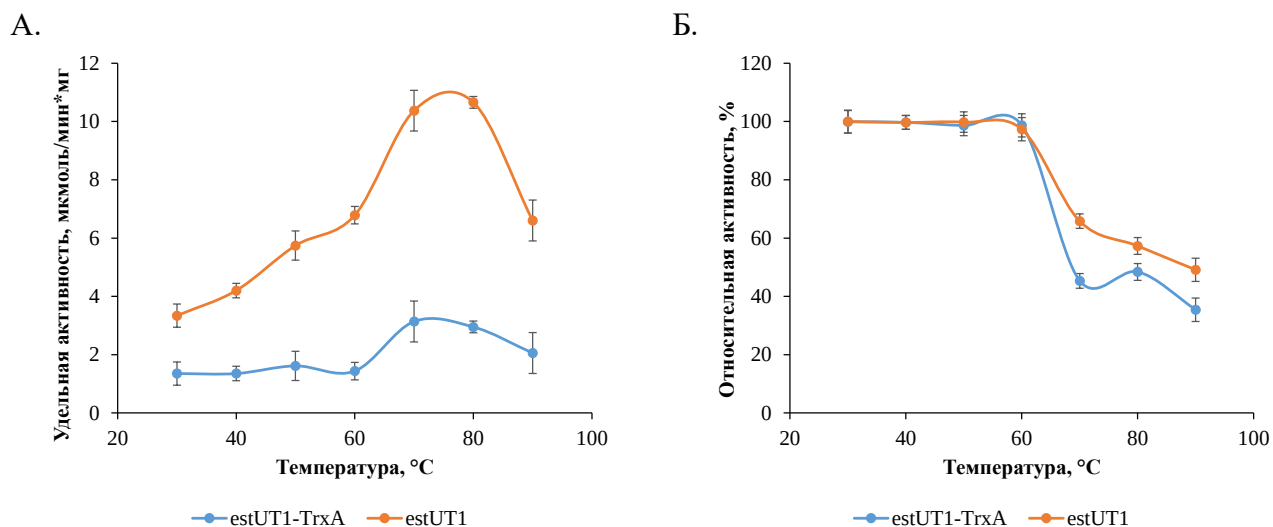


Рисунок 33 – Влияние дополнительного домена TrxA на активность и термостабильность эстеразы estUT1. (А) Активность, (Б) Термостабильность через 1 ч инкубации

Как видно из приведенных данных (Рисунок 33А), 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), при отсутствии значимых изменений ($p > 0.05$, тест Тьюки) в температурном оптимуме фермента (70 – 80 °С). Подобный эффект был также показан в отношении термостабильной эстеразы *P. furiosus*, температурный оптимум которой (60 °С) не изменился при наличии домена TrxA [411]. В этой работе 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 $57.3 \pm 2.9\%$ (Рисунок 33Б). При этом наиболее выраженный эффект термостабилизации фермента с TrxA по сравнению с необработанным энтерокиназой ферментом, был выявлен при переходе от температуры 60 к 70 °С (Рисунок 33Б).

Анализ влияния значения pH реакции на активность estUT1 без и с дополнительным доменом TrxA выявил, что после обработки фермента estUT1-TrxA энтерокиназой не обнаружено изменения оптимума активности фермента (pH 8.0), однако наблюдалось двукратное увеличение его активности (Рисунок 34А). Термостабильность обеих форм фермента не зависела от pH (Рисунок 34Б).

Исследование субстратной специфичности estUT1-TrxA и estUT1 выявило, что наличие TrxA в структуре не приводит к изменению этого параметра (Рисунок 35). Специфичность

фермента без TrxA также уменьшалась в ряду $pNPC2 > pNPC4 > pNPC8$ ($p < 0.001$ по данным двухвыборочного одностороннего t-теста).

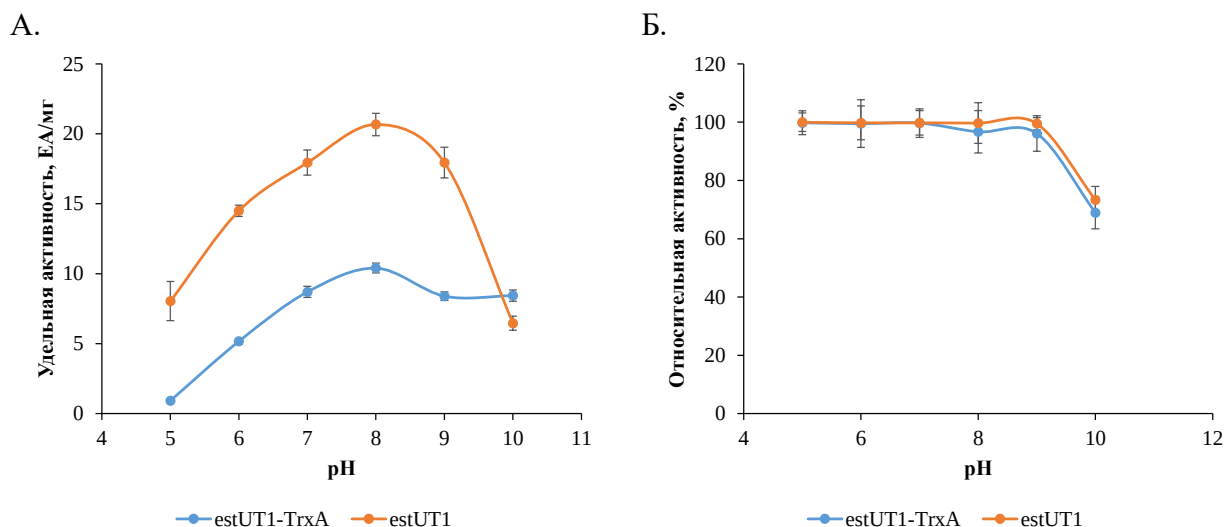


Рисунок 34 – Влияние дополнительного домена TrxA на активность и стабильность эстеразы estUT1 в буферах с разным pH: (А) – Активность, (Б) Термостабильность через 1 ч инкубации. pH стабильность определяли через 1 ч инкубации при 50 °C

Данные, приведенные в Таблице 31, показывают, что эстераза с дополнительным доменом TrxA также обладает более высоким сродством к субстратам с небольшой длиной жирнокислотного остатка ($pNPC2$), для которого значение K_M оказалось равным 0.1 ± 0 мМ. Аналогичная зависимость сохранялась и в отношении каталитической эффективности фермента без дополнительного домена.

Значения K_M для estUT1-TrxA были достоверно ($p < 0.05$, парный двухвыборочный t-тест) больше, чем для estUT1 (за исключением $pNPC2$). Таким образом, присутствие дополнительного домена TrxA в структуре фермента оказывает негативное влияние на кинетические параметры эстеразы estUT1.

Исследование влияния различных веществ (солей металлов, органических растворителей и добавок) на активность двух видов рекомбинантных белков (Рисунок 36) показало, что $MnSO_4$ больше всего снижал активность estUT1-TrxA ($13.0 \pm 0.8\%$ от контроля) и estUT1 ($6.2 \pm 0.1\%$).

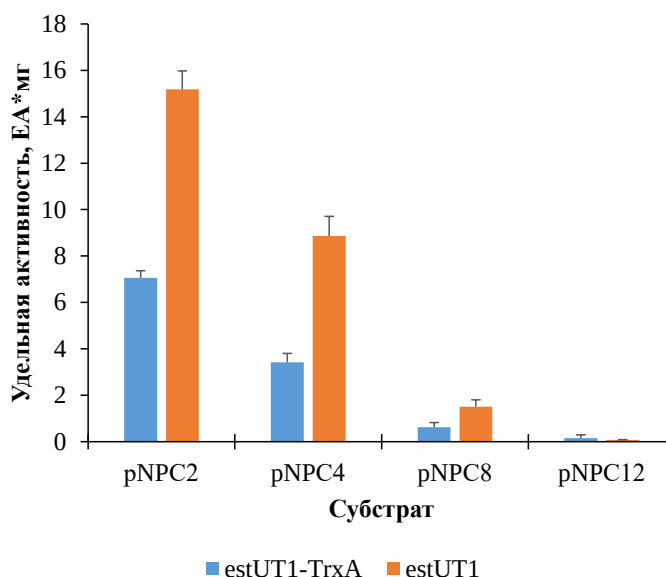


Рисунок 35 – Влияние дополнительного домена TrxA на субстратную специфичность эстеразы estUT1

Таблица 31 – Кинетические параметры estUT1-TrxA

Субстрат	K_M , мМ***	$K_{кат}$, с ⁻¹ ***	$K_{кат}/K_M$, с ⁻¹ мМ ⁻¹ ***
pNPC2	0.1 ± 0	28.0 ± 0.4	210.0 ± 7.0
pNPC4	0.8 ± 0.1	53.0 ± 2.2	63.0 ± 3.7
pNPC8	4.0 ± 0.6	87.0 ± 11.0	22.0 ± 0.6

*** $p < 0.001$, однофакторный дисперсионный анализ (при сравнении констант при использовании разных субстратов)

В целом, для всех использованных веществ активность фермента после обработки энтерокиназой была выше, чем у estUT1-TrxA. Исключение составляют $MgSO_4$, $Al_2(SO_4)_3$ и PMSF, которые вызывали значительное ($p < 0.05$ t-тест) падение активности фермента после обработки энтерокиназой. Исключение составляют органические растворители, вызывающие увеличение активности свыше 100% (наибольший эффект был отмечен при использовании ацетона и метанола, где относительная активность составила свыше 120%).

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. Поскольку дополнительный домен TrxA строго необходим для экспрессии estUT1, а также

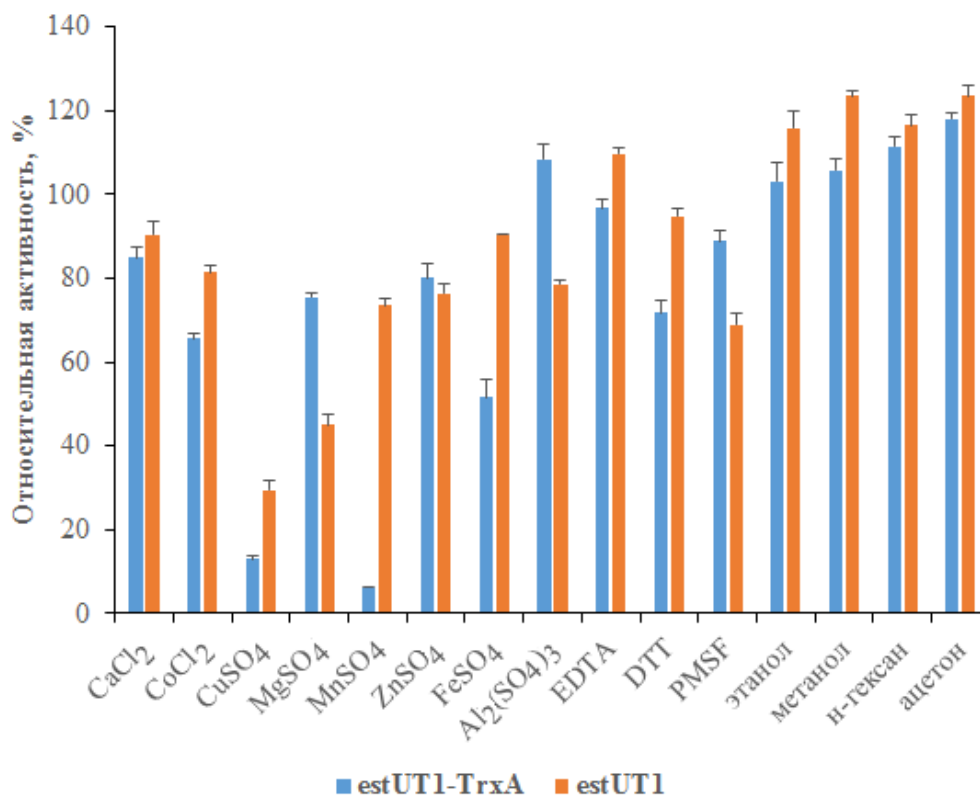


Рисунок 36 – Относительная активность estUT1-TrxA до и после обработки энтерокиназой в присутствии различных химических веществ. $p < 0.01$ для всех значений (парный двухвыборочный t-тест)

тот факт, что биохимические характеристики estUT1-TrxA близки к характеристикам estUT1, то этот фермент применим в реакциях гидролиза органических соединений со сложноэфирной связью с короткоцепочечным жирнокислотными остатками.

4.2 Получение ферментных препаратов

В технологических процессах ферменты применяются, как правило, в иммобилизованном виде, что позволяет использовать их многократно, а также повысить их стабильность и активность [412]. В соответствии с требованиями к условиям реакции гидролиза и переэтерификации (в том числе для получения востребованных продуктов) были подобраны липолитические ферменты и проведена их иммобилизация для получения стабильных ферментных препаратов.

4.2.1 Приготовление и свойства иммобилизированной липазы БКЛ

Для приготовления иммобилизованного фермента для применения в реакции переэтерификации была использована термостабильная рекомбинантная липаза бактерии *G. stearothermophilus* G3, продуцируемая штаммом *E. coli* B-1298, предоставленным для исследований ФИЦ ИЦИГ СО РАН. Данный фермент обладает специфичностью к *pNPC16*, а также оптимумом активности при 50 °С и pH 8.0-9.0. Время полуинактивации фермента составляет 145 мин. Фермент устойчив к органическим растворителям при 45 °С через 1 ч инкубации: в метаноле сохраняется 75% от исходной активности; в этаноле – 41%. Отличительным свойством фермента является его способность гидролизовать субстраты с длинноцепочечными жирными кислотами, что позволяет использовать его в реакциях переэтерификации растительных масел [413]. Высокие эксплуатационные характеристики липаз *Geobacillus* (оптимум активности выше 50 °С, стабильность при pH 4.5-10.0) позволяют применять их в различных отраслях, включая кожевенную промышленность [414], в синтезе сложных эфиров, в том числе МЭЖК [415]. Однако свойства этих ферментов мало изучены в реакции переэтерификации. Ранее с использованием липаз *Geobacillus* были получены иммобилизованные ферментные препараты на основе силикагеля для получения метилсалицилата [416], а также на пористом полипропилене Accurel EP-100 для гидролиза сложных эфиров жирных кислот [417].

Приготовление иммобилизованного ферментного препарата БКЛ проводили методом ковалентной иммобилизации липазы *G. stearothermophilus* G3 (удельная активность 483.2 ЕА г⁻¹) на активированном силикагеле АСКГ по методике, описаной в [418], которая включает активацию силикагеля, обработку 3-аминопропилтриэтоксисиланом и глутаровым альдегидом с последующим добавлением липазы. Этот способ иммобилизации обеспечивает приготовление биокатализаторов, стабильных при эксплуатации, как уже было показано ранее [419]. Относительная активность после иммобилизации липазы IcD составила 8.7%, а удельная активность БКЛ – 23.6 ЕА г⁻¹.

4.2.2 Приготовление ферментного препарата ПСФА-estUT1-TrxA

Анализ свойств эстеразы estUT1 (п. 4.1.2) выявил, что этот фермент является высокостабильным в различных условиях: время полуинактивации при температуре 50 °С составляет 12 ч, температурный оптимум – 70 – 80 °С, pH оптимум – 8.0, но ее активность

снижалась в присутствии CuSO_4 , MgSO_4 , PMSF и поверхностно-активных веществ. Особенностью фермента является наличие высокой субстратной специфичности к короткоцепочечным жирным остаткам (преимущественно к C_2), что позволяет использовать ее в процессах гидролиза короткоцепочечных сложных эфиров, в том числе инсектицида малатиона, инаktivация которого предстает собой сложную проблему в области водоочистки [420].

Для приготовления иммобилизованного ферментного препарата на основе термостабильной эстеразы estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* был использован фермент estUT1-TrxA с удельной активностью $200.7 \pm 15.5 \text{ ЕА мг}^{-1}$, полученный путем коэкспрессии с комбинацией шаперонов *E. coli* KJE, ClpB и ELS и выделенный из растворимой фракции белка в лизате клеток (п. 4.1.3.1). Использование эстеразы без отделения дополнительного домена TrxA позволяет получать фермент с достаточной термостабильностью, при этом избежав дополнительной дорогостоящей стадии обработки энтерокиназой. Одним из перспективных методов, применяемых в настоящее время для иммобилизации ферментов, является использование ПСФА. Иммобилизация фермента в этом случае проводится с минимальным количеством стадий и не требует использования материала-носителя [421], что снижает стоимость и повышает активность иммобилизованного фермента. Для этого первоначально проводят агрегацию белка из водного раствора в присутствии вещества-осадителя с последующим сшиванием агрегатов бифункциональным агентом (глутаральдегидом).

Для оптимизации процесса получения поперечно сшитых ферментных агрегатов эстеразы (ПСФА-estUT1-TrxA) оценивали влияние различных осадителей и добавок (Рисунок 37). Базовый эксперимент проводили в следующих условиях: 0.5 мл фермента (1 мг мл^{-1}), соотношение осадитель : фермент 3:1 (об. об.⁻¹), 75 мМ глутаровый альдегид, время реакции 4 ч.

Выявлено, что оптимальным осадителем (Рисунок 37А) для приготовления ПСФА на основе эстеразы является сульфат аммония (50%, вес. об.⁻¹), который ранее был использован для получения иммобилизованных протеаз [422], липаз [423], а также других ферментов.

Для улучшения свойств иммобилизованной липазы ее приготовление проводили в присутствии различных добавок (Рисунок 37Б). Для стабилизации фермента estUT1-TrxA использовали БСА, который содержит лизин, взаимодействующий с глутаровым альдегидом и снижающий инаktivацию фермента. Другим веществом, использованным для приготовления ПСФА, был SDS, который способствует осаждению агрегатов белка и увеличивает поверхность ферментного препарата [424]. Показано, что в присутствии БСА ферментативная активность увеличилась до $154.2 \pm 16.5\%$ ($p < 0.001$, двухвыборочный односторонний t-тест), при том, что активность в присутствии SDS была чуть выше контрольного значения и составила $109.7 \pm 8.4\%$ ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест).

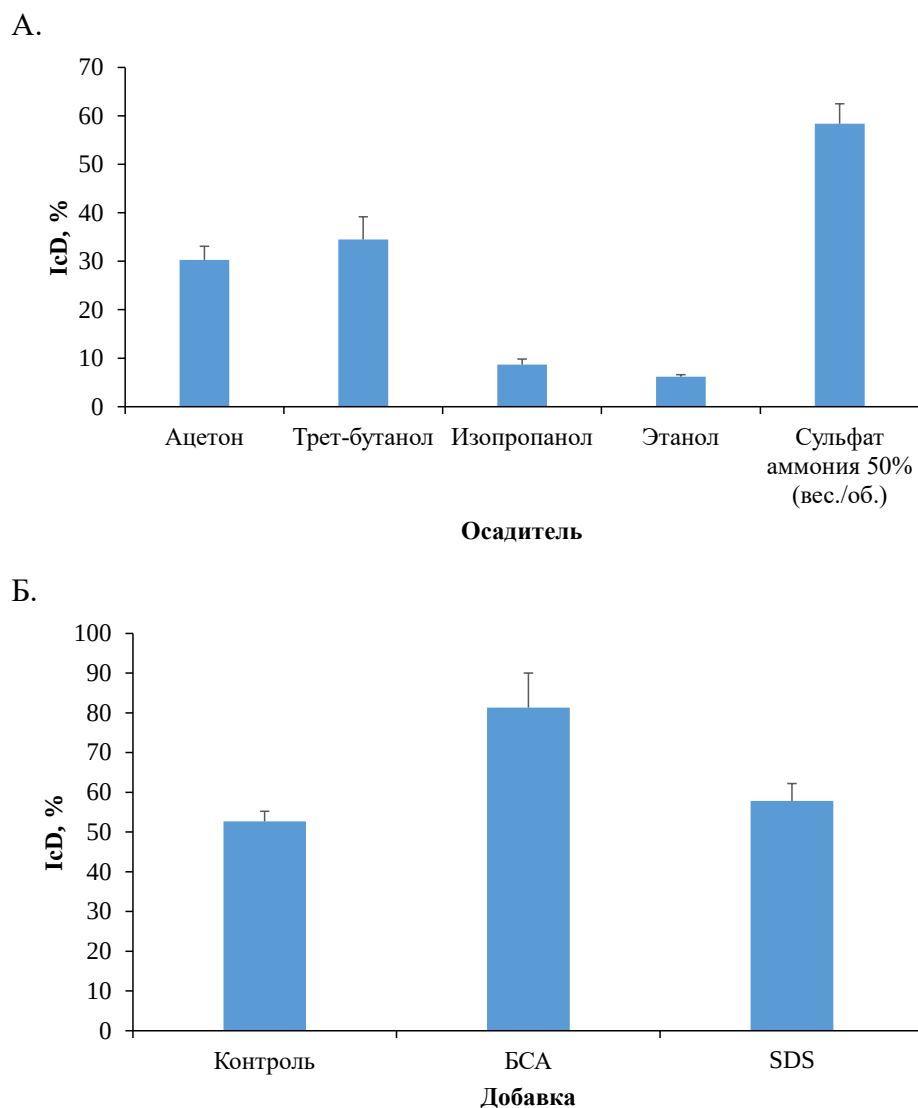


Рисунок 37 – Оптимизация приготовления ПСФА-estUT1-TrxA. (А) Влияние осадителей (статистический анализ проводили методом однофакторного дисперсионный анализа, $p < 0.001$ для всех значений), (Б) Влияние добавок (статистический анализ проводили методом двухвыборочного одностороннего t-теста, $p < 0.001$ для всех значений)

Для оптимизации процесса поперечной сшивки estUT1-TrxA был использован метод отклика поверхности и получена модель, описывающая влияние параметров реакции на степень иммобилизации. Гранецентрированный центрально-композиционный план состоял из 30 экспериментов [400], позволяющий получить достаточный объем информации для построения модели реакции на основании полиномиального уравнения второго порядка, описывающего влияние факторов на $IcD_{пр}$, как отклик поверхности. В качестве изменяемых параметров использовались: время иммобилизации (1 – 8 ч), концентрация сульфата аммония (30 – 80%), глутарового альдегида (25 – 150 мМ) и БСА (0.01 – 0.2 мМ). В предварительных экспериментах выявлено, что наибольшая $IcD_{пр}$ составила 85.4% (время реакции (4.5 ч), концентрация сульфата

аммония (55%), глутарового альдегида (87.5 мМ) и БСА (0.2 мМ)). По данным экспериментов были определены коэффициенты уравнения полной регрессионной модели и их статистическая значимость. По результатам регрессионного анализа была разработана полиномиальная модель второго порядка, описываемая следующим уравнением:

$$IcD_{\text{пр}} = 66.18 + 4.74A + 6.70B + 7.78C + 13.84D + 3.28AB + 2.12AC + 0.50AD + 0.45BC + 1.13BD - 0.47CD - 23.67A^2 - 10.69B^2 - 7.42C^2 + 7.32D^2, \quad (22)$$

где $IcD_{\text{пр}}$ – прогнозируемая относительная активность полученного ферментного препарата, А – время реакции, В – концентрация сульфата аммония, С – концентрация глутарового альдегида и D – концентрация БСА.

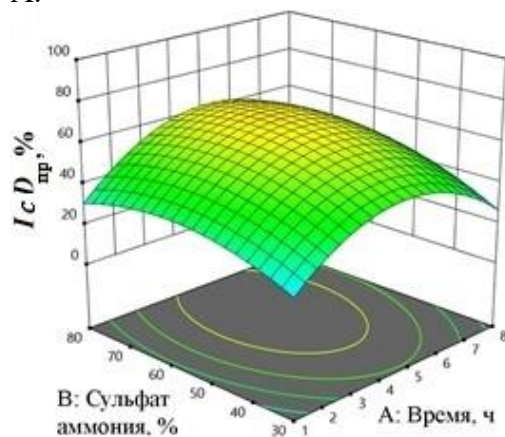
Для оценки качества полученной модели (Уравнение 22) использовали регрессионный анализ (Таблица 32). Выявлено, что F -фактор равен 33.36, $p < 0.0001$, что говорит о высокой

Таблица 32 – Регрессионный анализ статистической значимости модели отклика поверхности (Уравнение 22) [400]

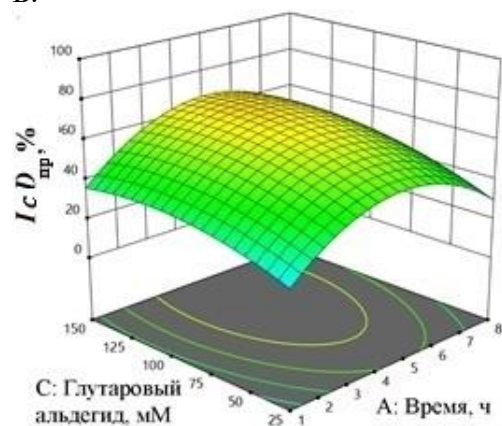
Параметр	Сумма квадратов	F -значение	p -значение
Модель	13771.01	33.36	< 0.0001
Время, А	403.56	13.69	0.0021
Сульфат аммония, В	808.96	27.44	0.0001
Глутаровый альдегид, С	1090.45	36.98	< 0.0001
БСА, D	3449.76	117.00	< 0.0001
AB	172.27	5.84	0.0288
AC	71.83	2.44	0.1394
AD	4.00	0.14	0.7178
BC	3.28	0.11	0.7435
BD	20.48	0.69	0.4177
CD	3.59	0.12	0.7319
A^2	1451.57	49.23	< 0.0001
B^2	296.06	10.04	0.0064
C^2	142.83	4.84	0.0438
D^2	138.84	4.71	0.0465
Отсутствие соответствия	375.04	2.79	0.1345

статистической достоверности взаимодействия всех факторов и значимости модели. Наиболее значимыми факторами для приготовления ПСФА-estUT1-TrxA являются время реакции и концентрация БСА ($p < 0.0001$). Графики поверхности (Рисунок 38) демонстрируют взаимодействия между переменными и оптимальное выявленное значение для каждого фактора

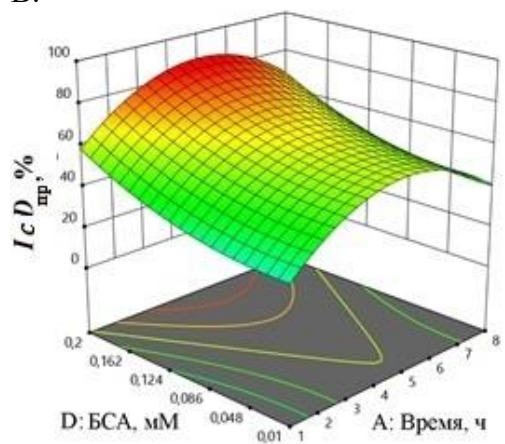
А.



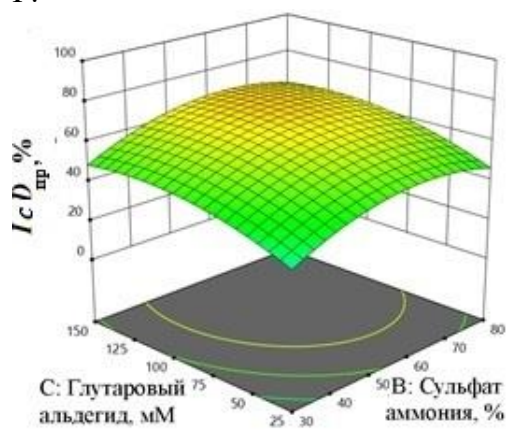
Б.



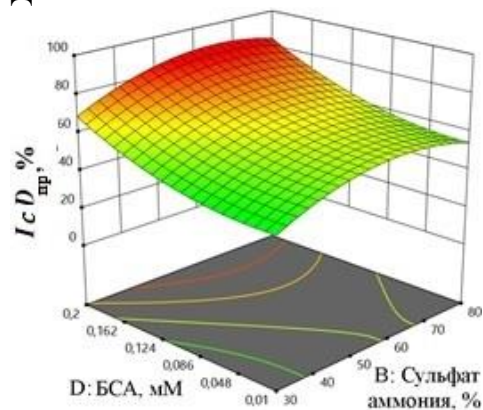
В.



Г.



Д.



Е.

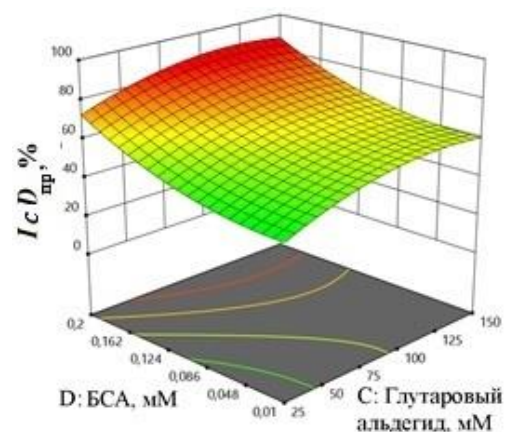


Рисунок 38 – Графики поверхности отклика $IcD_{пр}$ при взаимодействии переменных по данным RSM анализа оптимизированной модели иммобилизации эстеразы estUT1-TrxA методом ПСФА [400]. (А) Концентрация сульфата аммония и время иммобилизации, (Б) Концентрация глутарового альдегида и время иммобилизации, (В) Концентрация БСА и время иммобилизации, (Г) Концентрация глутарового альдегида и сульфата аммония, (Д) Концентрация БСА и сульфата аммония, (Е) Концентрация БСА и глутарового альдегида

(при фиксированных значениях остальных факторов). На Рисунках 38А, С показано влияние времени обработки глутаровым альдегидом на $IcD_{пр}$ для ПСФА-estUT1-TrxA. Наибольшее значение $IcD_{пр}$ наблюдалось через 4.5–5.5 ч. Согласно полученным данным, оптимальной концентрацией сульфата аммония для приготовления иммобилизированной эстеразы является 60 – 70% (Рисунок 38А, Г, Д), что коррелирует с данными, полученными для иммобилизированной липазы М37 из *Photobacterium lipolyticum* [425], для приготовления которой было использовано 70% насыщение раствора сульфатом аммония. Оптимизация концентрации глутарового альдегида как сшивающего агента позволяет замедлить разрушение ПСФА а также конформационно стабилизировать фермент [426]. Согласно полученной модели в этой работе оптимальной концентрацией глутарового альдегида являлась 115 – 125 мМ (Рисунок 38Б, Г, Е). Анализ поверхности отклика показал, что концентрация БСА влияет на $IcD_{пр}$ путем взаимодействия с такими факторами, как: время сшивки, концентрация сульфата аммония и глутарового альдегида (Рисунок 38В, Д, Е). Наибольшее значение $IcD_{пр}$ при приготовлении ПСФА-estUT1-TrxA наблюдалось при 0.2 мМ БСА, что коррелирует с исследованием [423], где 0.17 мМ БСА использовали для получения ПСФА липазы, выделенной из стручков какао. Таким образом, оптимальными условиями для приготовления ПСФА-estUT1-TrxA с $IcD_{пр}$ 91.3% являлись: 65.1% сульфата аммония, 120.6 мМ глутарового альдегида, 0.2 мМ БСА, 5.1 ч реакции.

Эксперимент, проведенный в оптимальных условиях, подтвердил высокое качество полученной модели: экспериментальное значение IcD составило $90.6 \pm 2.7\%$, активность – $0,0294 \pm 0.0005$ ЕА г⁻¹. Полученная модель реакции показала высокую надежность ($P = 0.95$) при сравнении с экспериментальными данными, что позволяет использовать ее для моделирования параметров приготовления ПСФА-estUT1-TrxA.

4.2.3 Приготовление ферментного препарата Ката

Для переработки липидов микроводорослей в МЭЖК в основном используют традиционные катализаторы: гомогенные кислотные [427], гомогенные щелочные [428] и гетерогенные [429]. Однако более экологичным является применение ферментативного биокатализа с использованием липаз. Показано, что их использование не только позволяет снизить температуру процесса, но также сократить количество отходов производства [221], [430]. В частности, для этого были использованы иммобилизированные липазы: *Candida rugosa* (в матрице из альгината натрия) для переэтерификации липидов *Tetraselmis* sp. [431]; *Bacillus* sp.

S23 (в альгинате натрия) для переэтерификации липидов *Nannochloropsis oculata* [432]; Novozym 435 [433] для переэтерификации липидов *Chlorella protothecoides*.

В этой работе для переэтерификации липидов микроводорослей использовалась коммерческая термостабильная липаза бактерии *B. ceracia*, которая характеризуется высокой устойчивостью к метанолу [15] и применима для переэтерификации растительных масел [434]. 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 п. 2.2.3.1. приведено описание приготовления иммобилизованного ферментного препарата КатА на основе липазы *B. ceracia*, относительная активность *IcD* составила 97.5%, а удельная активность - 0.143 ± 0.005 ЕА г⁻¹.

ГЛАВА 5. КОМПЛЕКСНЫЕ ПОДХОДЫ К ПЕРЕРАБОТКЕ КОМПОНЕНТОВ БИОМАССЫ В ВОСТРЕБОВАННЫЕ ПРОДУКТЫ

Липиды, получаемые из биомассы микроводорослей, или растительные масла преимущественно перерабатывают в МЭЖК, являющиеся основным компонентом биодизельного топлива. Одним из современных направлений получения МЭЖК является использование биокаталитических подходов, основанных на ферментативной переэтерификации под действием иммобилизованных ферментов липаз [435]. Одним из преимуществ такого подхода является большая экологичность и меньшая энергозатратность технологии получения продукта по сравнению с традиционными каталитическими процессами [436]. Для получения МЭЖК в этой работе использовали иммобилизованные термостабильные липазы, полученные из *G. stearothermophilus* и *B. ceracia*, отличающиеся высокой стабильностью в широком диапазоне условий. Иммобилизованная рекомбинантная липаза G3 из *G. stearothermophilus* также была использована для получения модифицированных жиров, получаемых путем биокаталитической переэтерификации растительных масел, применяемых в пищевой промышленности.

Биотехнологическая комплексная переработка другого компонента биомассы микроводорослей – углеводов, примененная в этой работе, включала их гидролиз с применением серной кислоты. Полученные моносахариды были впервые использованы для последующего сбраживания в янтарную кислоту, применяющуюся как в фармацевтической промышленности, так и в качестве регулятора кислотности в пищевой промышленности [437]. В рамках других исследований была продемонстрирована возможность применения биомассы микроводорослей с высоким содержанием углеводов для последующего получения муравьиной кислоты [383]. Применение такого подхода позволяет получать дополнительные продукты с высокой добавленной стоимостью.

Другим типом углеводсодержащего сырья, использованного в работе, явилась целлюлоза. Для ее комплексной переработки использовали гетерогенный кислотный катализатор на основе мезопористого углеродистого материала Сибунит-4 [438], который позволяет получать в процессе гидролиза целлюлозы глюкозу и 5-ГМФ, являющийся ценным химическим веществом, применяемым в производстве растворителей, топлива и полимеров [439]. Полученная глюкоза была впервые использована для сбраживания до этанола с использованием термотолерантных дрожжей, применение которых позволяет сократить затраты на его получение [440].

Схема подходов, использованная в работе, представлена на Рисунке 39.

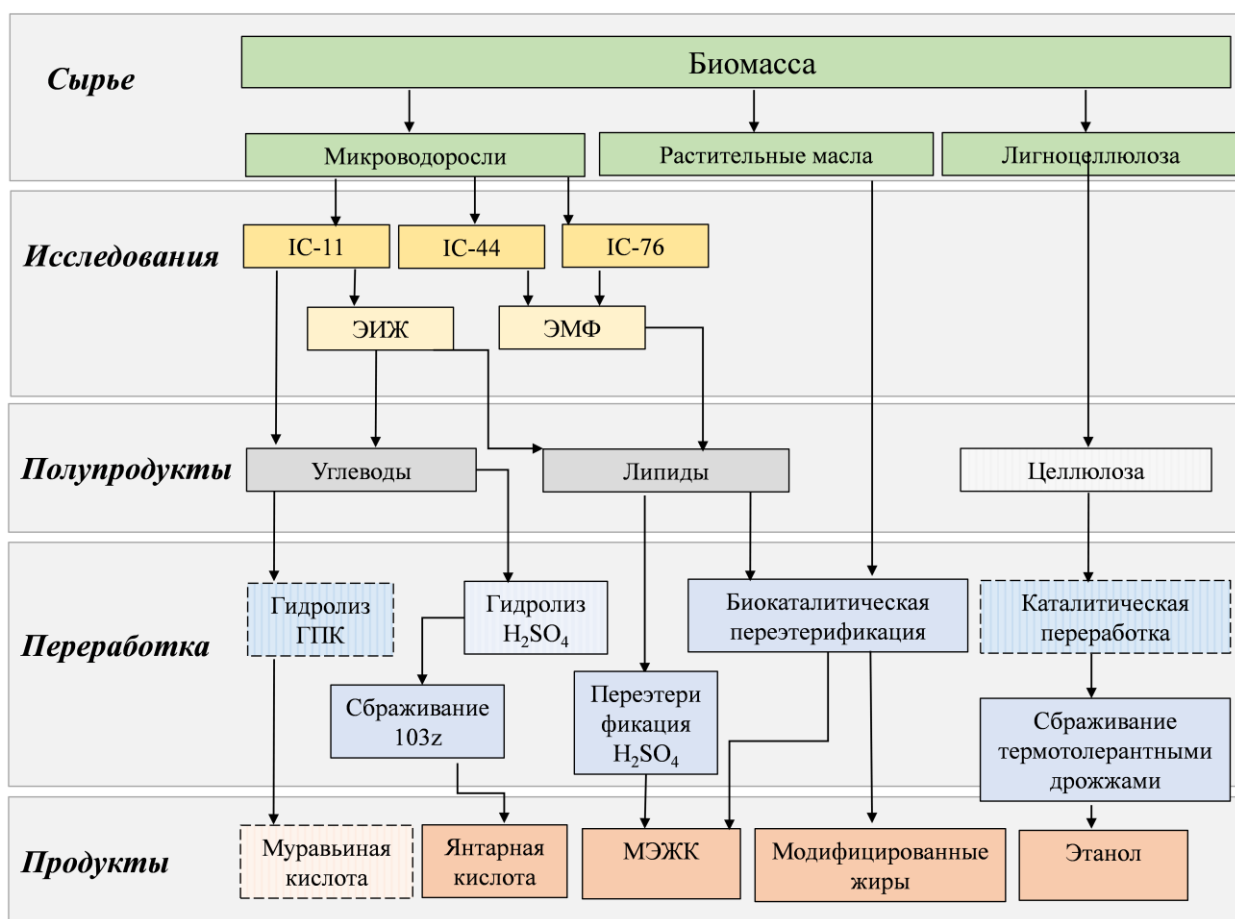


Рисунок 39 – Схема работ по переработке возобновляемого сырья в востребованные продукты. Условные обозначения: ЭИЖ – экстрагирование ионными жидкостями, ЭМФ- экстрагирование методом Фолча. Продукты, получаемые вне этой работы, отмечены штрихом

5.1 Переработка биомассы микроводорослей с высоким содержанием липидов и углеводов

5.1.1 Получение метиловых эфиров жирных кислот и янтарной кислоты из биомассы микроводорослей

Одной из основных проблем использования биомассы микроводорослей как возобновляемого сырья является как высокая стоимость получения сырья, так и продуктов ее переработки, в том числе МЭЖК [120]. Снижение затрат на производство МЭЖК как компонента биодизельного топлива требует получения дополнительных востребованных продуктов [441], использования дешевого сырья для культивирования (в том числе сточных вод [442]), применения штаммов, с большей эффективностью продуцирующих липиды [443], увеличения выхода МЭЖК, а также разработки энергоэффективных процессов отделения биомассы от культуральной жидкости, сушки и экстракции липидов [444].

Для получения липидов из биомассы микроводорослей в настоящее время в основном используется экстрагирование органическими растворителями, в том числе по методу Фолча, где применяется смесь хлороформа и метанола с последующим разделением фаз в присутствии солей. Ионные жидкости (ИЖ) применяются как альтернатива органическим растворителям из-за возможности их повторного использования и низкой токсичности [445], однако эффективность экстрагирования липидов из биомассы микроводорослей варьируется для разных типов ИЖ [446].

Поскольку стоимость экстрагирования липидов из биомассы микроводорослей составляет до 90% от затрат на производство биотоплива [447], в нескольких исследованиях было предложено использование прямой переэтерификации сухой [141] и влажной [448] биомассы микроводорослей, чтобы исключить необходимость применения промежуточной стадии экстракции липидов. Наиболее распространенными катализаторами, используемыми для прямой переэтерификации биомассы, являются H_2SO_4 [449] и ацетилхлорид [141], их использование позволяет достигнуть относительно высокого выхода МЭЖК, вплоть до 92.5%. Однако до сих пор не ясно, какой путь получения МЭЖК из биомассы микроводорослей является оптимальным (прямая переэтерификация или экстрагирование с последующей переэтерификацией) для получения максимального количества продукта реакции

Высокая эффективность и комплексность переработки биомассы микроводорослей может быть достигнута не только за счет увеличения выхода МЭЖК, но и за счет переработки оставшихся полисахаридов и белков в востребованные продукты [450]. Для гидролиза полисахаридов в основном используют H_2SO_4 [451] и ферменты класса гидролаз [452]. Полученные таким образом моносахариды (в основном глюкозу, маннозу и арабинозу [453]), затем подвергают сбраживанию микроорганизмами для получения востребованных продуктов, включая этанол [454], янтарную [455] и молочную [456] кислоты. Янтарная кислота - один из наиболее перспективных продуктов, широко используемых в пищевой, фармацевтической и химической промышленности [457]. К основным микроорганизмам, продуцирующим янтарную кислоту, относятся *Actinobacillus succinogenes* [458], *Mannheimia succiniciproducens* [459], генетически модифицированные штаммы *E. coli* [460], *Corynebacterium glutamicum* и *S. cerevisiae* [461]. В ранее проведенных исследованиях была показана возможность использования гидролизатов биомассы микроводорослей для получения янтарной кислоты [461], [462], [463]. В этой работе впервые для этой цели использовали гидролизат отходов биомассы, полученный после прямой переэтерификации в присутствии ионных жидкостей.

Для определения оптимального пути получения МЭЖК и янтарной кислоты предложена схема переработки липид содержащей биомассы *Micractinium* sp. IC-44 (Рисунок 39), партия которой была получена ранее в лабораторной установке (п. 3.7). Оценка выхода реакции

получения МЭЖК проводилась для каждого пути (прямая переэтерификация или экстрагирование липидов с последующей переэтерификацией). Остаточная биомасса, полученная после переэтерификации липидов, подвергалась гидролизу с последующим сбраживанием штаммом *A. succinogenes* 130Z с получением янтарной кислоты.

5.1.1.1 Сравнительный анализ эффективности экстрагирования липидов из биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44

Метанол [454] и *n*-гексан [465] часто используются в качестве растворителей для экстрагирования липидов из биомассы совместно с ИЖ, чтобы снизить высокую вязкость последних. Однако в ряде ранее проведенных исследований показано, что прямое экстрагирование липидов из микроводорослей проводилась с использованием ИЖ без добавления дополнительных растворителей. В данной работе липиды экстрагировались с использованием ИЖ без растворителей. В качестве контроля был использован традиционный метод экстрагирования с использованием смеси метанола и хлороформа в соотношении 1:2 (метод Фолча). Результаты приведены на Рисунке 40. Анализ результатов показал, что эффективность экстрагирования липидов из биомассы микроводорослей 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 $Y_{\text{лип/фолч}} = 84.5 \pm 7.6\%$. Этот результат коррелирует с данными работы [465], в которой [BMIM][HSO₄] использовалась без дополнительных растворителей для экстрагирования липидов из биомассы *C. sorokiniana*. Самая низкая эффективность экстрагирования липидов ($Y_{\text{лип/фолч}} = 27.1 \pm 1.9\%$) в настоящей работе наблюдалась при использовании [EMIM][Cl]. Выход липидов после экстракции с использованием [EMIM][Br] ($Y_{\text{лип/фолч}} = 31.9 \pm 2.6\%$) и [BMIM][Cl] ($Y_{\text{лип/фолч}} = 34.8 \pm 2.8\%$) был немного выше, чем при использовании [EMIM][Cl] ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест). Количество липидов, экстрагированных из биомассы *Micractinium* sp. IC-44 с использованием [EMIM][Cl] в этом исследовании, было ниже, чем в работе [466], возможно, из-за использования биомассы другого вида микроводорослей (*C. vulgaris*). Относительно высокие выходы липидов были получены в этой работе при экстрагировании с использованием [BMIM][OAc] и [C₈MIM][Br] ($Y_{\text{лип/фолч}} = 56.0 \pm 3.4\%$ и $Y_{\text{лип/фолч}} = 54.1 \pm 3.2\%$, соответственно). Эффективность экстрагирования липидов из биомассы микроводоросли *C. vulgaris* с использованием [BMIM][OAc] в работе [466] была сопоставима с эффективностью

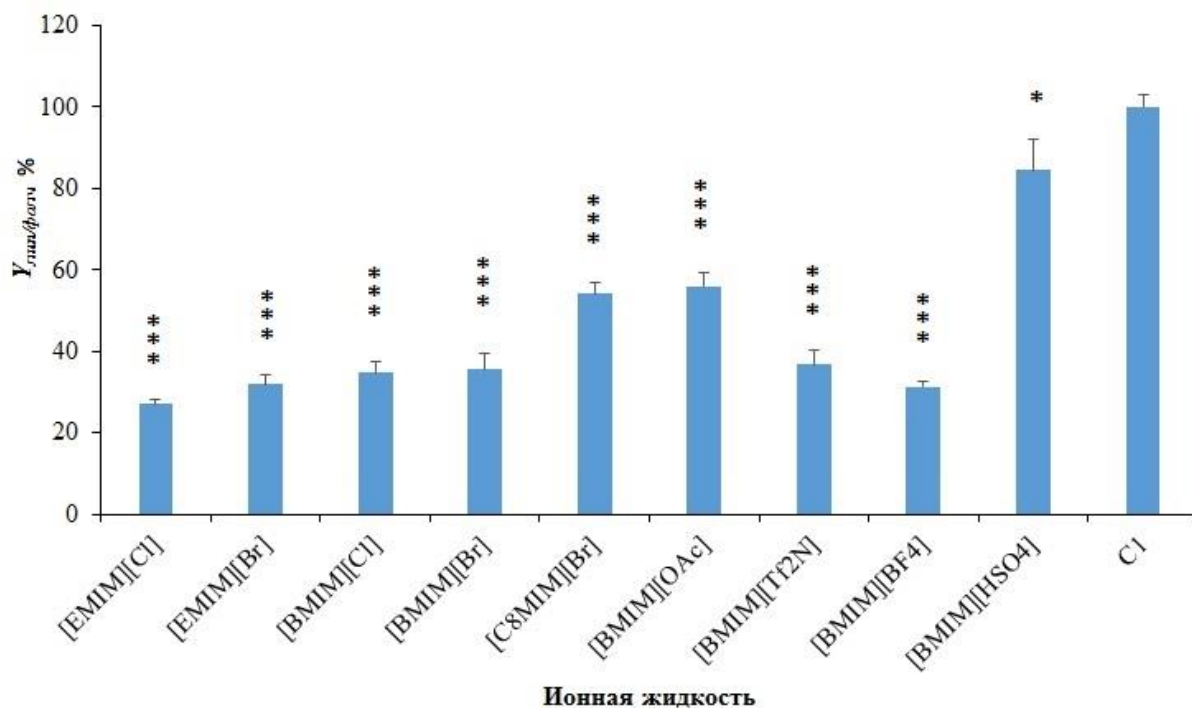


Рисунок 40 – Относительный выход липидов после их экстрагирования ИЖ из биомассы *Micractinium* sp. IC-44. C1 - Экстрагирование липидов по методу Фолча (принята за 100%).* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ двухвыборочный односторонний t-тест

экстрагирования липидов с использованием [EMIM][Cl] в этой работе, что позволяет предположить, что эффективность экстракции липидов с использованием ИЖ зависит от вида микроводоросли, биомасса которого была использована для извлечения липидов.

Анализ этих результатов показал, что ИЖ с ионом хлора в качестве акцептора водородной связи были наименее эффективны при экстракции липидов из *Micractinium* sp. IC-44. Напротив, ИЖ с большими ионами-акцепторами (включая [BMIM][HSO₄]) показали высокую эффективность экстрагирования. Выход липидов после экстракции с использованием ИЖ с нескоординированными анионами (BF₄⁻, Tf₂N⁻) был меньше, что коррелировало с данными работы [466].

5.1.1.2 Прямая переэтерификация биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44

Для оценки эффективности прямой химической переэтерификации образцов биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44 с использованием метанола в присутствии ионных жидкостей в предварительных экспериментах использовали [BMIM][HSO₄]. Было установлено,

что наибольший выход МЭЖК был достигнут с использованием 2% H_2SO_4 в течение 18 ч при соотношении биомасса : ИЖ 1:10 и температуре 65 °С.

Ионные жидкости, использованные для экстрагирования липидов, также применяли для прямой переэтерификации биомассы микроводорослей в присутствии 2% H_2SO_4 (Рисунок 41). Было показано, что выход МЭЖК зависит от природы ИЖ, особенно от структуры аниона. Максимальный выход МЭЖК ($Y_{\text{мэжк/фолч}} = 42.0 \pm 4.3\%$) наблюдался после прямой кислотной переэтерификации с использованием $[\text{BMIM}][\text{HSO}_4]$, что значительно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) превышало выход МЭЖК, полученный после экстрагирования по Фолчу и последующей переэтерификации кислотой ($27.1 \pm 2.4\%$) или при прямой переэтерификации биомассы без использования ИЖ ($31.6 \pm 1.7\%$). Экстрагирование липидов из биомассы *Micractinium* sp. IC-44 с использованием $[\text{BMIM}][\text{HSO}_4]$ с последующей кислотной переэтерификацией позволила получить $Y_{\text{мэжк/фолч}} 20.5 \pm 3.5\%$, что было значительно ($p < 0.01$) меньше, чем выход МЭЖК, полученный после экстрагирования по методу Фолча с последующей кислотной переэтерификацией липидов. Самый низкий выход МЭЖК ($Y_{\text{мэжк/фолч}} = 7.7 \pm 2.3\%$) был достигнут при прямой переэтерификации биомассы в присутствии $[\text{EMIM}][\text{Cl}]$ и 2% H_2SO_4 . В исследовании [467] было показано, что выход МЭЖК после прямой переэтерификации с использованием $[\text{EMIM}][\text{Cl}]$ также зависел от вида использованной биомассы (выход МЭЖК 8.0 и 36.0% был получен из биомассы микроводорослей, относящихся к родам *Dunaliella* и *Chlorella*, соответственно). Добавление $[\text{BMIM}][\text{OAc}]$ в этой работе снижало выход МЭЖК при прямой переэтерификации биомассы. Выход МЭЖК, полученный с использованием $[\text{BMIM}][\text{Br}]$ и $[\text{BMIM}][\text{Tf}_2\text{N}]$, составил 21.2 ± 2.5 и $18.3 \pm 1.4\%$, соответственно, и менее 10% - при использовании $[\text{EMIM}][\text{Br}]$ и $[\text{BMIM}][\text{Cl}]$.

В данной работе выход МЭЖК, полученный прямой переэтерификацией биомассы микроводоросли с использованием H_2SO_4 и ИЖ, уменьшался в следующем порядке анионов в ИЖ: $[\text{HSO}_4]^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{Br}]^- > [\text{Tf}_2\text{N}]^- > [\text{Cl}]^- > [\text{OAc}]^-$. Использование гидрофобных ИЖ привело к более низкому выходу МЭЖК после прямой переэтерификации биомассы *Micractinium* sp. IC-44. Поскольку прямая переэтерификация была наиболее эффективной для переработки липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44 в МЭЖК, этот метод был использован для получения сахаров для сбраживания *A. succinogenes* 130Z для наработки янтарной кислоты.

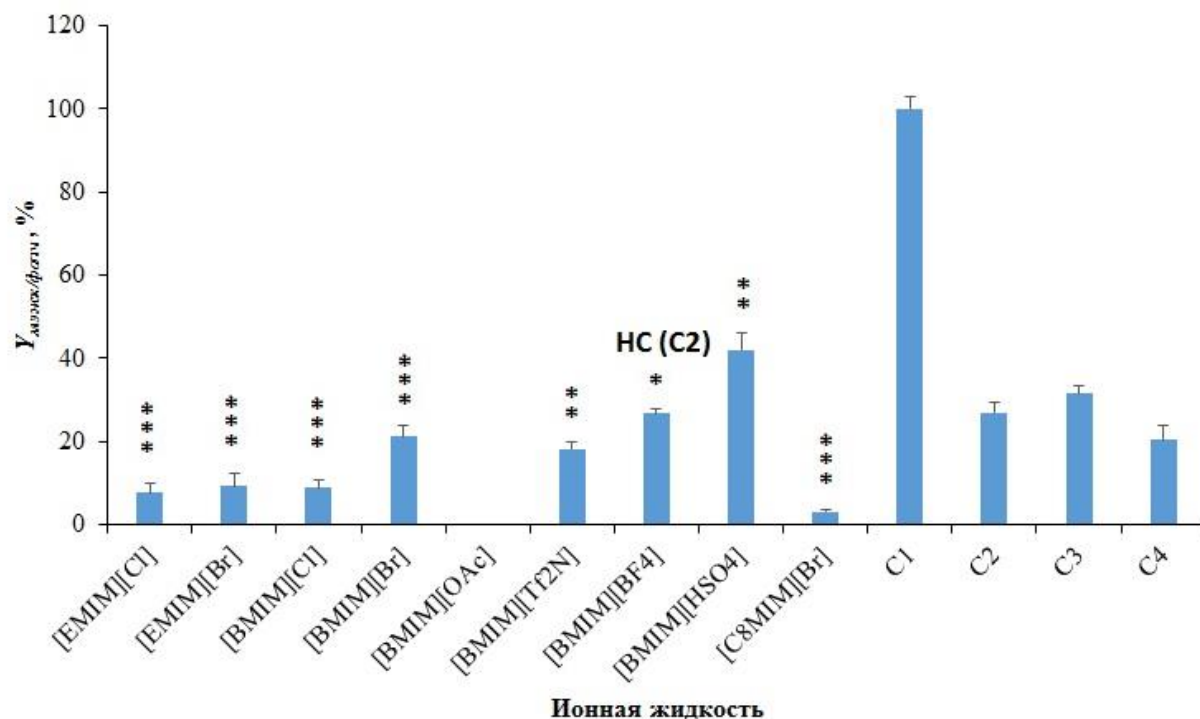


Рисунок 41 – Влияние ионных жидкостей на выход МЭЖК при прямой переэтерификации биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44. C1 – экстрагирование липидов по Фолчу (принята за 100%). C2 - Экстрагирование липидов по Фолчу с последующей переэтерификацией H₂SO₄; C3 - Прямая переэтерификация биомассы метанолом и 2% H₂SO₄ (без ИЖ). C4 - экстрагирование 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 ($p > 0.05$)

5.1.1.3 Сбраживание гидролизата остаточной биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44 для получения янтарной кислоты

Остаточную биомассу *Micractinium* sp. IC-44, полученную после ее прямой переэтерификации и отделения МЭЖК, сначала промывали водой для удаления остатков ИЖ. Гидролиз проводили с использованием 2% H₂SO₄ в автоклаве при 130 °C в течение 90 мин. ВЭЖХ анализ смеси показал присутствие сбраживаемых моносахаридов, включая арабинозу (3.2 ± 0.2 г л⁻¹), глюкозу (16.8 ± 0.9 г л⁻¹) и галактозу (0.32 ± 0.02 г л⁻¹), а также продуктов деструкции пентозы и гексозы (0.03 ± 0.01 г л⁻¹ 5-ГМФ и 1.1 ± 0.1 г л⁻¹ фурфурола) [292]. Состав углеводов биомассы *Micractinium* sp. IC-44 был близок к углеводам биомассы *Micractinium* sp. Embrapa | LBA32 [468], которую выращивали на среде BBM с глюкозой. Выход основных моносахаридов (по данным

ВЭЖХ) после кислотного гидролиза остаточной биомассы составил $81.1 \pm 2.4\%$ [469] от общего количества углеводов в биомассе (измеренных фенол-сернокислотным методом), и это было сопоставимо с выходом сахаров после разбавленного кислотного гидролиза биомассы различных микроводорослей, включая *Scenedesmus bijugatus* [470] и *Chlorella* sp. [466].

Полученный в этой работе гидролизат остаточной биомассы *Micractinium* sp. IC-44 нейтрализовали аммиаком и очищали на смоле AmberChrom 50WX4 для удаления ингибиторов, образовавшихся в процессе гидролиза, включая фурфурол и 5-ГМФ. После добавления в смесь раствора с солями и питательными веществами (среда С), его подвергали сбраживанию с использованием *A. succinogenes* 130Z в колбах, заполненных культуральной средой и оборудованных портом для пробоотборника, в атмосфере 2% CO₂. Результат показан на Рисунке 42 и в Таблице 33.

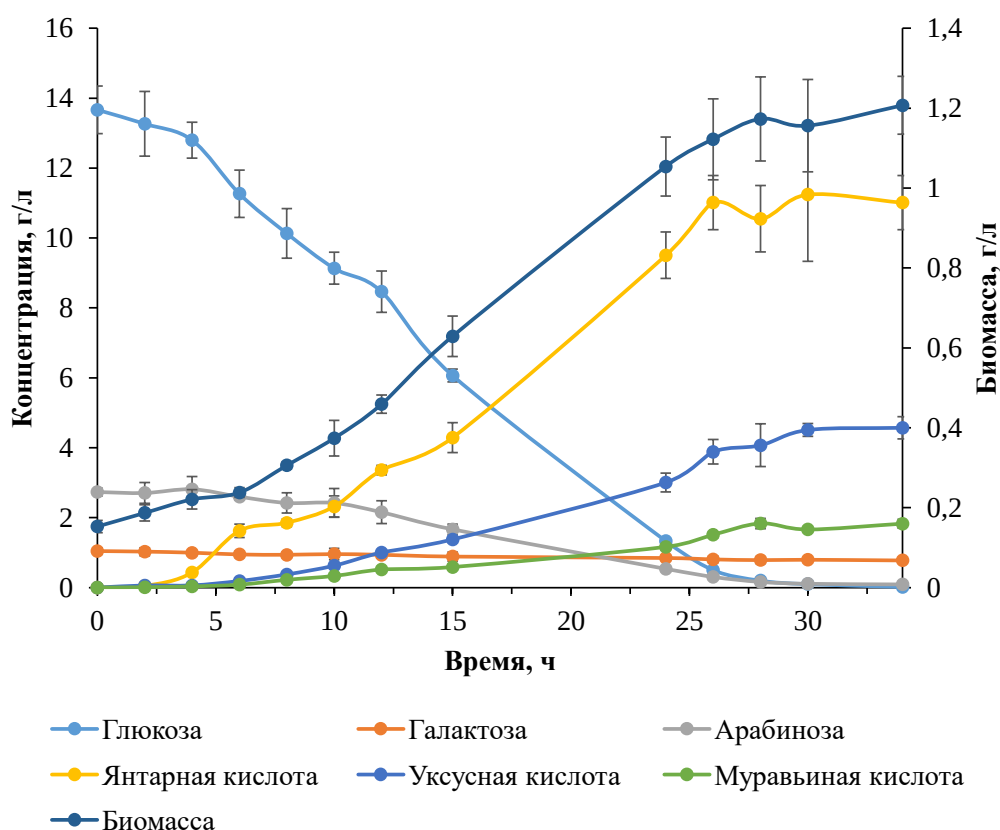


Рисунок 42 – Культивирование *A. succinogenes* 130Z в среде С в атмосфере 2% CO₂. Условия культивирования: объем среды 10 мл в атмосфере 2% CO₂, температура 37 °C

Во время сбраживания гидролизата *A. succinogenes* 130Z в этой работе первоначально штаммом потреблялась глюкоза и арабиноза, тогда как галактоза метаболизировалась только после снижения концентрации других моносахаридов (до $26.0 \pm 0.2\%$ от исходного количества). Аналогичное наблюдение было описано в работе [471], в котором потребление галактозы

составило менее 50% в конце процесса сбраживания гидролизата *A. succinogenes*. Следует отметить, что в культуральной жидкости была обнаружена низкая концентрация ингибиторов процесса сбраживания, что снижает их негативное влияние на синтез янтарной кислоты. 5-ГМФ не обнаруживался после нейтрализации и очистки гидролизата, тогда как фурфурол обнаруживался в небольших количествах (0.04 ± 0.02 г л⁻¹). Выходы других продуктов сбраживания, включая муравьиную и уксусную кислоты, были сопоставимы с данными других исследований [472]. Выход янтарной кислоты в этой работе по окончании сбраживания гидролизата в среде С составил $67.0 \pm 5.0\%$ от общего количества моносахаридов через 34 ч.

Таблица 33 – Параметры процесса культивирования штамма *A. succinogenes* 130Z в среде С

Параметр	Начальная концентрация, г л ⁻¹	Конечная концентрация, г л ⁻¹	Y _{N/S} , %	V _p , г л ⁻¹ ч ⁻¹
Биомасса	0.15 ± 0.1	1.21 ± 0.3	6.0 ± 1.0	0.042 ± 0.02
Глюкоза	13.66 ± 0.8	0.02 ± 0.01	-	-
Галактоза	1.04 ± 0.1	0.77 ± 0.05	-	-
Арабиноза	2.73 ± 0.3	0.01 ± 0.0	-	-
5-ГМФ	0	0	-	-
Фурфурол	0.04 ± 0.02	0	-	-
Янтарная кислота	-	11.01 ± 1.23	67.0 ± 5.0	0.17 ± 0.02
Уксусная кислота	-	4.57 ± 0.3	28.0 ± 3.0	0.11 ± 0.01
Муравьиная кислота	-	1.83 ± 0.1	11.0 ± 2.0	0.06 ± 0.02

5.1.2 Применение ферментного препарата КатА для получения метиловых эфиров жирных кислот из липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76

Для получения МЭЖК с использованием ферментного препарата КатА на основе липазы *B. ceracia* были использованы липиды микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 после их экстрагирования по методу Фолча, как наиболее часто применяемого для экстракции липидов из микроводорослей. Для оптимизации реакции переэтерификации липидов микроводорослей в присутствии ферментного препарата КатА применяли метод RSM с использованием центрального композиционного планирования. 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 количество воды (0 – 5.0%) [473]. В реакции в качестве дополнительного растворителя в реакции использовали *n*-гексан, поскольку по данным других исследований именно он уменьшает денатурацию фермента и обеспечивает высокий

выход МЭЖК в реакции ферментативной переэтерификации масел с метанолом [148]. Для построения полиномиальной модели второго порядка поверхности отклика было определено количество экспериментов (30 шт., из них шестнадцать непосредственно использовались для расчета факторов, восемь – осевых, дополнительные шесть повторов – центральных), позволяющих оценить влияние четырех факторов в отношении пяти уровней независимых переменных на прогнозируемый выход МЭЖК в реакции переэтерификации. Наибольший $Y_{\text{МЭЖК}}$ 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, описанная Уравнением 22:

$$Y_{\text{пр1}} = 84.54 + 2.41A - 6.30B + 0.71C - 4.54D + 0.13AB + 0.083AC - 0.43AD + 0.22BC + 0.81BD - 1.23CD - 2.89A^2 - 5.16B^2 - 0.74C^2 - 0.23D^2 \quad (22)$$

где $Y_{\text{пр1}}$ – прогнозируемый выход МЭЖК в реакции переэтерификации липидов *Micractinium* sp. IC-76 с метанолом в соответствии с моделью, А – количество Ката, В – температура, С – содержание воды и D – молярное соотношение метанол : липиды.

Регрессионный анализ, отражающий качество модели и значимость взаимного влияния отдельных факторов на прогнозируемый выход МЭЖК (Таблица 34), показал, что для полученной модели значение коэффициента R^2 составило 0.9264, модель имеет высокий уровень достоверности ($p < 0.0001$), F -значение составляет 13.49. Значимыми факторами для реакции переэтерификации являются температура, соотношение метанол : масло ($p < 0.0001$) и количество Ката ($p < 0.05$).

По данным регрессионного анализа концентрация воды не оказывала значимого ($p = 0.3534$) влияния на $Y_{\text{пр1}}$, этот фактор был исключен из модели. Уравнение 23, описывающее новую оптимизированную модель, приведено ниже:

$$Y_{\text{пр2}} = 83.69 + 2.41A - 6.30B - 4.54D + 0.13AB - 0.43AD + 0.81BD - 2.78A^2 - 5.05B^2 - 0.13D^2, \quad (23)$$

где $Y_{\text{пр2}}$ – прогнозируемый выход МЭЖК в реакции переэтерификации в соответствии с оптимизированной моделью, описываемой Уравнением 23, А – количество Ката, В – температура и D – соотношение метанол : липиды.

Таблица 34 – Регрессионный анализ модели реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 с метанолом в присутствии Ката и его статистическая значимость

Наименование	Сумма квадратов	df	Средний квадрат	F	p-значение
Модель	2515.50	14	179.68	13.49	< 0.0001
А-концентрация Ката	139.05	1	139.05	10.44	0.0056
В-температура	953.16	1	953.16	71.54	< 0.0001
С-содержание воды	12.22	1	12.22	0.92	0.3534
D-метанол : липиды	495.14	1	495.14	37.16	< 0.0001
AB	0.26	1	0.26	0.020	0.8902
AC	0.11	1	0.11	0.008	0.9284
AD	2.91	1	2.91	0.22	0.6467
BC	0.78	1	0.78	0.058	0.8126
BD	10.37	1	10.37	0.78	0.3916
CD	24.20	1	24.20	1.82	0.1977
A ²	228.85	1	228.85	17.18	0.0009
B ²	729.76	1	729.76	54.77	< 0.0001
C ²	15.12	1	15.12	1.13	0.3037
D ²	1.48	1	1.48	0.11	0.7432
Остаток	199.86	15	13.32		
Отсутствие соответствия	168.74	10	16.87	2.71	0.1413
Чистая ошибка	31.12	5	6.22		
Скорректированное для среднего	2715.35	29			

Регрессионный анализ оптимизированной модели реакции переэтерификации (Таблица 35) выявил, что качество модели увеличилось за счет увеличения значения *F*-критерия с 13.49 до 21.7. Графики поверхности отклика при взаимном влиянии различных факторов (остальные факторы при этом имеют фиксированное значение) на $Y_{\text{пр2}}$ приведены на Рисунке 43. Показано, что предсказанный выход МЭЖК при переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 с метанолом в присутствии Ката наблюдался при 36 – 45 °С, что коррелирует с данными работы [474], а также при соотношении метанол : липиды 3:1 – 5:1. Количество Ката в реакционной смеси оказывало значительное влияние на прогнозируемый выход реакции переэтерификации липидов микроводорослей (Рисунок 43А, В), оптимальное количество составляло 8 – 12%, что коррелирует с данными по иммобилизированной липазе *P. serascia* [475] и *R. miehei* [476]. Для этих ферментов было высказано предположение, что снижение выхода может быть связано как с уменьшением массопереноса из-за увеличения концентрации Ката, так и с наличием остаточной воды в препарате липазы. По данным улучшенной модели, оптимальными условиями реакции, обеспечивающими наибольший $Y_{\text{пр2}}$,

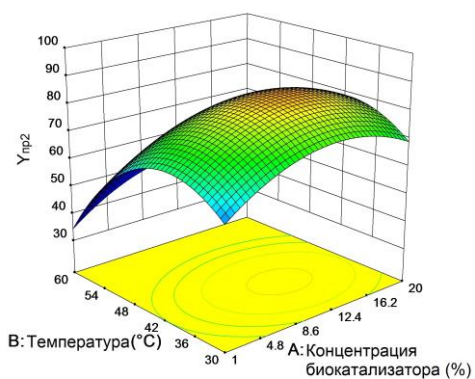
Таблица 35 – Регрессионный анализ оптимизированной модели реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 с метанолом в присутствии КатА и его статистическая значимость [473]

Источник	Сумма квадратов	df	Средний квадрат	F	p > F
Модель	2463.07	9	273.67	21.70	< 0.0001
А-концентрация КатА	139.05	1	139.05	11.02	0.0034
В-температура	953.16	1	953.16	75.56	< 0.0001
Д-метанол : липиды	495.14	1	495.14	39.25	< 0.0001
AB	0.26	1	0.26	0.021	0.8867
AD	2.91	1	2.91	0.23	0.6360
BD	10.37	1	10.37	0.82	0.3754
A ²	216.77	1	216.77	17.18	0.0005
B ²	714.64	1	714.64	56.65	< 0.0001
D ²	0.45	1	0.45	0.036	0.8523
Остаток	252.28	20	12.61		
Отсутствие соответствия	221.16	15	14.74	2.37	0.1738
Чистая ошибка	31.12	5	6.22		
Скорректированное для среднего	2715.35	29			

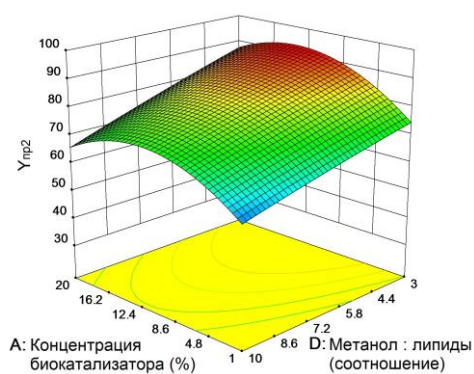
являлись: 39.8 °С, концентрация КатА 12.3%, соотношение метанол : липиды 1:3.5, концентрация воды 2.3%.

Оценка операционной стабильности КатА (Рисунок 44) в оптимальных условиях показала, что через четыре цикла эксплуатации (один цикл – 24 ч) активность составляет $45.7 \pm 4.8\%$ при начальной активности $92.9 \pm 0.8\%$, что близко к данным работы [474], где липаза *Burkholderia* sp. C20, иммобилизованная на гибридном наноматериале Fe₃O₄-SiO₂, при переэтерификации липидов микроводоросли *C. vulgaris* ESP-31 сохраняла 65% начальной активности в четырех реакционных циклах. Снижение активности КатА в процессе эксплуатации может быть связано с негативным действием полярных липидов (фосфолипидов и гликолипидов), содержащихся в липидных экстрактах и ухудшающих разделение фаз [477]. Таким образом, КатА может быть использован для получения биодизельного топлива из липидов микроводорослей благодаря высокому выходу МЭЖК при относительно низкой температуре реакции и концентрации КатА, однако для его эффективного применения в этом процессе необходима дополнительная очистка сырья перед проведением реакции.

А.



Б.



В.

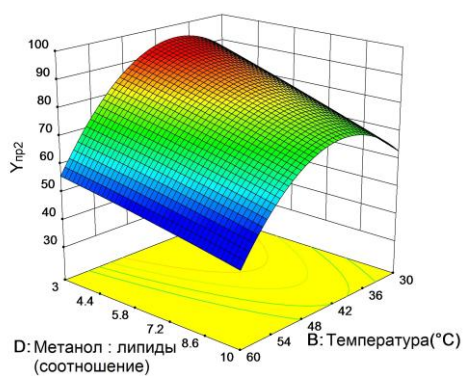


Рисунок 43 – Графики поверхности отклика RSM модели реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 с метанолом в присутствии КатаА: (А) Температура и количество КатаА, (Б) Количество КатаА и метанол : липиды, (В) метанол : липиды и температура

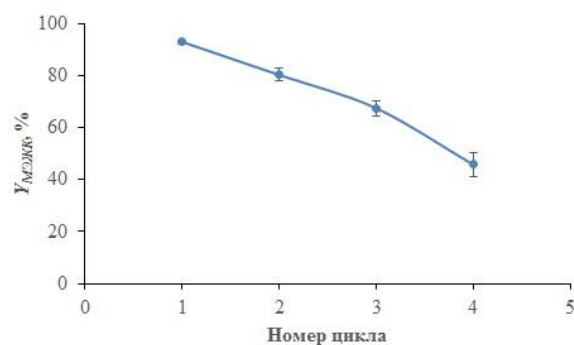


Рисунок 44 – Стабильность КатаА в реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 в оптимальных условиях

5.1.3 Сравнение эффективности подходов к переработке биомассы микроводорослей для получения востребованных продуктов

5.1.3.1 Получение метиловых эфиров жирных кислот

Сравнение различных способов экстракции липидов из биомассы водоросли *Micractinium* sp. IC-44 (п. 5.1.1.1) показало, что наибольшая эффективность процесса достигалась при использовании ионной жидкости [BMIM][HSO₄] ($Y_{\text{лип/фолч}} 84.5 \pm 7.6\%$) (Рисунок 40). Во время прямой переэтерификации использование гидрофобных ионных жидкостей [BMIM][OAc] и [C₈MIM][Br], в отличие от гидрофильной [BMIM][HSO₄], значительно ($p < 0.001$, двухвыборочный односторонний t-тест) снижает выход МЭЖК в сравнении с прямой переэтерификацией биомассы *Micractinium* sp. IC-44 без ИЖ (Рисунок 41). Только [BMIM][HSO₄], являющаяся кислотой Бренстеда, была эффективна в обоих процессах (экстрагирования и прямой переэтерификации), возможно, из-за своей кислой природы, что способствовало и экстрагированию липидов [478] и прямой переэтерификации в присутствии H₂SO₄.

Эффективность прямой переэтерификации биомассы *Micractinium* sp. IC-44 значительно ($p < 0.05$, двухвыборочный односторонний t-тест) снижалась при использовании менее кислых ИЖ, включая [BMIM][BF₄]. При анализе литературных данных (Таблица 36) выявлено, что [BMIM][HSO₄] также применяли в работе [141] для прямой переэтерификации биомассы микроводоросли *N. oceanica*, выход МЭЖК составил 28%. Выход МЭЖК после прямой переэтерификации в настоящем исследовании был больше, чем после прямой переэтерификации биомассы *Nannochloropsis* sp. с использованием [EMIM][MeSO₄] с ультразвуковой обработкой (36.79%) [140]. Следовательно, для повышения эффективности прямой переэтерификации биомассы микроводорослей необходимо использовать кислые ИЖ Бренстеда, повышающие эффективность одновременно протекающих процессов экстракции липидов и переэтерификации. Повышение выхода МЭЖК может быть достигнуто за счет применения ИЖ с низкой вязкостью, например, [BMIM][CF₃SO₃] [141], использования кислотного катализатора [467] и обработки ультразвуком [140] (Таблица 36).

Анализ эффективности двухэтапного процесса экстрагирования и переэтерификации липидов *Micractinium* sp. IC-44 показал, что применение [BMIM][HSO₄] для экстрагирования было менее эффективным, чем применение метода Фолча (Рисунок 41, столбцы C2 и C4), а снижение выхода МЭЖК может быть связано с потерями продукта в процессе переработки биомассы. Более того, выход МЭЖК, полученный во время прямой переэтерификации биомассы *Micractinium* sp. IC-44 в присутствии [BMIM][HSO₄], был выше, чем выход, полученный при

Таблица 36 – Сравнение эффективности получения МЭЖК из биомассы микроводорослей с использованием различных подходов

Способ получения МЭЖК	ИЖ/иммобилизованная липаза	Сырьё	Условия	Выход МЭЖК %	Ссылка
Прямая переэтерификация липидов биомассы в присутствии ИЖ	[EMIM][MeSO ₄]	<i>Nannochloropsis</i> sp.	1.0 г биомассы (влажность 80%), избыток метанола, реакция при обработке ультразвуком мощностью 700 Вт, 65 °С, 15 мин	36.79	[140]
	[BMIM][HSO ₄]	<i>N. oceanica</i>	165 мг биомассы (влажность 65%), с 1.2% ацетилхлорида, 1 мл метанола и 0.05 г ИЖ, реакция при температуре 65° С в течение 18 ч	28	[141]
	[BMIM][CF ₃ SO ₃]	<i>N. oceanica</i>	165 мг биомассы (влажность 65%), с 1.2% ацетилхлорида, 1 мл метанола и 0.05 г ИЖ, реакция при температуре 65° С в течение 14 ч	54	[141]
Прямая переэтерификация липидов биомассы	-	<i>C. pyrenoidosa</i>	100.89 г сухой биомассы, 300 мкл метанола, 20 г H ₂ SO ₄ , реакция при температуре 60 °С 4 ч	8.9	[479]
Экстрагирование липидов хлороформ-метанольной смесью с последующей переэтерификацией H ₂ SO ₄	-	<i>C. pyrenoidosa</i>	Экстрагирование: 100 г сухой биомассы, 300 мл смеси хлороформ: метанол (2:1). Переэтерификация: к липидам добавляли 3% H ₂ SO ₄ , 60 мл метанола, реакцию проводили при 60°С 4 ч	7.8	[479]
Экстрагирование липидов хлороформ-метанольной смесью с последующей переэтерификацией H ₂ SO ₄	-	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	Экстрагирование: хлороформ : метанол (2:1). Переэтерификация: 2% H ₂ SO ₄ в метаноле в течение 18 ч и температуре 65 °С	27.1±2.4	Эта работа
Экстрагирование липидов ионной жидкостью с последующей	[BMIM][HSO ₄]	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	Экстрагирование: [BMIM][HSO ₄] Переэтерификация: 2% H ₂ SO ₄ в метаноле в	20.5±3.5	Эта работа

переэтерификация H_2SO_4			течение 18 ч и температуре 65 °С		
Прямая переэтерификация липидов биомассы в присутствии ИЖ	[BMIM][HSO ₄]	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	Прямая переэтерификация: 1 г сухой биомассы, 10 мл метанола с 2% H_2SO_4 и 10 г ИЖ	42.0±4.3	Эта работа
Биокаталитическая переэтерификация экстрагированных липидов	<i>P. antarctica</i> (Novozyme 435, адсорбция на акриловой смоле)	<i>N. oceanica</i> IMET1	20 % ФП [§] , 25 °С, метанол : масло 12:1, 4 ч	99.1	[474]
	<i>P. antarctica</i> (Novozyme 435, адсорбция на акриловой смоле)	<i>C. protothecoides</i>	5% ФП, 45 °С, метанол : масло 3:1, 6 ч	97	[433]
	<i>Candida</i> sp. 99-125 (адсорбция на макропористой смоле)	<i>C. protothecoides</i>	75% ФП, 38 °С, метанол : масло 3:1, 12 ч	98	[481]
	<i>Candida</i> sp. 99-125 (адсорбция на макропористой смоле)	<i>C. protothecoides</i>	30% ФП, 38 °С, метанол : масло 3:1, 12 ч	98	[482]
	<i>Penicillium expansum</i> (ПСФА)	<i>C. pyrenoidosa</i>	20% ФП, 50 °С, 3% воды, метанол : масло 3:1, 48 ч	85.7	[483]
	<i>R. oryzae</i> (ковалентная иммобилизация на Fe ₃ O ₄ с оксидом графена)	<i>C. vulgaris</i>	1.1% ФП, 45 °С, 24 ч	71.19	[146]
	<i>B. cepacia</i> (ПСФА)	<i>Micractinium</i> sp. IC-76	12.3 ФП, 40°С, 2.3% воды, метанол : липиды 3.5:1, 24 ч	92.9	Эта работа

[§]ФП – ферментный препарат

двухстадийной или прямой переэтерификации без использования ИЖ. Эти результаты коррелировали с данными [473], в которых применение прямой переэтерификации биомассы *C. pyrenoidosa* позволило достигнуть выхода МЭЖК, который был немного больше, чем после экстрагирования и последующей переэтерификации липидов из биомассы (Таблица 36). Следовательно, применение кислотной ионной жидкости [BMIM][HSO₄] для получения МЭЖК путем прямой переэтерификации биомассы *Micractinium* sp. IC-44 является эффективным подходом, который по сравнению с прямой переэтерификацией или двухэтапным подходом, включающим экстрагирование (методом Фолча или с использованием ИЖ) и последующую переэтерификацию, не требует промежуточной стадии выделения липидов.

Анализ литературных данных (Таблица 36) также показал, что, хотя ферментативная переэтерификация липидов микроводорослей применяется реже по сравнению с химической или каталитической переэтерификацией (выход составляет до 99% [484]), в ряде случаев она обладает высокой эффективностью. В частности, при использовании коммерческой иммобилизированной на акриловой смоле липазы *P. antarctica* (входящей в состав ферментативного препарата Novozyme 435) достигнут выход МЭЖК свыше 97% при переэтерификации липидов *C. protothecoides* в присутствии малого количества иммобилизированной липазы (5%) [433]. Аналогичный результат был получен с использованием липидов *N. oceanica* IMET1 (выход МЭЖК 99.1%), но при 20% Novozym 435 [480]. Липаза *Candida* sp. 99-125 продемонстрировала высокую эффективность при применении в качестве иммобилизованного (на макропористой смоле) ферментного препарата ($Y_{\text{МЭЖК}}$ в реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Chlorella* составил 98%), но в реакции была использована высокая концентрация ферментного препарата (свыше 30%) [481], [482]. Меньший выход реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Chlorella*, равный 90.81 и 71.19%, наблюдался для липазы *P. fluorescens*, адсорбированной на смоле Immobead 150, и для *R. oryzae*, иммобилизированной на Fe_3O_4 с оксидом графена, соответственно [145], однако последний ферментный препарат применялся при более высокой температуре (свыше 45 °C). Применение ПСФА на основе *P. expansum* [483] позволило получить выход МЭЖК из липидов *C. pyrenoidosa*, равный 85.7%, что меньше, чем выход МЭЖК, достигнутый с использованием Ката в этой работе (Таблица 36). Таким образом, Ката на основе ПСФА липазы *B. serapia* оказался высоко эффективен в реакции переэтерификации липидов микроводорослей и сравним по этому показателю с коммерческим ферментным препаратом Novozym 435.

Сравнение эффективности ферментативной переэтерификации липидов микроводорослей с прямой и двухстадийной переэтерификацией (Таблица 36) на основании данных, полученных в этой работе, показывает, что применение иммобилизованных ферментов позволяет достигнуть более высокого выхода МЭЖК. Однако высокая стоимость ферментов и ионных жидкостей в настоящее время ограничивает их применение в укрупненном масштабе [485], что делает экстрагирование органическими растворителями с последующей кислотной переэтерификацией наиболее приемлемым способом получения МЭЖК.

5.1.3.2 Получение органических кислот

Сравнение результатов по получению янтарной кислоты из углеводов биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44 с литературными данными приведены в Таблице 37. Показано, что полученные в этой работе результаты сопоставимы с данными исследования [462], где гидролизованную биомассу *Scenedesmus acutus* сбраживали штаммом *A. succinogenes* 130Z до янтарной кислоты с выходом 0.7 г г^{-1} сахаров. В работе [455] крахмал, полученный из микроводоросли *C. reinhardtii*, сбраживали с помощью рекомбинантного штамма *C. glutamicum*, выход янтарной кислоты составил 0.28 г г^{-1} от общего количества сахаров. Таким образом, продуцент янтарной кислоты *A. succinogenes* 130Z обеспечивает высокий выход янтарной кислоты и может быть использован для сбраживания гидролизата остаточной биомассы, полученной после прямой переэтерификации в присутствии ИЖ. Достоинством предложенного в этой работе подхода является возможность получения двух востребованных продуктов (МЭЖК и янтарной кислоты), а также более полная переработка исходной биомассы. Тем не менее, выход янтарной кислоты, полученный в данной работе, был ниже, чем при использовании *A. succinogenes* и жидкого кукурузного экстракта (83%) [486]. Анализ литературных данных (Таблица 37) показал, что биомасса микроводорослей была использована для получения муравьиной кислоты лишь в работе [487]. С этой целью использовали биомассу *S. obliquus* после ее термохимической обработки H_2SO_4 ; в результате была получена смесь продуктов (муравьиной и левулиновой кислот). В статье [383] была использована наработанная в рамках данной работы биомасса *P. kessleri* IC-11 с высоким содержанием углеводов (Глава 4), выход муравьиной кислоты превысил данные работы [487] и составил 49%. Таким образом, биомасса *P. kessleri* IC-11 может применяться как сырье для получения муравьиной кислоты с использованием гетерополикислот.

Таблица 37 – Сравнение данных по получению органических кислот из биомассы микроводорослей с литературными данными

Способ получения продукта	Штамм-продуцент/к атализатор	Сырье	Условия сбраживания	Выход продукта	Ссылк а
Сбраживание	<i>A. succinogenes</i> 130Z	<i>S. acutus</i>	Гидролизат получен путем гидролиза в 2% H_2SO_4 .	Янтарная кислота (0.7 г г^{-1} сахаров)	[462]
Сбраживание	Рекомби-нантный штамм <i>C. glutamicum</i>	<i>C. reinhardtii</i>	Для гидролиза крахмала из биомассы микроводоросли	Янтарная кислота (0.28 г г^{-1} сахаров)	[455]

			использовали α -амилазу, продуцируемую рекомбинантным штаммом <i>C. Glutamicum</i>		
Сбраживание	<i>A. succinogenes</i> 130Z	<i>Micractinium</i> sp. IC-44	Использовался подготовленный гидролизат остаточной биомассы, полученной после прямой переэтерификации в присутствии [BMIM][HSO ₄] (среда YNB-H); в атмосфере 2% CO ₂ , температура 37 °C, 34 ч	Янтарная кислота (0.67 ± 0.5 г г ⁻¹ сахаров)	Эта работа
Термохимическая каталитическая реакция	H ₂ SO ₄	<i>S. obliquus</i>	5% биомассы, 0.8 М H ₂ SO ₄ , 180 °C, 40 мин	Муравьиная кислота 25.82%, левулиновая кислота 39.93%	[487]
Гидротермальная каталитическая реакция	Гетерополикислота H ₅ PMo ₁₀ V ₂ O ₄₀	<i>P. kessleri</i> IC-11	10 г л ⁻¹ биомассы, 10 ммоль л ⁻¹ катализатора, 1–5 МПа, 110 - 140 °C	Муравьиная кислота 49%	[383]

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

5.2.1 Применение БКЛ для получения метиловых эфиров жирных кислот

Для анализа эффективности применения БКЛ в реакции переэтерификации растительного масла (подсолнечного) с метанолом был проведен последовательный подбор параметров этой реакции (Рисунок 45А). Анализ влияния количества БКЛ в смеси (0.25 – 20% вес./вес.) на $Y_{\text{мэжк}}$ выявил линейную зависимость ($R^2 = 0.99$) между количеством БКЛ и $Y_{\text{мэжк}}$, что свидетельствует об отсутствии диффузионных ограничений в иммобилизованном ферменте в выбранном диапазоне концентраций. Максимальный выход, равный 36.9%, был достигнут при использовании 20% БКЛ, однако достаточная активность в реакции переэтерификации наблюдалась при 5% БКЛ, и эта концентрация была выбрана для дальнейших экспериментов

по оптимизации условий реакции. Базовый эксперимент по оценке влияния температуры на выход МЭЖК в реакции проводили в следующих условиях : 2 г подсолнечного масла,

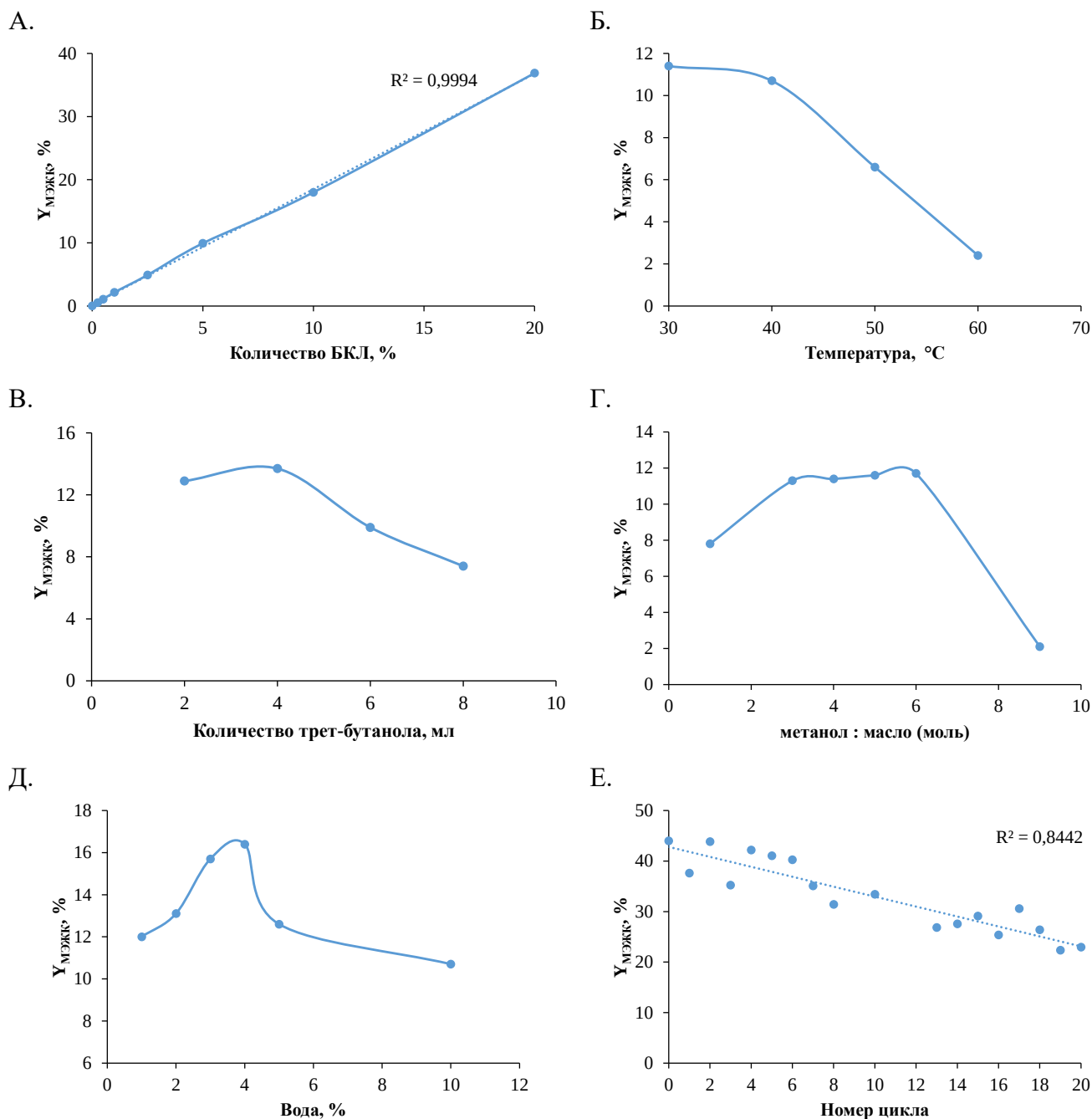


Рисунок 45 – Оптимизации реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом в присутствии БКЛ и его операционная стабильность: (А) Количество БКЛ, (Б) Температура, (В) Количество *трет*-бутанола, (Г) Мольное соотношение метанол : масло, (Д) Количество воды, (Е) Операционная стабильность

мольное соотношение метанол : масло 3:1, 4 мл *трет*-бутанола, 4% воды, 5% БКЛ, температура 40 °C, время реакции 24 ч. Анализ влияния температуры (до 60 °C) на Y_{МЭЖК} (Рисунок 45Б)

показал, что максимальный $Y_{\text{МЭЖК}}$ (11.4%) наблюдался при 30 °С, однако для дальнейших экспериментов была выбрана температура процесса 40 °С ($Y_{\text{МЭЖК}}$ 10.7%), поскольку использование такой температуры позволяет избежать избыточных энергозатрат на охлаждение реактора (по сравнению с 30 °С) [488]. В качестве дополнительного растворителя в реакции переэтерификации был использован *терт*-бутанол, который позволяет улучшить разделение фаз и снизить концентрацию глицерина у поверхности биокатализатора. Выявлено (Рисунок 45В), что наибольший $Y_{\text{МЭЖК}}$ (13.7%) достигался в присутствии 4 мл *терт*-бутанола. При оптимизации мольного соотношения метанол : масло в реакции биокаталитической переэтерификации выявлено, что $Y_{\text{МЭЖК}}$ остается стабильным и составляет 11.3 – 11.7% при увеличении концентрации метанола в два раза (Рисунок 45Г). Снижение $Y_{\text{МЭЖК}}$ при дальнейшем увеличении концентрации метанола связано с денатурацией фермента. Показано, что концентрация воды в реакции переэтерификации оказывает значительное влияние как на сам выход реакции, так и на свойства фермента. Избыточное количество воды способствует протеканию гидролиза и образованию свободных жирных кислот. На Рисунке 45Д видно, что оптимальным количеством воды в данной работе является 4%, при этом $Y_{\text{МЭЖК}}$ составляет 16.4%.

Таким образом, по результатам исследования влияния отдельных факторов на протекание реакции переэтерификации метанола с подсолнечным маслом в присутствии БКЛ выявлено, что наибольший выход реакции, равный 44%, достигается в следующих условиях: количество БКЛ 20%, температура реакции 40 °С, мольное соотношение метанол : масло 3:1, содержание *терт*-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% (Рисунок 45Е) [418].

5.2.2 Применение БКЛ для получения модифицированных пищевых жиров

Для определения эффективности применения БКЛ в реакции получения модифицированных пищевых жиров путем переэтерификации подсолнечного и гидрированного соевого масла, был проведен подбор оптимальных условий реакции (Рисунок 46).

В предварительных экспериментах показано, что равновесие реакции достигается при 10% БКЛ в смеси (ID 57%), это количество было выбрано для дальнейшей оптимизации этой реакции. Базовый эксперимент по определению влияния температуры на ID проводили в следующих условиях: подсолнечное масло 600 мкл, молярное соотношение подсолнечное масло

: гидролизованное соевое масло 3:1 (вес./вес.), БКЛ 10%, температура 70 - 80 °С, время реакции – 2 ч. По данным литературы, диапазон температур, применяемый в реакции переэтерификации, составляет 50 – 80 °С [489]. Оптимизация температуры реакции выявила, что наибольшее значение ID (57%) наблюдалось при 70 °С (Рисунок 46А), выше этой температуры фермент подвергается активной термической денатурации [490]. Температура менее 70 °С в реакции не использовались, поскольку наблюдалось увеличение вязкости среды вследствие ее высокой температуры плавления.

Наибольшая степень переэтерификации (48%) наблюдалась при соотношении гидролизованное соевое масло : подсолнечное масло 1:3 (Рисунок 46Б), которая была выбрана

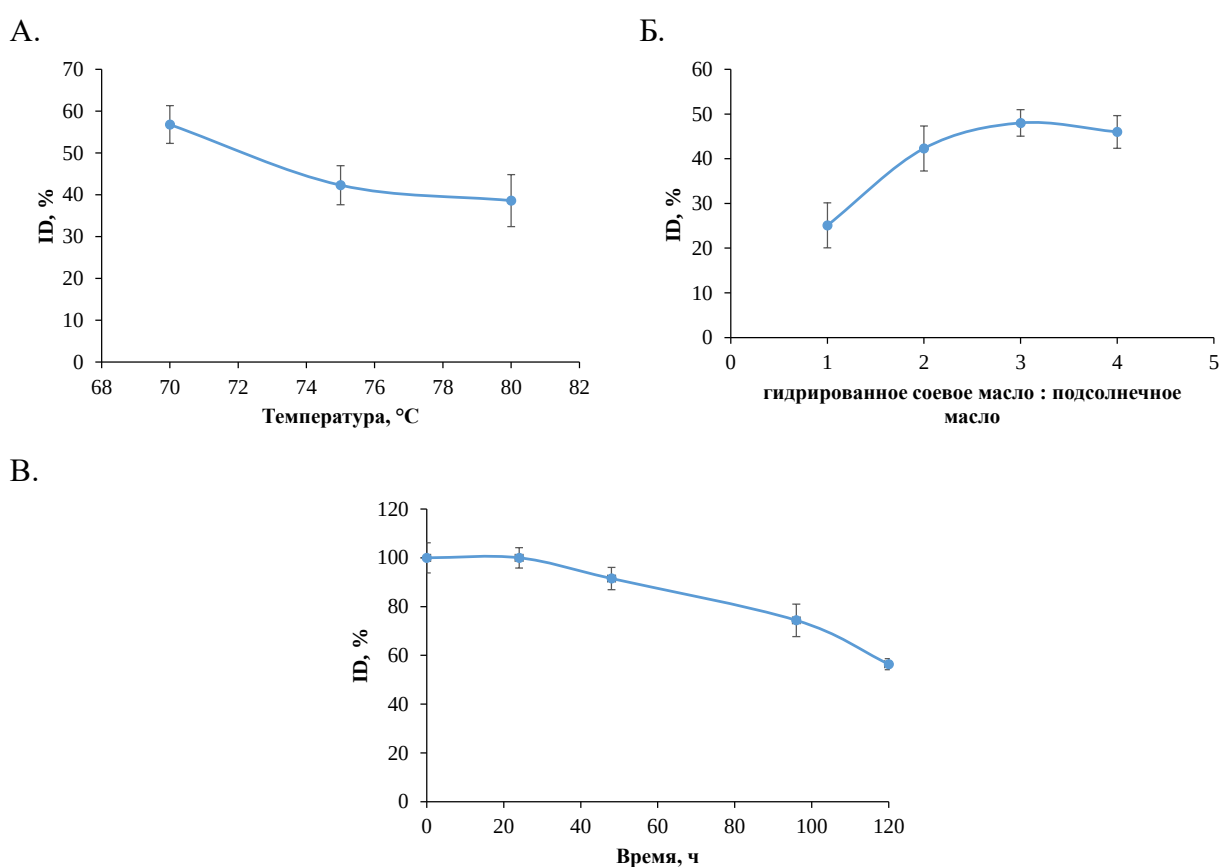


Рисунок 46 – Оптимизации реакции переэтерификации подсолнечного масла с гидролизированным соевым маслом в присутствии БКЛ и его операционная стабильность: (А) Температура, (Б) Мольное соотношение метанол : масло, (В) Операционная стабильность

для дальнейших экспериментов. При соотношении 2:3 значение ID не изменилось. Аналогичный результат был получен в работе [489] для иммобилизированной липазы Lipozyme TL в реакции переэтерификации смеси натурального и гидролизованного кунжутного масла (70:30, вес.%) при температуре 70 °С. Анализ операционной стабильности БКЛ (Рисунок 46В) в оптимальных

условиях (10% БКЛ, молярное соотношение гидрированное соевое масло : подсолнечное масло 1:3, 70 °С, 1 цикл 24 ч) выявил, что через 120 ч эксплуатации (5 циклов) БКЛ сохранил 56.4% от своей первоначальной активности (ID 28.8%), расчетное $t_{1/2}$ составило 121 ч [491].

Анализ продуктов реакции переэтерификации (2 ч реакции в оптимальных условиях) показал, что концентрация насыщенных жиров снижалась при переэтерификации (Рисунок 47). В продуктах реакции обнаружены триглицериды: SOS (2.9%), OLO (5.1%), SLL (8.7%), SOL (6.5%), SOO (10.6%). Наблюдалось снижение содержания ненасыщенных триацилглицеридов (LLL, LLP и LOL), что способствует стабильности продуктов реакции переэтерификации к окислению на воздухе [492].

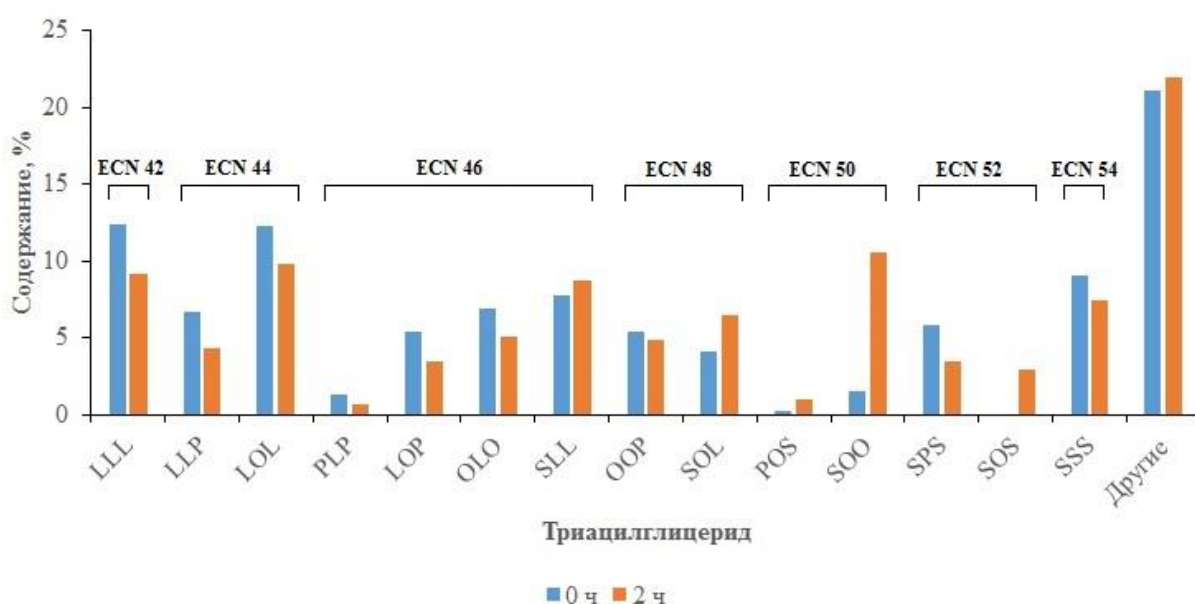


Рисунок 47 – Анализ состава триацилглицеридов при переэтерификации смеси гидрированного соевого и подсолнечного масла в присутствии БКЛ методом ВЭЖХ-МС

Анализ состава продуктов реакции также выявил снижение температуры плавления полученной смеси с 60 до 56 °С через 2 ч реакции в оптимальных условиях (молярное соотношение гидрированное соевое масло : подсолнечное масло 1:3, 70 °С и 10% БКЛ) (Рисунок 48), что близко к результатам [493], где температура плавления снизилась на 4 °С при переэтерификации пальмового стеарина и олеина (2:3, вес.%) при 50 °С через 24 ч с использованием липазы *R. oryzae*, иммобилизированной на частицах CaCO_3 . Снижение температуры плавления масел свидетельствует об изменении физико-химических свойств переэтерифицированной смеси по сравнению с исходной и позволяет получать модифицированные жиры с требуемыми свойствами с использованием ферментного препарата БКЛ.

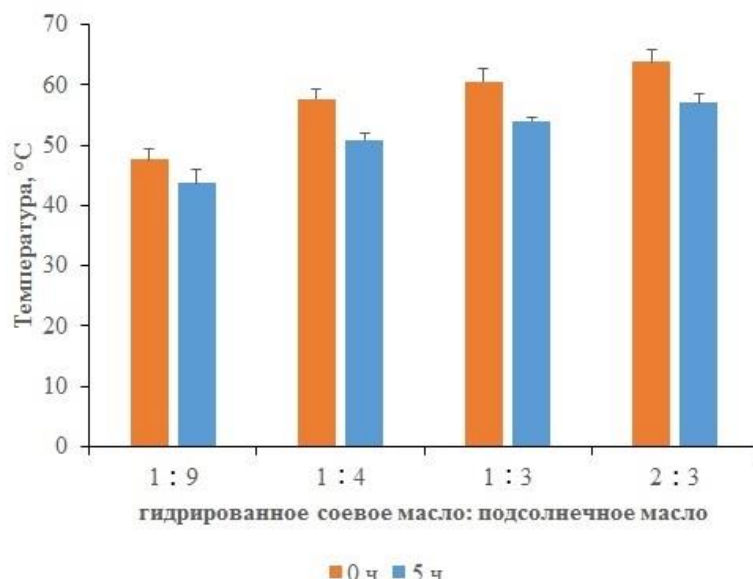


Рисунок 48 – Изменение температуры плавления продукта реакции переэтерификации смеси гидролизованного соевого масла и подсолнечного масла в разных молярных соотношениях

5.2.3 Сравнение эффективности применения БКЛ в биокаталитической переработке растительных масел

Сравнительный анализ литературных данных выявил, что эффективность применения БКЛ в реакции переэтерификации растительных масел ($Y_{\text{мэжк}}$ 44%) была ниже, чем у других иммобилизованных липаз (Таблица 38). Иммобилизованные липазы, полученные путем ковалентной иммобилизации на различных носителях, в целом отличались большей активностью ($Y_{\text{мэжк}} > 90\%$) [494], [495], [496], [497], чем полученные путем адсорбционной иммобилизации, например, липаза *R. oryzae*, иммобилизованная на смоле Lewatit ($Y_{\text{мэжк}}$ 51.7%) [498]. Исключение составила коммерческая иммобилизованная липаза *T. lanuginosus* (Lipozyme TL), при использовании которой в реакции переэтерификации растительных масел $Y_{\text{мэжк}}$ был близок к 100% [499], [500].

Сравнение характеристик иммобилизованной липазы БКЛ с другими ферментными препаратами (Таблица 38) также выявило, что его эффективность в реакции переэтерификации смесей масел была в два раза меньше, чем у коммерческих аналогов Lipozyme TL и Novozym 435 [504], а также у липазы *Pseudomonas* sp., иммобилизованной на диатомите Celite [503].

Таблица 38 – Сравнительная характеристика иммобилизованных липаз, применяемых для получения МЭЖК и модифицированных жиров

Способ получения продукта	Иммобилизованная липаза	Условия реакции	Выход продукта	Ссылка
Перезэтерификация с метанолом	<i>P. cerasica</i> (включение в гидрофобный золь-гель)	10 г соевого масла, 475 мг ФП, соотношение масло : метанол 1:7.5, 0.5 г воды, при 35 °С, время реакции 1 ч	67% МЭЖК	[501]
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> L62 (гидрофобная адсорбция с ковалентной сшивкой глутаровым альдегидом)	3 мл оливкового масла с метанолом, в соотношении 1:6, 1 г ФП, при 35 °С, время реакции 6 ч	90% МЭЖК	[495]
	Липаза ABL <i>Acinetobacter baylyi</i> (носитель Sepabeads EC-OD)	Пальмовое масло с метанолом, в соотношении 1:4, 20% ФП, при 40 °С, время реакции 24 ч	93% МЭЖК	[496]
	<i>B. cerasica</i> (ковалентная иммобилизация на аминированных магнитных наночастицах)	Соевое масло с метанолом, в соотношении 1:4, вода 2.5%, <i>tert</i> -бутанол 0.31%, ФП 9%, при 45 °С, время реакции 12 ч	96.8% МЭЖК	[497]
	<i>S. rugosa</i> (ковалентная иммобилизация на частицах Fe ₃ O ₄ с оксидом графена)	Соевое масло с метанолом, в соотношении 1:4, ФП 25%, при 40 °С, время реакции 60 ч	92.8% МЭЖК	[494]
	<i>R. oryzae</i> (адсорбция на смоле Lewatit)	Масло ятрофы с метанолом, в соотношении 1:3, ФП 5%, вода 4%, при 30 °С, время реакции 48 ч	51.7 % МЭЖК	[498]
	Lipozyme TL (липаза <i>T. lanuginosus</i> , адсорбированная на силикагеле)	Рапсовое масло с метанолом, в соотношении 1:5, ФП 5%, при 30 °С, время реакции 7 ч	99.89% МЭЖК	[500]
	Lipozyme TL (липаза <i>T. lanuginosus</i> , адсорбированная на силикагеле)	Соевое масло с метанолом, в соотношении 1:1, ФП 10%, при 40 °С, время реакции 12 ч	98% МЭЖК	[500]
	БКЛ (липаза G3 <i>G. stearothermophilus</i>)	Подсолнечное масло с метанолом, в	44% МЭЖК	Эта работа

		соотношении 1:3, ФП 20%, 4 мл <i>трет</i> -бутанола, вода 4% при 40 °С, время реакции 24 ч		
Переэтерификация смеси масел	Lipozyme TL (липаза <i>T. lanuginosus</i> , адсорбированная на силикагеле)	Пальмовый стеарин и кокосовое масло (75:25), ФП 6%, при 60 °С, время реакции 6 ч	Увеличение ECN38, 40, 42, 44, 46 на 1.1, 1.6, 6.8, 16.7, 6.5%, соответственно	[502]
	<i>Pseudomonas</i> sp. (иммобилизованная на диатомите Celite)	Пальмовый стеарин и подсолнечное масло (40:60), 60 °С, 8 ч	Понижение SMP с 48.5 до 35.0 °С Степень переэтерификации – 77.3%	[503]
	Lipozyme TL (липаза <i>T. lanuginosus</i> , адсорбированная на силикагеле)	Масло из рисовых отрубей и гидролизованное хлопковое масло (80:20), ФП 5 %, 60 °С, время реакции 4 ч	Степень переэтерификации 100%	[504]
	Novozym 435 (липаза <i>P. antarctica</i>)	Масло из рисовых отрубей и гидролизованное хлопковое масло (80:20), ФП 5%, 60 °С, время реакции 5 ч	Степень переэтерификации 100%	[504]
	БКЛ (липаза G3 <i>G. stearothermophilus</i> , ковалентно иммобилизованная на мезопористом силикагеле)	Гидрированное соевое масло : подсолнечное масло 1:3, ФП 10%, 70 °С, время реакции 2 ч	Степень переэтерификации 51%	Эта работа

Таким образом, липаза G3 *G. stearothermophilus*, ковалентно иммобилизованная на мезопористом силикагеле, является менее эффективной для применения в реакциях переэтерификации масел, 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 [416]. Поскольку липазы бактерий р. *Geobacillus* малоизучены в составе биокатализаторов, полученный в работе результат носит фундаментальный характер.

5.3 Сбраживание продуктов каталитического гидролиза целлюлозы для получения этанола

Лигноцеллюлоза является одним из основных видов возобновляемого сырья, который содержит в своем составе ряд сложных биополимеров, в том числе: целлюлозу (40 – 60%), гемицеллюлозу (30%) и лигнин (10 – 30%) [505]. Относительная простота отделения целлюлозы как основного компонента биомассы от лигнина позволяет получать на ее основе широкий спектр востребованных продуктов [506]. Разработанные к настоящему времени методы гидролиза целлюлозы (с применением минеральных кислот [507], щелочей и ферментов целлюлаз [508], [509]) позволяют достичь высокого выхода глюкозы ($> 90\%$) [510], однако основным недостатком таких подходов является невозможность регенерации и отделения катализатора от продуктов реакции. С целью гидролиза целлюлозы в последнее время также применяют гетерогенные кислотные катализаторы на углеродной основе, что позволяет получать не только глюкозу [510], но также продукт ее последующей дегидратации – 5-ГМФ [511]. Эти вещества используются в получении широкого спектра продуктов как с применением каталитических, так и биотехнологических подходов (дизельное и реактивное топливо, пластмассы) [512], [513].

5-ГМФ отделяют от сахаров в гидролизной смеси путем экстракции органическими растворителями [514], что позволяет получить субстрат для сбраживания с низким содержанием производных фурана, которые оказывают токсическое действие на клетки в процессе сбраживания [515]. Глюкоза, как один из основных продуктов реакции гидролиза, может служить основным субстратом для получения востребованных веществ путем сбраживания, включая этанол [516], бутанол, [517], липиды [518], а также янтарную [519] и молочную кислоты [520]. Сбраживание в основном проводят с использованием дрожжей *S. cerevisiae* [521] или рекомбинантных бактерий *Zymomonas mobilis* [522] и *E. coli* [523]. Для снижения энергопотребления таких процессов ранее было предложено использование термотолерантных дрожжей, таких как *K. marxianus* [251] и *O. polymorpha* [252]. Основным преимуществом способа получения этанола с помощью *K. marxianus* [253] и *O. polymorpha* [252] является их способность сбраживать сахара при температуре до 45 °C, в отличие от мезофильных дрожжей *S. cerevisiae*, которые преимущественно растут при температурах ниже 37 °C. Было показано, что высокотемпературное брожение значительно снижает стоимость охлаждения культуральной жидкости [524] и, таким образом, снижает энергопотребление процесса. Кроме того, высокотемпературный процесс позволяет снизить рост сопутствующей микрофлоры. Термотолерантные дрожжи могут расти на средах, содержащих глюкозу, ксилозу и целлобиозу

[252], которые обычно обнаруживают в гидролизатах биомассы. Таким образом, применение термотолерантных дрожжей является перспективным для использования в производстве этанола.

5.3.1 Подготовка гидролизатов целлюлозы к сбраживанию

Микрористаллическую целлюлозу предварительно подвергали механической активации, что снижало степень ее кристалличности. В качестве катализатора гидролиза целлюлозы использовался окисленный углеродный материал Сибунит-4-окс, что позволяет получать глюкозу и 5-ГМФ с относительно высокими выходами до 45 и 23 мол.%, соответственно, при температуре 180 °С. В данной работе использовали условия, при которых наблюдался максимальный выход глюкозы 23.1 ± 1.5 мол.%, выход 5-ГМФ при этом составил 8.0 ± 1.4 мол.% [303].

Ранее было показано, что 5-ГМФ плохо экстрагируется из реакционных смесей, однако некоторые растворители, включая метилизобутилкетон, этилацетат, ТГФ, диэтиловый эфир, ацетон, *n*-бутанол и 2-бутанол, а также ИЖ [525] могут успешно применяться с этой целью. Экстракция 5-ГМФ из растворов часто проводится с использованием высокой концентрации NaCl [525], однако высокая концентрация солей нежелательна для последующего сбраживания экстрагированной смеси из-за чувствительности некоторых дрожжей к осмотическому стрессу [526]. В связи с этим для экстракции 5-ГМФ из водной фазы использовали растворители с разной полярностью. Анализ состава экстрагированных гидролизатов приведен в Таблице 39.

Таблица 39 – Анализ состава смеси после экстракции каталитических гидролизатов активированной микрористаллической целлюлозы методом ВЭЖХ

Соединение	Концентрация, г л ⁻¹			
	Изобутанол	<i>n</i> -бутанол	Диэтиловый эфир	Метилизобутилкетон
Целлобиоза	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0	0.3 ± 0	0.7 ± 0
Глюкоза	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0	2.0 ± 0.2	0.3 ± 0
Манноза и фруктоза	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0	0.7 ± 0	2.0 ± 0.1
5-ГМФ	0.0 ± 0	0.0 ± 0	0.2 ± 0	0.1 ± 0
Муравьиная кислота	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.2 ± 0
Гликолевая кислота	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.4 ± 0	0.4 ± 0
Молочная кислота	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.3 ± 0	0.3 ± 0
Винная кислота	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.1 ± 0
Растворитель	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.0 ± 0	0.0 ± 0

По данным Таблицы 39, *n*-бутанол и изобутанол обладали наилучшей экстракционной способностью по отношению к 5-ГМФ, а фурфурол в образцах не обнаруживался. Отмечено малое остаточное количество растворителя в смеси (изобутанол 0.1 ± 0 г л⁻¹), снизит его влияние на микроорганизмы. В соответствии с этими результатами для последующей экстракции в качестве растворителя был выбран изобутанол, как наименее токсичное для клеток соединение. Состав основных компонентов смеси до и после экстракции (с последующим концентрированием) приведен в Таблице 40.

Таблица 40 – Состав смеси после гидролиза активированной целлюлозы с использованием Сибунит-4-окс (через 5 ч реакции) и после ее экстракции изобутанолом с последующим концентрированием

Соединение	Концентрация, г л ⁻¹	
	После гидролиза	После экстракции 5-ГМФ и концентрирования
Целлобиоза	$0.11 \pm 0.$	3.0 ± 0.1
Глюкоза	2.48 ± 0.16	15.0 ± 1.0
Манноза	0.15 ± 0.02	2.0 ± 0.1
Фруктоза	0.12 ± 0.01	1.3 ± 0.1
5-ГМФ	0.60 ± 0.11	0.3 ± 0.1
Фурфурол	0.05 ± 0.01	0
Муравьиная кислота	0.02 ± 0	0.4 ± 0.0
Гликолевая кислота	0.04 ± 0.01	1.4 ± 0.2
Молочная кислота	0.06 ± 0.01	0.6 ± 0
Винная кислота	0.06 ± 0.01	0.3 ± 0.1
Изобутанол	0	0.1 ± 0

5.3.2 Выделение штаммов термотолерантных дрожжей

Недавние исследования показали, что термотолерантные дрожжи, относящиеся к видам *K. marxianus* [527] и *O. polymorpha* [528], являются перспективными продуцентами этанола. Более того, эти дрожжи способны сбраживать одновременно глюкозу и ксилозу, что позволяет использовать их для сбраживания гидролизатов биомассы [529]. Дрожжи *S. cerevisiae*, обычно используемые для получения этанола, в отличие от термотолерантных видов дрожжей, не обладают естественной способностью потреблять ксилозу. Их также необходимо культивировать при температуре 25 – 37 °С, что увеличивает стоимость получения этанола по сравнению с термотолерантными дрожжами [530]. В этой работе проводили выделение термотолерантных дрожжей, растущих при температурах свыше 40 °С. Идентификация полученных чистых культур

по последовательностям 18S рРНК показала, что большинство из них принадлежит к *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. Список штаммов, выделенных в этом исследовании, приведен в Таблице 41.

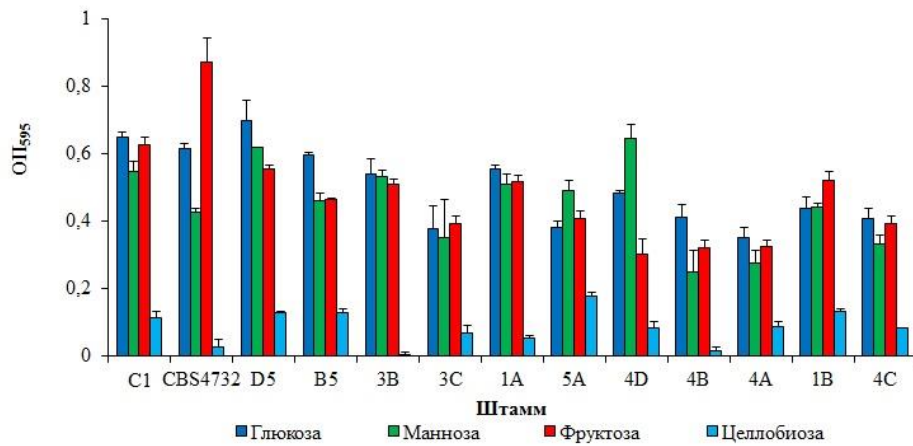
Таблица 41 – Штаммы термотолерантных дрожжей, выделенные в работе

Штамм	Образец
<i>K. marxianus</i> C1	сыр
<i>K. marxianus</i> D5	сыр
<i>K. marxianus</i> B5	кефир
<i>K. marxianus</i> B3	кефир
<i>C. lusitaniae</i> C3	айран
<i>K. marxianus</i> A1	кумыс
<i>K. marxianus</i> A5	кумыс
<i>K. marxianus</i> D4	сыр
<i>P. kudriavzevii</i> B4	творог
<i>K. marxianus</i> A4	творог
<i>K. marxianus</i> B1	творог
<i>K. marxianus</i> 4C	творог

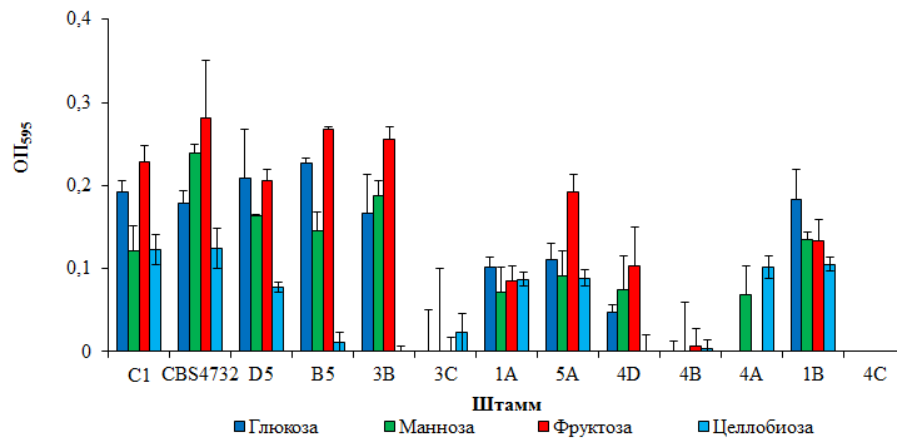
Для получения максимального выхода этанола из продуктов гидролиза целлюлозы требуется наиболее полное сбраживание углеводов, входящих в их состав. С этой целью первоначально проводили определение способности термотолерантных дрожжей использовать углеводы, входящих в состав каталитических гидролизатов целлюлозы, а именно глюкозы, маннозы, фруктозы или целлобиозы в количестве 20 г л⁻¹, в качестве субстрата для роста при 42 – 48 °С (Таблица 40). Культивирование дрожжей проводили в закрытых глубоких 96-луночных планшетах. Результаты показаны на Рисунке 49.

Двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных (фактор 1 – влияние температуры, фактор 2 – тип углевода, используемого при сбраживании) выявил, что для всех штаммов наблюдается значимое ($p < 0.001$) взаимодействие между факторами. Таким образом, для последующей оценки статистической значимости данных была проведена z-оценка для выявления отличий показателей штаммов от среднего значения при использовании различных субстратов и температур (Приложение Д). Выявлено, что штаммы *K. marxianus* C1, *K. marxianus* D5 и *O. polymorpha* CBS4732 преимущественно обладают высоким отличием от среднего уровня ($z > 1.65$ при $p < 0.05$) накопления биомассы по всем штаммам на различных средах и при всех температурах. Показатели накопления биомассы для этих штаммов и штамма *K. marxianus* B5, близкого к ним по свойствам, были оценены с использованием однофакторного дисперсионного

А.



Б.



В.

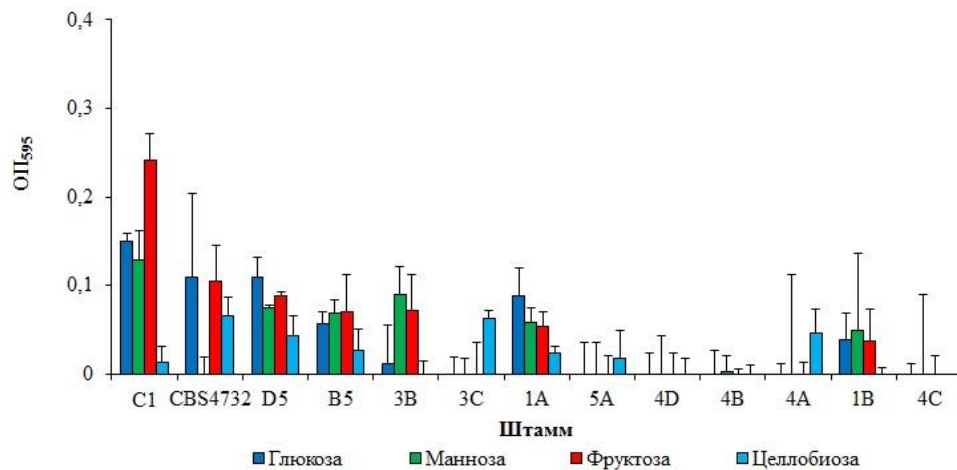


Рисунок 49 – Накопление биомассы штаммами термотолерантных дрожжей на модельной среде YNB с различными сахарами при культивировании в глубоких 96-луночных планшетах. (А) 42 °C, (Б) 45 °C, (В) 48 °C

анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой Холма-Бонферрони (Приложение Д). Показано, что при культивировании штаммов при всех температурах на среде с глюкозой не наблюдается достоверных отличий между штаммами по уровню накопления биомассы ($p > 0.05$). При 42 °С при культивировании на средах с фруктозой и целлобиозой достоверно ($p < 0.05$) высоким уровнем накопления отличались штаммы *O. polymorpha* CBS4732 и *K. marxianus* C1. Эти же штаммы демонстрировали высокий прирост биомассы по сравнению с другими штаммами ($p < 0.05$) на средах с маннозой и целлобиозой при 45 °С. При 48 °С высокой концентрации биомассы ($p < 0.05$) достигал штамм *K. marxianus* C1.

Таким образом, представленные данные показывают, что все штаммы дрожжей способны расти при 42 °С на средах, содержащих протестированные углеводы, за исключением среды с целлобиозой (20.0 г л⁻¹), при культивировании на которой накопление биомассы снижалось (Рисунок 49А). При дальнейшем повышении температуры до 45 – 48 °С (Рисунок 49Б, В) накопление биомассы оставалось высоким только для штаммов *K. marxianus* C1 (до 48 °С) [531] и *O. polymorpha* CBS4732 (до 45 °С). При 45 – 48 °С для большинства штаммов было отмечено высокое потребление фруктозы по сравнению с остальными углеводами, а также наблюдались различия в чувствительности штаммов *K. marxianus* к температуре. Эти результаты согласуются с данными других работ, где показана способность термотолерантных дрожжей *K. marxianus* накапливать биомассу на средах с различными углеводами (глюкоза, манноза, ксилоза, целлобиоза) [532] вплоть до 50 °С [533]. В этой работе показано, что штамм *O. polymorpha* CBS4732 обладает наибольшим уровнем накопления биомассы при 42 °С (Рисунок 49А) на среде с фруктозой (20.0 г л⁻¹). Однако, ранее было установлено, что этот штамм обладает способностью продуцировать этанол путем сбраживания глюкозы, маннозы, галактозы, мальтозы и ксилозы (за исключением целлобиозы) [244].

Для других видов дрожжей, использованных в данной работе, в том числе для *C. lusitaniae*, возможность аэробного метаболизма ксилозы [534] и целлобиозы [535] также была продемонстрирована ранее, но при более низких температурах (25 и 28 °С, соответственно). Также было показано, что уровень продукции этанола на гидролизате крахмала маниоки с использованием этого вида дрожжей составляет 85.4% от теоретического (V_e 28 г л⁻¹ ч⁻¹) [536]. В этой работе установлено, что для штаммов *C. lusitaniae* C3 и *P. kudriavzevii* B4 оптимальная температура культивирования составила 42 °С, что меньше, чем для других штаммов, использованных в работе. Для дальнейших работ были выбраны штаммы *K. marxianus* C1, *O. polymorpha* CBS4732, *K. marxianus* D5 и *K. marxianus* B5, как наиболее эффективные продуценты биомассы, по сравнению с остальными протестированными в работе штаммами (в том числе обладающими способностью к накоплению биомассы при 48 °С).

Для подробного анализа параметров культивирования (удельной скорости роста, выхода и скорости накопления биомассы) для выбранных четырех штаммов был проведен эксперимент в закрытых глубоких 96-луночных планшетах в среде YNB с добавлением глюкозы в концентрации 20.0 г л^{-1} (объем среды YNB-G в лунке 1 мл) при температурах $37 - 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Таблица 42). Выявлено, что оптимальной температурой для накопления биомассы штаммов являлась $37 - 42 \text{ }^{\circ}\text{C}$, при температурах свыше $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ наблюдалось достоверное ($p < 0.05$, тест Холма-Бонферрони) падение этих показателей. При $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ штаммы *K. marxianus* D5, *K. marxianus* B5 и *O. polymorpha* CBS4732 обладали высокими удельными скоростями роста, тогда как штамм *K. marxianus* C1 при $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ обладал $\mu 0.40 \pm 0.05 \text{ г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$, что коррелирует с данными, полученными ранее в работе [537]. При $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ высокая скорость накопления биомассы наблюдались для всех штаммов, за исключением *O. polymorpha* CBS4732. Относительно высокий выход биомассы был достигнут для всех штаммов *K. marxianus* при $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$, поэтому эта температура была выбрана для последующих исследований. Следует отметить, что особенностью штамма *O. polymorpha* CBS4732 является значительное ($p < 0.05$, тест Холма-Бонферрони) накопление биомассы при $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($1.59 \pm 0.07 \text{ г л}^{-1}$). Таким образом, *O. polymorpha* CBS4732 обладает более высокой термотолерантностью, но при этом низкой способностью продуцировать биомассу.

Таблица 42 – Анализ параметров культивирования штаммов на среде YNB-G

Параметр	$^{\circ}\text{C}$	<i>K. marxianus</i> C1	<i>O. polymorpha</i> CBS4732	<i>K. marxianus</i> D5	<i>K. marxianus</i> B5
$\mu, \text{ч}^{-1}$	37	0.35 ± 0.02	0.39 ± 0.05	0.47 ± 0.05	$0.50 \pm 0.03^*$
	42	0.40 ± 0.05	0.30 ± 0.02	0.43 ± 0.05	$0.42 \pm 0.03^*$
	45	0.37 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.37 ± 0.02	$0.28 \pm 0.03^*$
	50	$0.22 \pm 0.02^*$	$0.18 \pm 0.03^*$	0.28 ± 0.02	$0.15 \pm 0.01^*$
$Y_{6/s}, \text{г г}^{-1}$	37	$0.17 \pm 0.01^*$	0.14 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.02
	42	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.02	$0.23 \pm 0.02^*$
	45	0.22 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.23 ± 0.01	$0.18 \pm 0.01^*$
	50	$0.04 \pm 0.01^*$	0.10 ± 0.01	$0.04 \pm 0.01^*$	$0.05 \pm 0.00^*$
$V_6, \text{г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$	37	$0.67 \pm 0.07^*$	0.39 ± 0.02	$0.74 \pm 0.05^*$	$0.62 \pm 0.02^*$
	42	$0.40 \pm 0.01^*$	$0.34 \pm 0.02^*$	0.41 ± 0.04	$0.37 \pm 0.03^*$
	45	0.26 ± 0.01	0.32 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.26 ± 0.01
	50	0.25 ± 0.02	0.22 ± 0.01	$0.21 \pm 0.01^*$	0.28 ± 0.02
Концентрация биомассы в конце культивирования, г л^{-1}	37	3.6 ± 0.3	1.6 ± 0.2	$3.5 \pm 0.1^*$	3.7 ± 0.2
	42	3.3 ± 0.11	2.1 ± 0.1	$3.1 \pm 0.2^*$	3.1 ± 0.4
	45	$1.9 \pm 0.2^*$	1.7 ± 0.1	$2.1 \pm 0.1^*$	1.8 ± 0.1
	50	$1.2 \pm 0.0^*$	1.6 ± 0.1	$1.2 \pm 0.1^*$	1.3 ± 0.1

Наблюдаются достоверные ($*p < 0.05$) различия по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой Холма-Бонферрони для показателей отдельных штаммов при одной температуре

5.3.3 Анализ устойчивости штаммов дрожжей к ингибиторам брожения

Поскольку 5-ГМФ является одним из основных продуктов каталитического гидролиза активированной микрокристаллической целлюлозы, для получения этанола необходимо использовать штаммы дрожжей, обладающих высокой устойчивостью к этому соединению, а также к другим продуктам гидролиза целлюлозы. В этом исследовании были определены значения концентрации веществ, при которых достигается 50% снижение прироста биомассы (индекс IC_{50}) у штаммов дрожжей при культивировании на среде YNB-M. Дополнительно оценивалась чувствительность дрожжей к изобутанолу, поскольку он был использован для экстракции 5-ГМФ из смеси после гидролиза целлюлозы. Результаты представлены в Таблице 43.

Из представленных данных видно, что 5-ГМФ, фурфурол, уксусная и муравьиная кислоты обладают наибольшим влиянием на прирост биомассы дрожжей по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой

Таблица 43 – Значения IC_{50} для соединений, ингибирующих прирост биомассы термотолерантных дрожжей [292]

Соединение	IC_{50} , г л ⁻¹			
	<i>K. marxianus</i> C1	<i>O. polymorpha</i> CBS4732	<i>K. marxianus</i> D5	<i>K. marxianus</i> B5
5-ГМФ	1.96 ± 0.01	2.44 ± 0.18*	1.84 ± 0.02	2.03 ± 0.06
Фурфурол	0.67 ± 0.02*	1.25 ± 0.10	1.59 ± 0.20	1.24 ± 0.12
Уксусная кислота	1.11 ± 0.03*	0.39 ± 0.03*	0.79 ± 0.01	0.79 ± 0.01
Муравьиная кислота	1.30 ± 0.03*	0.99 ± 0.02*	1.36 ± 0.09	1.21 ± 0.06
Молочная кислота	15.33 ± 1.06	20.65 ± 1.94	18.70 ± 1.10	16.67 ± 0.47
Гликолевая кислота	15.18 ± 1.71	9.52 ± 0.30*	20.38 ± 1.76	20.05 ± 3.42
Винная кислота	30.71 ± 2.24	30.56 ± 1.77	34.36 ± 1.96	39.38 ± 1.34
Этанол	51.39 ± 0.61	62.48 ± 1.18*	49.37 ± 0.85	46.50 ± 1.32
Изобутанол	6.78 ± 0.54*	2.81 ± 0.14	3.84 ± 0.21	4.63 ± 0.34
Бутанол	2.85 ± 0.19	1.75 ± 0.08	1.53 ± 0.09*	3.20 ± 0.19*

Наблюдаются достоверные (* $p < 0.05$) различия по данным однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой Холма-Бонферрони показателей для отдельных веществ у разных штаммов

Холма-Бонферрони. Выявлено, что *O. polymorpha* CBS4732 обладает высокой устойчивостью к 5-ГМФ (IC_{50} 2.44 ± 0.18 г л⁻¹) по сравнению с другими протестированными штаммами *K. marxianus* ($p < 0.05$). Штамм *K. marxianus* C1 обладает наибольшей чувствительностью к фурфуролу с IC_{50} 0.67 ± 0.02 г л⁻¹ ($p < 0.05$). Это согласуется с результатом исследования [538], в котором сообщалось о токсическом влиянии фурфурола на клетки дрожжей *K. marxianus* при

концентрации 40 мМ (3.84 г л^{-1}). Штамм *K. marxianus* C1 продемонстрировал высокую устойчивость к уксусной кислоте ($IC_{50} 1.11 \pm 0.03 \text{ г л}^{-1}$) по сравнению с другими протестированными штаммами ($p < 0.05$), которая, однако, была меньше, чем у штамма *K. marxianus* TISTR5925 [538]. Штамм дрожжей *O. polymorpha* CBS4732 имеет самую высокую чувствительность к уксусной кислоте ($0.39 \pm 0.03 \text{ г л}^{-1}$) среди всех протестированных в настоящей работе штаммов ($p < 0.05$). Он также имеет умеренную чувствительность к муравьиной ($IC_{50} 0.99 \pm 0.02 \text{ г л}^{-1}$) и гликолевой ($IC_{50} 9.52 \pm 0.30 \text{ г л}^{-1}$) кислотам ($p < 0.05$). Тем не менее, штамм *O. polymorpha* CBS4732 демонстрирует сравнительно высокий уровень накопления биомассы в присутствии молочной кислоты ($IC_{50} 20.65 \pm 1.94 \text{ г л}^{-1}$). Кроме того, было показано, что винная кислота не оказывает значительного влияния на накопление биомассы у всех исследованных штаммов. *O. polymorpha* CBS4732 обладает самой высокой устойчивостью к этанолу ($p < 0.05$), который является основным продуктом сбраживания, со значением $IC_{50} 62.48 \pm 1.18 \text{ г л}^{-1}$ ($p < 0.05$). Значение IC_{50} для изобутанола было относительно высоким для штамма *K. marxianus* C1, но, учитывая его незначительное содержание в гидролизате после экстракции (Таблица 42), оно не может оказать значительного влияния на параметры брожения. Таким образом, по результатам анализа устойчивости к ингибиторам брожения, выявлено, что штамм *O. polymorpha* CBS4732 обладает наибольшей устойчивостью к производным фурана (фурфуролу и 5-ГМФ). Однако стоит отметить, что этот штамм оказался чувствительным к высоким концентрациям органических кислот, в отличие от штамма *K. marxianus* C1.

5.3.4 Культивирование термотолерантных дрожжей на среде с каталитическим гидролизатом микрокристаллической целлюлозы

Для определения влияния способа нейтрализации гидролизата после экстракции 5-ГМФ на накопление биомассы дрожжей проводили его нейтрализацию до pH 3.75 – 7.00 различными методами. Результат сравнивали с уровнем накопления биомассы на искусственной модельной смеси (среда YNB-М, содержащая тот же состав сахаров, что и гидролизат) с тем же значением pH. На Рисунке 50 приведен график зависимости накопления биомассы от pH среды (при нейтрализации NaOH).

Было показано, что накопление биомассы снижается у всех протестированных штаммов дрожжей при культивировании на экстрагированном каталитическом гидролизате целлюлозы, нейтрализованном с использованием NaOH до pH > 4.74. Наибольший относительный прирост биомассы дрожжей наблюдался у штамма *O. polymorpha* CBS4732 при pH 3.75. Культивирование

штамма *K. marxianus* C1 на такой среде при pH 4.75 привело к относительному накоплению биомассы до $79.5 \pm 4.4\%$ и меньшему приросту для остальных штаммов, включая *K. marxianus* B5 ($59.1 \pm 13.8\%$), *O. polymorpha* CBS4732 ($50.9 \pm 5.9\%$) и *K. marxianus* D5 ($31.9 \pm 3.9\%$). Таким образом, оптимальное значение pH нейтрализованного гидролизата для сбраживания всех исследованных штаммов составило 4.75. Это согласуется с данными, полученными в других исследованиях, где было обнаружено, что оптимальным значением для сбраживания различных гидролизатов биомассы этими термотолерантными дрожжами является pH 5.0 [539].

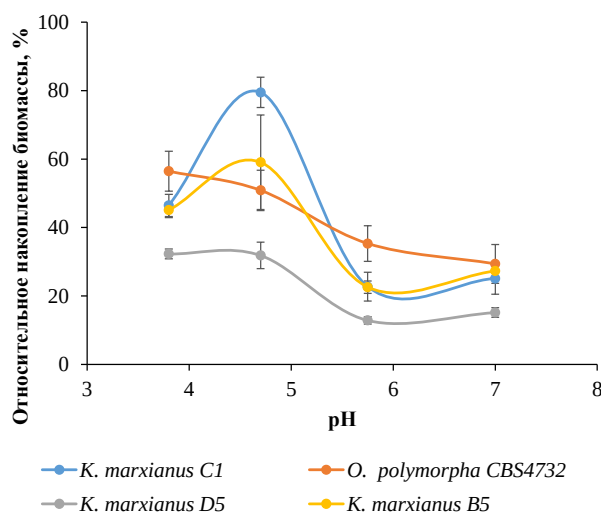


Рисунок 50 – Накопление биомассы штаммами термотолерантных дрожжей при различных значениях pH экстрагированного каталитического гидролизата целлюлозы после его нейтрализации NaOH. Эксперимент проводили при 42 °C в течение 16 ч. Концентрация биомассы при культивировании на среде YNB-M при том же pH была принята за 100%

Ранее было выявлено, что способ, используемый для нейтрализации гидролизата, может существенно повлиять на параметры его сбраживания штаммами дрожжей. В работе [540] было обнаружено, что нейтрализация гидролизата древесины ели с помощью NH_4OH позволяет достичь лучших результатов при ее сбраживании дрожжами *S. cerevisiae* в этанол (выход этанола составляет 86% от выхода на модельной смеси), чем при нейтрализации с помощью $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (41% соответственно). Другим эффективным способом нейтрализации является повышение pH смеси до 10.0 – 11.0 путем использования $\text{Ca}(\text{OH})_2$ с последующим доведением до pH 4.5 – 5.0. Такой подход позволяет повысить эффективность дрожжевого и бактериального брожения [541]. В связи с этим для выбора оптимального метода нейтрализации был проведен сравнительный анализ эффективности нейтрализации при использовании различных методов, включая обработку экстрагированного гидролизата NaOH, NH_4OH и $\text{Ca}(\text{OH})_2$ в комбинации с

последующим подкислением до pH 4.5. Результаты представлены на Рисунке 51. Согласно результатам двухфакторного дисперсионного анализа вид штамма и способ нейтрализации

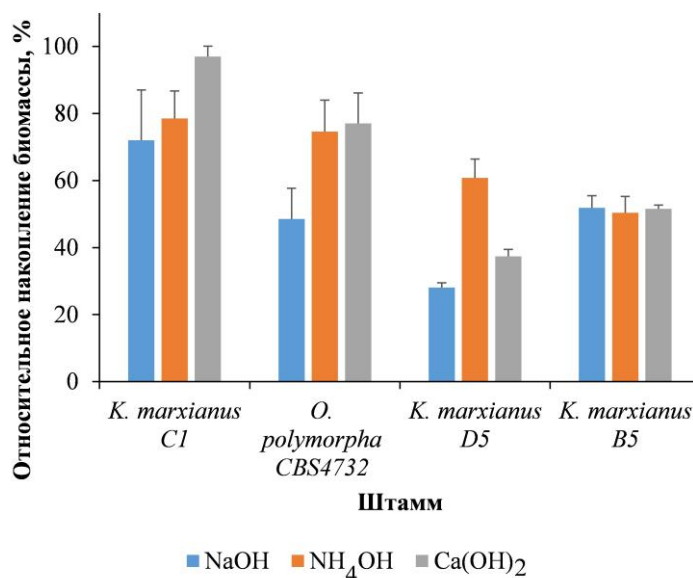


Рисунок 51 – Накопление биомассы дрожжами при культивировании на смесях, полученных каталитическим гидролизом целлюлозы и нейтрализованных различными способами. За 100% накопления биомассы было принято количество биомассы на среде YNB-М с соответствующим значением pH

гидролизата оказывают достоверное ($p = 0.028$; $F = 2.923$) влияние на накопление биомассы. В целом, наиболее эффективными методами нейтрализации экстрагированного гидролизата явились обработка NH₄OH или Ca(OH)₂ с последующим подкислением смеси до pH 4.5 (за исключением *K. marxianus* B5). Например, в случае сбраживания гидролизата, нейтрализованного NH₄OH, относительное накопление биомассы *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 было сопоставимым (78.5 ± 8.2 и $74.6 \pm 9.1\%$, соответственно). В случае штамма *K. Marxianus* C1 применение для нейтрализации Ca(OH)₂ с последующим подкислением среды до pH 4.5 позволило достичь максимального относительного накопления биомассы при сбраживании гидролизата, равного $97.0 \pm 3.1\%$. Однако использование такого подхода требует применения дополнительной стадии очистки нейтрализованного гидролизата, выражающейся в необходимости отделения жидкой фазы от образовавшегося осадка солей. По этой причине далее в экспериментах была использована нейтрализация гидролизата с применением NH₄OH (среда YNB-Н). Для дальнейших исследований были отобраны штаммы *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732, так как у них был обнаружен относительно высокий прирост биомассы при культивировании на среде YNB-Н (Рисунок A52),

состав основных продуктов брожения и параметры культивирования штаммов представлены в Таблице 44.

Выявлено, что оба штамма дрожжей продуцируют этанол на средах с гидролизатом целлюлозы (YNB-H) с относительно высокими выходами. В первую очередь дрожжи использовали в качестве субстрата для роста глюкозу, маннозу и фруктозу, а целлобиозу - в незначительных количествах. Штамм *K. marxianus* C1 обладает способностью одновременно

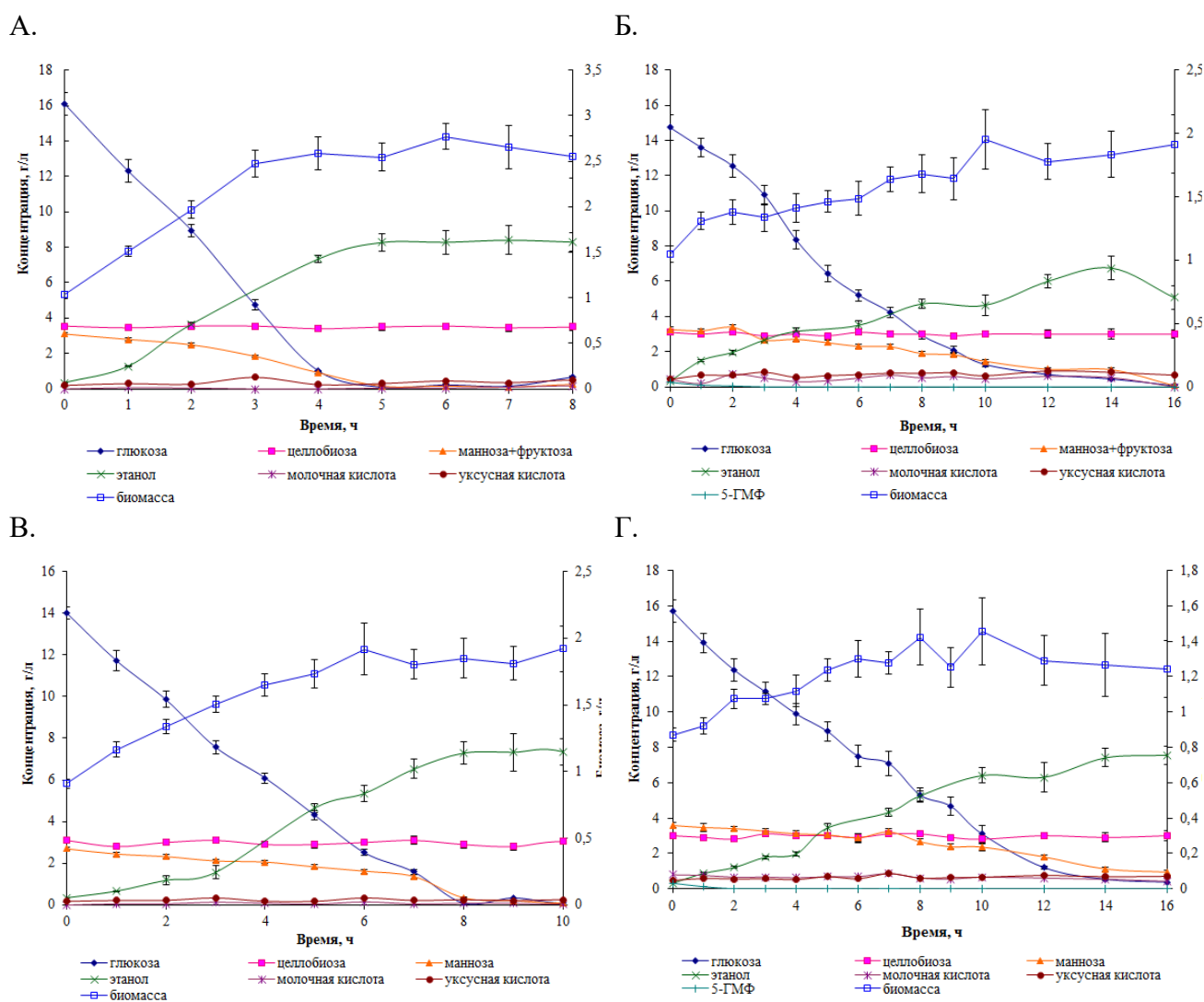


Рисунок 52 – Культивирование дрожжей *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-H и YNB-M. (А) Культивирование *K. marxianus* C1 на YNB-M, (Б) Культивирование *K. marxianus* C1 на среде YNB-H, (В) Культивирование *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-M, (Г) Культивирование *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-H

использовать все три углевода при сбраживании, тогда как *O. polymorpha* CBS4732 предпочтительно использует глюкозу, затем все остальные сахара. Штамм *K. marxianus* C1 обладает высоким уровнем накопления биомассы ($Y_{6/сс} 0.14 \pm 0.02$ г г⁻¹ и $\mu 0.29 \pm 0.01$ ч⁻¹) и

большой скоростью накопления этанола ($1.69 \pm 0.10 \text{ г л}^{-1} \text{ ч}^{-1}$) при выращивании на YNB-M. Штамм *O. polymorpha* CBS4732 имеет меньший выход биомассы ($Y_{6/сс} 0.11 \pm 0.01 \text{ г г}^{-1}$). Культивирование *K. marxianus* C1 на среде с гидролизатом целлюлозы привело к увеличению выход биомассы ($Y_{6/сс} 0.11 \pm 0.01 \text{ г г}^{-1}$) по сравнению с *O. Polymorpha* CBS4732 ($Y_{6/сс} 0.06 \pm 0 \text{ г г}^{-1}$).

Таблица 44 – 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 ^a	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_e^e , г л ⁻¹ ч ⁻¹	1.69 ± 0.10	0.41 ± 0.02	1.10 ± 0.05	0.53 ± 0.02
$Y_{e/сс}^e$, г г ⁻¹	0.44 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.39 ± 0.03
$Y_{6/сс}^e$, г г ⁻¹	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.1	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.00
Y_e^e , % (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

^a 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.

Скорость накопления этанола, а также удельная скорость роста для обоих штаммов были меньше, чем на модельной среде. В процессе культивирования на YNB-H выход этанола у *O. polymorpha* CBS4732 был больше, чем для штамма *K. marxianus* C1, что свидетельствует о высокой эффективности применения первого штамма для получения этанола. Штамм *K. marxianus* C1 по сравнению с *O. polymorpha* CBS4732 демонстрирует большее накопление биомассы, что, однако, не приводит к увеличению выхода этанола. У обоих штаммов обнаружен высокий теоретический выход этанола при культивировании на 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 способность снижать концентрацию 5-ГМФ в среде [542]. Концентрация других кислот, присутствующих в YNB-H, оставались постоянными на протяжении культивирования для обоих штаммов и соответствовали начальным количествам, обнаруженным в исходной среде YNB-H.

5.3.5 Оценка эффективности получения этанола с использованием каталитических гидролизатов целлюлозы

В отличие от термотолерантных дрожжей, сбраживание гидролизатов биомассы мезофильными штаммами *S. cerevisiae* относительно хорошо изучено [543]. Сравнительная характеристика различных подходов, применяемых для получения этанола из гидролизатов биомассы, приведена в Таблице 45.

Таблица 45 – Сравнение эффективности получения этанола с использованием гидролизатов биомассы и ее компонентов

Штамм	Способ приготовления гидролизата	Состав гидролизата	Условия сбраживания	Выход этанола (в % от теоретического)	Ссылка
<i>S. cerevisiae</i>	Предобработанная щелочью рисовая солома (1% по сухому веществу), катализатор на основе глицерина (100%), 140 °С, время реакции 2 ч, очистка на Xad4	Состав (мМ): глюкоза – 22.8; уксусная кислота - 2.21; муравьиная кислота – 52.7	Состав (%): гидролизат с добавлением дрожжевого экстракта - 0.25; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 0.5; MgSO ₄ - 0.1; KH ₂ PO ₄ - 0.2. Сбраживание в течение 48 ч.	52.29% (от теоретического)	[544]
<i>Kluyveromyces</i> sp. ПРЕ453 (MTCC 5314)	Предобработка багассы 8% H ₂ SO ₄ . Гидролиз: 10% предобработанной биомассы (по сухому веществу), 7% целлюлазы (Advanced Biochemicals Ltd), при 50 °С в течение 22 ч	Сахариды 40%	Сахариды - 40 г л ⁻¹ ; Na ₂ HPO ₄ - 0.15 г л ⁻¹ . Сбраживание при 45 °С в течение 48 ч	88% (от теоретического)	[547]
<i>K. marxianus</i> AT CC 36907	Предобработка багассы 1 % H ₂ SO ₄ ; Гидролиз: 2% H ₂ SO ₄ , 12% предобработанной биомассы (по сухому веществу) при 155 °С в течение 10 мин, очистка активированным углем	Состав (г л ⁻¹): глюкоза – 70.0; Фурфурол – 0.032; 5-ГМФ - 0.468; фенольные соединения – 18.15	Состав среды (г л ⁻¹): глюкоза – 69.2; фурфурол - 0.0019; 5-ГМФ – 0.0542; фенольные соединения – 2.65; (NH ₄) ₂ SO ₄ – 2.0; пептон - 5.0; дрожжевой экстракт - 3.0; CaCl ₂ · 2H ₂ O – 0.1.	Y _{6/сс} 0.22 г г ⁻¹ сахаров	[542]

			Сбраживание при 30 °С в течение 96 ч		
<i>S. cerevisiae</i> 424 A(LNH-ST)	Предобработка соломы кукурузы методом AFEX; Гидролиз: Spezyme CP, Novozyme 188, 6% предобработанной биомассы (по сухому веществу) при 50 °С в течение 96 ч	Ферментативный гидролизат	Среда: глюкоза 67.4 ± 2.0 г л ⁻¹ . Сбраживание при 30 °С, 96 ч	$85.6 \pm 0.6\%$ (от теоретического)	[545]
<i>S. cerevisiae</i> 424 A(LNH-ST)	Предобработка соломы кукурузы методом AFEX; Гидролиз: ксиланаза и пектиназа Multifect, 6% предобработанной биомассы (по сухому веществу) при 50 °С в течение 96 ч	Ферментативный гидролизат с добавлением 12 г л ⁻¹ ксилозы	Среда с ксилозой 40.8 ± 0.2 г л ⁻¹ . Сбраживание при 30 °С, 96 ч	88.5% (от теоретического)	[545]
<i>K. marxianus</i> C1	Предобработка микрокристаллической целлюлозы методом механоактивации; Гидролиз: 10 г л ⁻¹ активированной целлюлозы, 10 г л ⁻¹ катализатора Сибунит-4-окс, при 180 °С, 1 МПа в течение 5 ч, экстракция изобутанолом	Состав (г л ⁻¹): целлобиоза - 0.11 ± 0 ; глюкоза - 2.48 ± 0.16 ; манноза - 0.15 ± 0.02 ; фруктоза - 0.12 ± 0.01 ; 5-ГМФ - 0.60 ± 0.11 ; фурфурол - 0.05 ± 0.01 ; муравьиная кислота - 0.02 ± 0 ; гликолевая кислота - 0.04 ± 0.01 ; молочная кислота - 0.06 ± 0.01 ; винная кислота - 0.06 ± 0.01	Среда YNB-H, 42 °С, 16 ч	$72.0 \pm 5.7\%$ (от теоретического)	Эта работа
<i>O. polymorpha</i> CBS4732	Предобработка микрокристаллической целлюлозы методом механоактивации; Гидролиз: 10 г л ⁻¹ активированной целлюлозы, 10 г л ⁻¹ катализатора Сибунит-4-окс, при 180 °С, 1 МПа в течение 5 ч, экстракция изобутанолом	Состав (г л ⁻¹): целлобиоза - 0.11 ± 0 ; глюкоза - 2.48 ± 0.16 ; манноза - 0.15 ± 0.02 ; фруктоза - 0.12 ± 0.01 ; 5-ГМФ - 0.60 ± 0.11 ; фурфурол - 0.05 ± 0.01 ; муравьиная кислота - 0.02 ± 0 ; гликолевая кислота - 0.04 ± 0.01 ; молочная кислота - 0.06 ± 0.01 ; винная кислота - 0.06 ± 0.01	Среда YNB-H, 42 °С, 16 ч	$75.2 \pm 4.3\%$ (от теоретического)	Эта работа

В работе [544] изучали процесс сбраживания *S. cerevisiae* каталитического гидролизата предварительно обработанной щелочью рисовой соломы с его последующей очисткой на ионообменной смоле. Было показано, что количество этанола в этом случае достигло 52.29% от максимального теоретического выхода. Низкий выход этанола в данном случае, по-видимому, связан с наличием изначально большого количества муравьиной кислоты в гидролизате, которая обладает токсическим влиянием на клетки дрожжей. Стоит отметить, что выход этанола на предприятиях гидролизной промышленности в СССР также был сравним с этим показателем и составлял 56-59 л на 100 кг сбраживаемых редуцирующих веществ [546].

Помимо дрожжей *S. cerevisiae* для сбраживания гидролизатов биомассы также ранее использовались штаммы термотолерантных дрожжей (Таблица 45). Например, данные работы [547], где использовали ферментативный гидролизат жмыха сахарного тростника, продемонстрировали возможность успешного применения *Kluyveromyces* sp. ПРЕ45 для сбраживания при 45 °С, что позволило добиться 88% выхода этанола от теоретического при V_e 0.36 г л⁻¹ ч⁻¹, что сопоставимо с результатами, полученными для *K. marxianus* C1 в этой работе.

Сбраживание гидролизатов биомассы, полученных путем кислотного гидролиза, в этанол сопровождается образованием ингибиторов этого процесса, в том числе органических кислот и производных фурфурола, которые необходимо отделять от углеводов перед добавлением к клеткам. Очистку гидролизата перед сбраживанием дрожжами *K. marxianus* в основном проводят с использованием ионообменной хроматографии, что позволяет значительно снизить содержание ингибиторов сбраживания. В этой работе выход этанола у штамма *K. marxianus* C1 при использовании среды с каталитическим гидролизатом целлюлозы был в 1.3 раза меньше, чем на модельной среде (Рисунок 52), что может быть связано с влиянием побочных продуктов гидролиза целлюлозы. Для штамма *O. polymorpha* CBS4732 это соотношение составило 1.1, что свидетельствует о высокой устойчивости этого штамма к ингибиторам сбраживания. Аналогично в другом исследовании для сбраживания при 30 °С нейтрализованного Ca(OH)₂ гидролизата жома сахарного тростника применен штамм *K. marxianus* ATCC 36907 [548], где из-за наличия фурфурола в смеси показано десятикратное снижение V_e по сравнению с модельной смесью (0.86 г л⁻¹ ч⁻¹ и 0.08 г л⁻¹ ч⁻¹, соответственно). Таким образом обнаружено, что штаммы, относящиеся к *K. marxianus*, обладают относительно высокой эффективностью превращения углеводов, полученных из целлюлозы путем каталитического гидролиза, в этанол, но уступают по этому параметру штаммам *S. cerevisiae* (культивирование при 30 °С), описанным в литературе. Стоит отметить, что по данным работ [542], [544] применение дополнительной стадии очистки кислотных гидролизатов с использованием сорбентов не привело к полному снижению концентрации фурфурола и 5-ГМФ в среде для сбраживания (Таблица 45), в то время как среда YNB-H на основе каталитического гидролизата целлюлозы содержала лишь 5-ГМФ в

незначительном количестве, что позволило в итоге достигнуть относительно высокого выхода этанола в этой работе.

В исследовании, проведенном в работе [545], показано, что при использовании предобработанной соломы кукурузы с ферментативным гидролизом и сбраживанием при температуре 30 °С рекомбинантным штаммом *S. cerevisiae* 424A (LNH-ST), который экспрессирует гены метаболизма ксилозы, удастся добиться незначительной разницы в скорости накопления этанола и его выхода по сравнению с модельной средой (83.6 ± 0.9 и 88.5% от теоретического выхода, V_e 0.8 и 0.9 ± 0 г л⁻¹ ч⁻¹, соответственно), что превосходит показатели *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 в этой работе. Через 24 ч сбраживания гидролизата штаммом *S. cerevisiae* 424A (LNH-ST) концентрация биомассы снизилась более, чем на 30% (9.5 ± 0.2 г л⁻¹ для среды на основе гидролизата и 6.7 г л⁻¹ для модельной среды) [545], что сопоставимо с результатами, наблюдаемыми для штаммов *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 на среде YNB-H. Более высокая эффективность продукции этанола штаммом *S. cerevisiae* 424A (LNH-ST) может быть связана с его высокой метаболической эффективностью из-за его генетической модификации. При этом оба штамма *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 обладают более высоким накоплением этанола при температуре 42 °С и способны продуцировать большое количество биомассы на среде YNB-H, содержащей каталитический гидролизат целлюлозы (Рисунок 52). Применение такого подхода демонстрирует альтернативный способ получения этанола из целлюлозосодержащего сырья. Масштабирование подобного процесса переработки целлюлозы приведет к необходимости получения концентрированного раствора сахаров после каталитического гидролиза и экстракции 5-ГМФ, что, возможно, потребует применения дополнительных стадий очистки субстрата для сбраживания.

ГЛАВА 6. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ПСФА-ESTUT1-TRXA В РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА МАЛАТИОНА

6.1 Анализ свойств ПСФА-estUT1-TrxA

Для анализа изменений в свойствах estUT1-TrxA при получении ферментного препарата методом ПСФА проводили исследование свойств фермента, полученного путем коэкспрессии с шаперонами *E. coli* в составе растворимой фракции белка, до и после его иммобилизации.

Анализ субстратной специфичности и кинетических параметров estUT1-TrxA (Таблица 31) и ПСФА-estUT1-TrxA (Таблица 46) не выявили изменений в селективности фермента по сравнению с неиммобилизованным ферментом. Показано, что при иммобилизации фермента значение K_M повышалось, что связано со стабилизацией его структуры [548]. Каталитическая эффективность ПСФА-estUT1-TrxA была меньше по сравнению с estUT1-TrxA, что коррелирует с другими исследованиями [549]. Кинетические исследования показали высокую каталитическую эффективность фермента в отношении гидролиза малатиона ($835.5 \pm 58.7 \text{ c}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), превышающее аналогичное значение для мутантной формы гидролазы из *Flavobacterium* spp. ($154.91 \text{ c}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) [550].

Таблица 46 – Кинетические параметры ПСФА-estUT1-TrxA [551]

Субстрат	K_M , мкМ***	$K_{кат}$, c^{-1} ***	$K_{кат}/K_M$, $\text{c}^{-1} \times \text{мМ}^{-1}$ ***
pNPC2	176.7 ± 8.5	31.1 ± 1.2	176.1 ± 2.2
pNPC4	710.7 ± 64.7	41.8 ± 0.4	59.1 ± 5.6
pNPC8	2490.0 ± 141.8	56.9 ± 1.2	22.9 ± 1.1
Малатион	29.6 ± 3.3	15.2 ± 1.0	515.4 ± 22.8

Активность измеряли при 50 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 8.0 (для эфиров *n*-нитрофенола) и при 37 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 7.0 (для малатиона) для субстратов в концентрациях 0.003 – 10 мМ. *** $p < 0.001$, однофакторный дисперсионный анализ (при сравнении констант при использовании разных субстратов)

При анализе активности иммобилизованной и неиммобилизованной липазы (Рисунок 53) выявлено, что иммобилизация не оказывала влияния на температурный оптимум эстеразы estUT1-TrxA, который также составил 70 – 80 °C. При этом ПСФА-estUT1-TrxA отличался более высокой активностью по сравнению с estUT1-TrxA в лизате *E. coli*.

Термостабильность фермента оценивали при 50 – 80 °C (Рисунок 53Б, В) в течение 8 ч, константы скорости инактивации (k_i) и значения периода полуинактивации ($t_{1/2}$) фермента до и после сшивки определяли согласно п.2.2.3.3 (Таблица 47). Снижение k_i и увеличение $t_{1/2}$ указывают на то, что термостабильность ПСФА-estUT1-TrxA значительно выше у

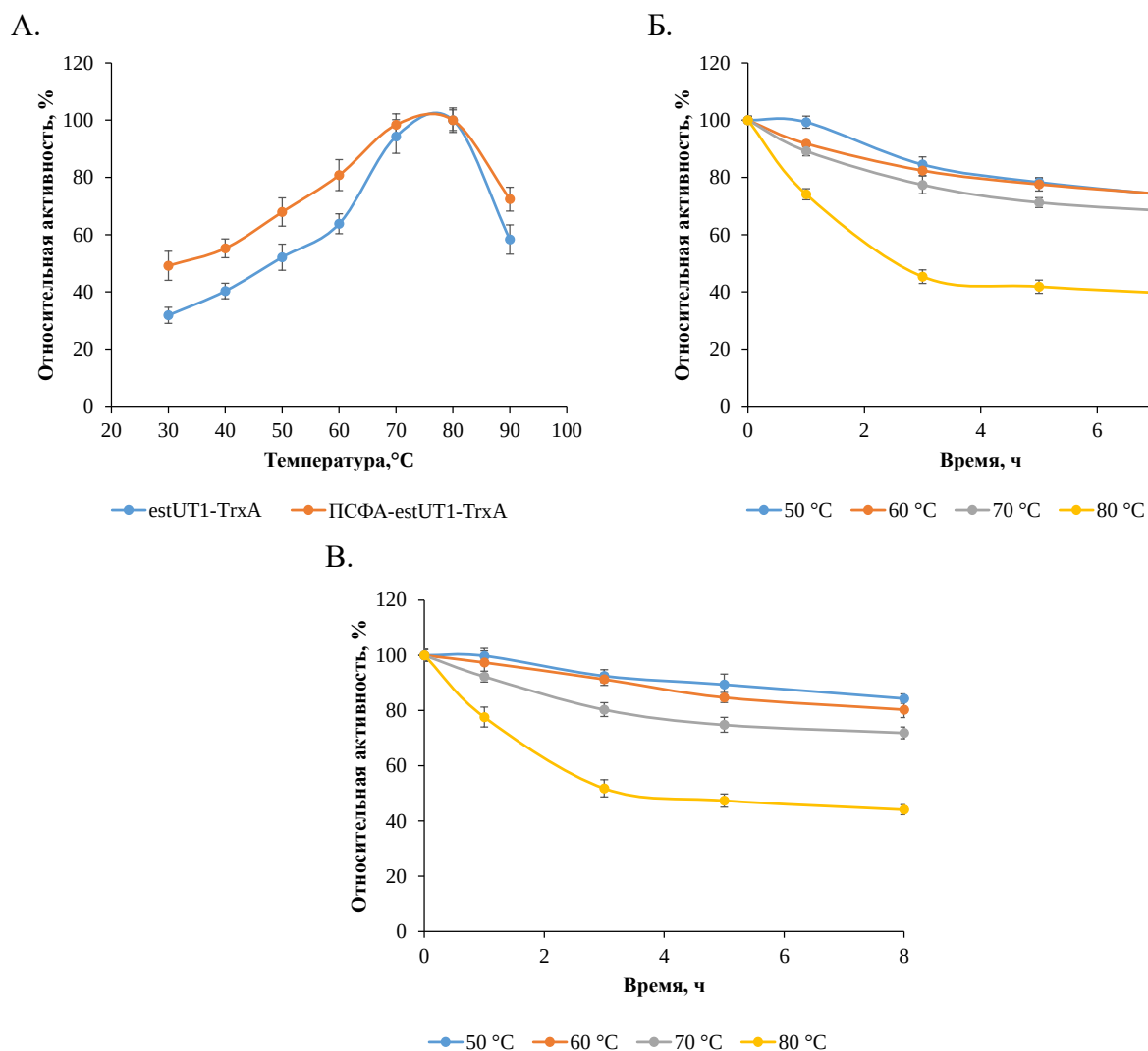


Рисунок 53 – Влияние поперечной сшивки ферментных агрегатов на активность и стабильность estUT1-TrxA. (А) Активность, (Б) Стабильность до сшивки, (В) Стабильность после сшивки.

Значение активности при 80 °C было принято за 100%. pNPC2 использован в качестве субстрата

иммобилизованного фермента. Сравнимой стабильностью estUT1-TrxA и ПСФА-estUT1-TrxA обладали при температурах 50 и 70 °C, соответственно, что говорит о повышении стабильности фермента на 20 °C при поперечной сшивке. Более высокая термостабильность иммобилизованных ферментов обусловлена образованием дополнительных ковалентных связей в структуре, что предотвращает их денатурацию при высоких температурах.

Как показано на Рисунке 54, оптимум pH для обеих форм фермента не изменился и составил 8.0, при этом фермент в форме ПСФА-estUT1-TrxA обладал достоверно ($p < 0.01$, двухвыборочный односторонний t-тест) более высокой относительной активностью при pH 7.0

Таблица 47 – Сравнение кинетических параметров estUT1-TrxA и ПСФА- estUT1-TrxA

Температура, °C	$k_i, \text{ч}^{-1}$		$t_{1/2}, \text{ч}$	
	estUT1-TrxA	ПСФА-estUT1-TrxA	estUT1-TrxA	ПСФА-estUT1-TrxA
50	4.3×10^{-2}	2.2×10^{-2}	16.1	31.3
60	4.5×10^{-2}	3.1×10^{-2}	15.4	22.5
70	6.0×10^{-2}	4.7×10^{-2}	11.5	14.8
80	22.7×10^{-2}	16.5×10^{-2}	3.1	4.2

($92.4 \pm 7.6\%$) 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 исходным ферментом без изменения pH-оптимума, что может быть связано с увеличением конформационной стабильности фермента вследствие взаимодействия с глутаровым альдегидом.

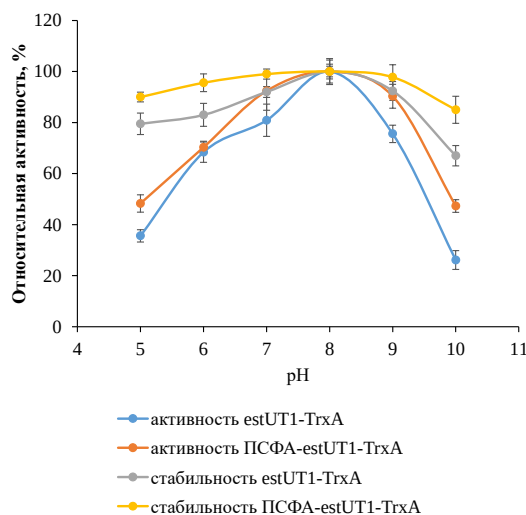


Рисунок 54 – Влияние поперечной сшивки фермента глутаровым альдегидом на активность и стабильность estUT1-TrxA при различных значениях pH. Активность измеряли при 50 °C, стабильность - после инкубации 1 ч при 50 °C (активность без инкубации была принята за 100%). pNPC2 использован в качестве субстрата

При анализе чувствительности фермента к ингибиторам 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 (Таблица 48). Следовательно, поперечная сшивка estUT1-TrxA защищает фермент от термической инактивации и повышает его устойчивость к химическим веществам, включая загрязняющие воду (поверхностно-активные вещества [552], тяжелые металлы, органические загрязнители [553]).

Таблица 48 – Влияние поперечной сшивки фермента глутаровым альдегидом на стабильность estUT1-TrxA в присутствии различных веществ

Вещество	estUT1-TrxA	ПСФА-estUT1-TrxA
Контроль (без добавок)	100.0 ± 4.2	100.0 ± 2.9
30% Этанол	120.4 ± 6.2	124.7 ± 4.1
30% Метанол	134.8 ± 3.1	140.3 ± 5.9
10 мМ PMSF	8.4 ± 1.4	15.6 ± 0.9
10 мМ ДТТ	64.3 ± 5.3	77.5 ± 2.1
10 мМ 2-меркаптоэтанол	74.3 ± 3.6	90.8 ± 2.7
1% SDS	62.4 ± 2.7	94.3 ± 6.1
1% Твин 20	47.6 ± 4.1	73.8 ± 2.4
1% Тритон X-100	12.3 ± 0.7	21.7 ± 1.2

Остаточная активность после 1 ч инкубации при 50 °С измерена с использованием pNPC2

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

Поскольку ПСФА-estUT1-TrxA устойчив в широком диапазоне pH, температур, в присутствии различных химических веществ, а также способен с высокой эффективностью гидролизовать малатион, он был применен для гидролиза этого соединения в среде WW. Возможность многократного применения ПСФА-estUT1-TrxA была исследована для реакции гидролиза малатиона (27.5 мг л⁻¹) при 37 °С в различных средах (Рисунок 55): 50 мМ Tris-HCl pH

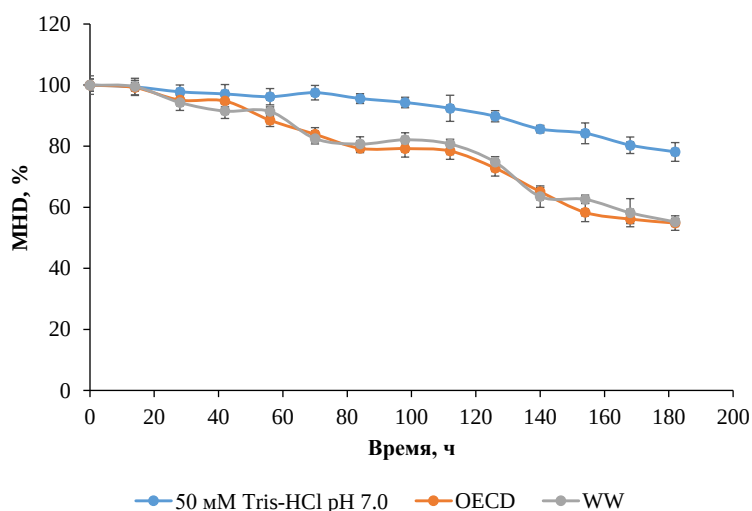


Рисунок 55 – Операционная стабильность ПСФА-estUT1-TrxA в реакции гидролиза малатиона.

Исходная концентрация малатиона 27.5 мг л⁻¹, 37 °С

7.0, OECD и среде WW, которая моделирует сточные воды, загрязненные малатионом. Выявлено, что ПСФА-estUT1-TrxA обладает высокой стабильностью во всех исследованных средах: 50 мМ

Трис–HCl pH 7.0 ($t_{1/2}$ 30.7 ± 3.0 сут), OECD ($t_{1/2}$ 14.1 ± 0.4 сут) и WW ($t_{1/2}$ 14.8 ± 0.6 сут), обеспечивая процент гидролиза малатиона свыше 55% после 25 циклов реакции (350 ч) при 37 °C в среде WW.

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

В настоящей работе было предложено использовать ферментативный гидролиз для очистки сточных вод от малатиона, поскольку этот подход обладает рядом преимуществ перед традиционными способами очистки (в том числе не происходит образования шламов и вредных побочных продуктов). В частности, использование традиционных методов очистки воды не позволяет полностью удалить пестициды. Например, окисление хлором удаляет из воды 60% пестицидов (при этом образуются канцерогенные тригалометаны), а окисление озоном - 70% пестицидов [554]. Использование ферментов для биоремедиации сточных вод позволяет с высокой селективностью проводить очистку от различных соединений, а также отличается экологичностью. Стоимость подобного подхода может быть снижена за счет использования более эффективных ферментов и их продуцентов, а также за счет иммобилизации ферментов [555].

Сравнение биокаталитического подхода к биodeградации малатиона с применением микроорганизмов показывает, что в отличие от способа, использованного в этой работе, микробиальное биоразложение малатиона (на 50 – 80%) занимает от нескольких часов до нескольких дней (Таблица 49).

Например, штамм *B. licheniformis* ML-1 обеспечил примерно 78% удаления малатиона из жидкой среды в течение пяти дней [238]. Ранее было показано, что карбоксиэстераза D1CarE5 бактерии *Alicyclobacillus tengchongensis*, клонированная в pET28a(+) и экспрессированная в *E. coli* BL21(DE3), обладает высокой способностью гидролизовать малатион: удаление малатиона составило 89% в течение 100 мин при исходной концентрации 5 мг л⁻¹ [240]. Фосфотиоэстераза PoOPHM9, экспрессированная в *P. pastoris* и иммобилизованная на полимере Pluronic F127 [556], продемонстрировала более высокую стабильность при pH 7.0 – 11.0 и более высокий температурный оптимум (50 °C), чем у неиммобилизованного фермента (30 °C). Активность иммобилизованного фермента в реакции гидролиза малатиона составляла 85.4% от исходной после 10 циклов эксплуатации. Бактерия *Bacillus* sp. S14, иммобилизованная в 3% альгинате кальция, также была применена в качестве средства для удаления малатиона из водных растворов (удаление составило 64.4% в оптимальных условиях) [242]. Эстераза ПСФА-estUT1-TrxA,

Таблица 49 – Сравнительная характеристика способов удаления малатиона с использованием ферментов и микроорганизмов

Ферментный препарат	Условия реакции	Удаление малатиона, %	Ссылка
ПСФА-estUT1-TrxA (<i>U. thermosphaericus</i>)	Малатион 27.5 мг л ⁻¹ , 37 °С, 14 ч, pH 7.0	99.4 ± 2.8	Эта работа [552]
ПСФА-estUT1-TrxA (<i>U. thermosphaericus</i>)	Малатион 27.5 мг л ⁻¹ , 37 °С, 14 ч, WW	99.5 ± 1.4	Эта работа [552]
<i>Bacillus</i> sp. S14 иммобилизован в 3% альгината кальция	Малатион 50 мг л ⁻¹ , 25 °С, 8 ч, pH 7.0	64.4	[555]
<i>B. licheniformis</i> ML-1	Малатион 25 мг л ⁻¹ , 32 °С, 5 сут, pH 7.5	78	[239]
Карбоксиэстераза D1CarE5 (<i>A. tengchongensis</i>)	Малатион 5 мг л ⁻¹ , 37 °С, 100 мин, pH 7.0	89	[241]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Малатион 250 мг л ⁻¹ , 30 °С, 3 сут	50	[240]
<i>Pseudomonas putida</i>	Малатион 125 мг л ⁻¹ , 30 °С, 7 сут, pH 7.0	72	[235]
Фосфотиоэстераза PoOP`HM9 иммобилизованная на Pluronic F127	Малатион 50 мг л ⁻¹ , 25 °С, 30 мин, pH 9.0	100%	[556]

полученная в этой работе, не только превосходит активность иммобилизованной липазы бактерии *Bacillus* sp. S14 (Таблица 49), но также остается стабильной (удаление малатиона составляет более 78.1 ± 3.1%) в течение 25 циклов гидролиза в 50 мМ Трис-HCl pH 7.0, что превышает параметры иммобилизованной фосфотиоэстеразы PoOP`HM9 [556]. В этой работе была успешно продемонстрирована способность ПСФА-estUT1-TrxA гидролизовать инсектицид малатион из среды WW. Эффективность удаления малатиона составила свыше 99.4 ± 2.8% через 25 циклов эксплуатации [557]. Таким образом, применение ферментного препарата 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

Использование возобновляемого сырья в промышленности в ряде случаев служить альтернативой ископаемому сырью из-за его высокой доступности и более низкой цены. Хотя основным источником возобновляемого сырья служат сельскохозяйственные культуры, в последнее время большое внимание уделяется переработке биомассы непищевого назначения. Развитие этих технологий позволит в будущем более полно использовать потенциал этого вида сырья.

Микроводоросли являются одним из перспективных источников непищевой биомассы, обладающих быстрым накоплением биомассы и высоким содержанием липидов и углеводов, которые также не требуют особых условий для выращивания. Для получения биодизельного топлива высокого качества с низкой себестоимостью необходимо использовать штаммы с высоким уровнем накопления биомассы и липидов, в том числе обладающих высокой степенью насыщенности (высоким содержанием НЖК и МНЖК), для получения на их основе биотоплива, стойкого к окислению и соответствующего современным стандартам качества. Другим востребованным компонентом биомассы микроводорослей являются углеводы, которые также являются сырьем для получения различных химических веществ.

Для поиска эффективного продуцента биомассы и липидов в работе проведено выделение и исследование свойств новых штаммов микроводорослей, а также исследование свойств отдельных штаммов, полученных из коллекций микроводорослей. При первичном отборе штаммов по способности накапливать нейтральные липиды выявлено, что их накопление отличается при культивировании штаммов на разных средах (BBM, OECD и WW). Штаммы *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IPPAS C-1 и *C. sorokiniana* IC-62 продуцировали большее количество нейтральных липидов по сравнению с остальными штаммами на стадии первичного отбора и были использованы как для поиска штаммов с высоким содержанием насыщенных липидов, так и для исследования факторов, влияющих на синтез нейтральных липидов в клетках. В ходе первичного отбора микроводорослей было выявлено, что штаммы, относящиеся к *P. kessleri*, преимущественно накапливают углеводы в стационарной фазе роста, поэтому они также были выбраны для изучения факторов, влияющих на метаболизм липидов и углеводов в клетках.

Поиск штаммов микроводорослей с высоким содержанием нейтральных липидов проводили на среде BBM в колбах. Выявлено, что в этих условиях штаммы *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44 и *S. abundans* A1175, обладавшие высокой скоростью накопления биомассы, также обнаруживали высокую скорость накопления липидов. Кроме того, изменение

состава жирных кислот при переходе от экспоненциальной фазы роста к стационарной характеризовалось снижением количества НЖК и повышением ПНЖК. Показано, что штамм *S. abundans* A1175 обладал относительно высоким суммарным уровнем накопления НЖК и МНЖК ($72.8 \pm 5.8\%$), а также общих липидов ($44.4 \pm 2.7\%$) в стационарной фазе роста, что близко к данным других исследований и является одним из самых высоких показателей для микроводорослей. Штамм *S. abundans* A1175 может быть рекомендован для получения липидов с высоким уровнем насыщенности при культивировании на среде BBM. Кроме того, выявлено, что у всех штаммов высокое содержание белка соответствовало низкому содержанию общих липидов, в частности, наибольшим содержанием белка обладает *C. sorokiniana* IPPAS C-1 ($38.5 \pm 1.7\%$). Штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Micractinium* sp. IC-44, *C. sorokiniana* IPPAS C-1 обладали сравнимым с *S. abundans* A1175 уровнем липидов, но накапливали большее количество биомассы, поэтому были использованы для анализа факторов, влияющих на накопление нейтральных липидов в клетках микроводорослей.

Поскольку на этапе первичного отбора было выявлено, что уровень накопления нейтральных липидов у микроводорослей отличается на различных средах, для анализа факторов, влияющих на этот процесс, были использованы как модельные среды (BBM и OECD), так и среды на основе сточных вод (WW), как наиболее дешевый субстрат для культивирования микроводорослей. При культивировании на среде WW в колбах выявлено, что штаммы *Micractinium* sp. IC-76 и *Micractinium* sp. IC-44 накапливали наибольшее количество нейтральных липидов в стационарной фазе роста, в то время как IPPAS C-1 практически их не накапливал. В стационарной фазе роста штаммы демонстрировали увеличение содержания C16:0 и C18:1, в то время как содержание C18:0 снижалось. Показано, что в отличие от среды BBM, при культивировании на среде WW эти штаммы в целом обладают сравнимыми уровнями накопления моно- и ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, штаммы обладали способностью полностью извлекать NH_4^+ и PO_4^{3-} из WW, но мало влияли на ХПК среды. Анализ метаболизма штаммов выявил, что близкородственные штаммы, относящиеся к родам *Chlorella* и *Micractinium*, имеют существенные различия в синтезе нейтральных липидов на среде WW. Штамм *Micractinium* sp. IC-76 с наибольшим уровнем накопления нейтральных липидов обладает наибольшими отличиями в метаболизме при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста. Методами PLS-DA и обогащения по метаболическим циклам выявлено, что наибольшим изменениям в процессе индукции накопления липидов у *Micractinium* sp. IC-76 на среде WW были подвержены циклы, связанные с метаболизмом крахмала и углеводов. В стационарной фазе роста концентрация сахарозы у этого штамма была почти в тринадцать раз больше по сравнению с экспоненциальной фазой. Также выявлено значимое снижение концентрации аспарагиновой и пироглутаминовой кислот, что обусловлено снижением поступления NH_4^+ в цикл мочевины.

Таким образом, метаболиты биосинтеза аминокислот, жирных кислот и цикла трикарбоновых кислот участвуют в перестройке метаболических путей, связанных с накоплением нейтральных липидов в стационарной фазе роста. В работе выявлены метаболические циклы, участвующие в процессах запасания нейтральных липидов микроводорослями, что в дальнейшем послужит основой для увеличения их продукции у штаммов микроводорослей с высоким уровнем нейтральных липидов. Штамм *Micractinium* sp. IC-76 может быть рекомендован для применения в процессах, связанных с доочисткой сточных вод с низким уровнем ХПК, а также для получения липидов, предназначенных для дальнейшей переработки в биодизельное топливо, при культивировании на стерилизованных сточных водах.

Поскольку по данным первичного отбора микроводорослей были выявлены штаммы, не способные накапливать нейтральные липиды в стационарной фазе роста на среде BBM, представляется интересным выявить факторы, вызывающих индукцию этого процесса в клетках и изучить его на уровне метаболизма. Применение такого подхода позволит в дальнейшем осуществить направленную модификацию расширенного круга штаммов, обладающих высоким уровнем накопления биомассы, но низким уровнем липидов, с целью изменения их метаболизма. При проведенном анализе было выявлено, что увеличение солености среды приводит к наибольшему увеличению накопления нейтральных липидов в биомассе у штаммов, относящихся *P. kessleri*. Исследования на модельном штамме *P. kessleri* IC-11, который в стационарной фазе роста на среде BBM накапливал 44.8 ± 4.0 г л⁻¹ углеводов, показали, что количество ПНЖК в стационарной фазе роста при добавлении соли в концентрации 30 г л⁻¹ было меньше, чем на среде BBM без добавления солей. Для этого штамма, в отличие от высоколипидных штаммов, количество C16:0 и C18:0 снижалось в стационарной фазе роста, в то время как содержание ненасыщенных ЖК C18:1 и C18:2 достоверно увеличивалось. Накопление биомассы при культивировании на среде WW было меньше, чем на среде BBM, что связано со сложным составом сточных вод. Анализ метаболизма выявил, что добавление 30 г л⁻¹ солей в среду WW вызывало накопление большего количества липидов, чем на среде BBM, кроме того, было выявлено возникновение эффекта переключения синтеза углеводов на синтез нейтральных липидов.

Стоит отметить, что наличие солей в среде снижало эффективность водоочистки с использованием микроводорослей по NH₄⁺, NO₃⁻ и ХПК. Анализ метаболизма методами PCA и PLS-DA в экспоненциальной и стационарной фазах роста выявил, что у *P. kessleri* IC-11 при культивировании на среде BBM-S наблюдается увеличение концентрации галактозы и рафинозы (в 17.3 и 43.3 раза, соответственно) по сравнению со средой без добавления солей. При культивировании этого штамма на среде BBM обнаружено переключение процесса накопления энергии в стационарной фазе с синтеза высокоэнергетических нуклеотидов на синтез липидов.

На это указывает снижение концентрации аденилата как части пуринового метаболизма, что может происходить из-за истощения пула эквивалентов энергии (АТФ), образующегося в других метаболических путях, включая метаболизм глюкозы в цикле гликолиза. Напротив, при изучении метаболизма *P. kessleri* IC-11 при культивировании на среде WW показано, что накопление липидов на WW-S, вероятно, связано с накоплением эквивалентов энергии в цикле лимонной кислоты в экспоненциальной фазе, а также с окислением пролина. Эти метаболиты можно рассматривать как индикаторы процесса переключения метаболизма на синтез нейтральных липидов, наблюдающегося при культивировании микроводорослей в среде с высоким содержанием солей.

Наработка партий биомассы штаммов микроводорослей в лабораторной установке для культивирования выявила небольшое накопление нейтральных липидов в стационарной фазе роста для *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76, однако количество общих липидов у этих штаммов (11.5 ± 0.5 и $11.3 \pm 1.2\%$, соответственно) было сравнимым с *P. kessleri* IC-11. Содержание НЖК и МНЖК у *Micractinium* sp. IC-76 в стационарной фазе роста при культивировании в установке составило $44.1 \pm 1.3\%$, у *Micractinium* sp. IC-44 – $48.4 \pm 4.3\%$, что было меньше, чем при культивировании в колбах. Количество углеводов у *P. kessleri* IC-11 при культивировании в установке составило $34.3 \pm 2.3\%$, эта биомасса была затем успешно применена в рамках смежных работ для получения муравьиной кислоты с использованием гомогенного катализа гетерополикидлотами.

Для разработки экологически чистого подхода к гидролизу и переэтерификации органических веществ, в том числе являющихся компонентами биомассы, проведена разработка иммобилизованных липолитических ферментов. Данная проблема стоит особенно остро, поскольку имеющиеся на рынке препараты являются зарубежными. Для решения задачи переэтерификации липидов микроводорослей была использована иммобилизованная липаза *B. ceracia*. Ее применение в реакции переэтерификации липидов биомассы *Micractinium* sp. IC-76, полученной на лабораторной установке, выявило, что в оптимальных условиях реакции выход МЭЖК составил $92.1 \pm 0.7\%$, что близко к значениям, получаемым при переэтерификации растительных масел с использованием коммерческих иммобилизованных липаз. Иммобилизованная липаза Ката на пятом цикле использования обеспечила выход МЭЖК $45.7 \pm 4.8\%$, что сопоставимо с результатами аналогичных исследований. Таким образом, разработанная иммобилизованная липаза Ката и модель реакции переэтерификации, полученные в этой работе, могут успешно применяться для получения МЭЖК из липидов *Micractinium* sp. IC-76.

Другим компонентом биомассы, использованным для переработки в этой работе, являются растительные масла. С этой целью проведена иммобилизация термостабильной липазы

G. stearothermophilus G3 (предоставленная ФИЦ ИЦиГ СО РАН) на мезопористом силикагеле. Полученный ферментативный препарат БКЛ с активностью 23.6 ЕА г⁻¹ был применен для получения МЭЖК из подсолнечного масла. В оптимальных условиях реакции переэтерификации выход МЭЖК составил 44%. Аналогично БКЛ был применен в реакции переэтерификации подсолнечного и гидрированного соевого масла для получения модифицированных пищевых жиров. В оптимальных условиях реакции максимально достигнутая степень переэтерификации составила 51%. Несмотря на то, что БКЛ обладал в два раза меньшей активностью, чем коммерческие иммобилизованные липазы, он обладал высокой стабильностью при повышенных температурах. В реакции получения МЭЖК время полуинактивации БКЛ составляет 477 ч, в реакции получения модифицированных жиров - 121 ч. Полученные данные о применении иммобилизованной липазы *G. stearothermophilus* G3 расширяют фундаментальные знания о свойствах липаз термостабильных бактерий.

Для комплексной переработки биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-44 с получением МЭЖК использовали ионные жидкости, как более безопасный подход. Показано, что применение экстрагирования липидов как дополнительной стадии в этом процессе снижает выход МЭЖК. Напротив, прямая переэтерификация биомассы, катализируемая H₂SO₄ в присутствии [BMIM][HSO₄], по сравнению с прямой переэтерификацией без использования ИЖ, увеличивала выход МЭЖК на 10.4%. Применение кислой ИЖ [BMIM][HSO₄] было эффективным как для экстрагирования липидов, так и для прямой переэтерификации биомассы, однако уступало по эффективности переэтерификации липидов с использованием Ката. Остаточная биомасса, полученная после прямой переэтерификации и кислотного гидролиза, была использована для получения янтарной кислоты путем сбраживания *A. succinogenes* 130Z с выходом 67.0 ± 5.0%, что превышает показатели аналогичных работ. Этот подход впервые продемонстрировал возможность комплексной переработки биомассы микроводорослей в биодизельное топливо и янтарную кислоту.

В рамках этой работы впервые исследована возможность применения каталитических гидролизатов мехактивированной микрокристаллической целлюлозы, полученных с использованием мезопористого катализатора Сибунит-4-окс, для получения этанола путем сбраживания термотолерантными дрожжами. В рамках этого подхода возможно не только получать такой ценный продукт, как 5-ГМФ, являющийся основой для получения компонентов топлива и полимеров, но и глюкозу, которую можно перерабатывать путем сбраживания в этанол. Отличительной особенностью предложенного подхода является относительно низкое содержание ингибиторов ферментации (включая 5-ГМФ) и полное отсутствие фурфурола в смеси, полученной после экстракции 5-ГМФ, что позволило использовать ее для дальнейшего сбраживания. Выявлено, что из всех выделенных термотолерантных дрожжей, накапливающих

биомассу при температурах до 48 °С и имеющих высокую устойчивость к побочным продуктам каталитического гидролиза целлюлозы, только *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 превосходили другие штаммы по способности накапливать биомассу и продуцировать этанол на среде с нейтрализованным каталитическим гидролизатом целлюлозы. Выход этанола при культивировании на среде с гидролизатами составил $72.0 \pm 5.7\%$ для *K. marxianus* C1 и $75.2 \pm 4.3\%$ для *O. polymorpha* CBS4732. Показано, что параметры исследованных штаммов сопоставимы с параметрами штаммов-аналогов. По сравнению с другими методами получения этанола из гидролизатов (например, кислотным гидролизом) каталитический процесс гидролиза признан экологически безопасным. Показано, что использование штаммов *K. marxianus* C1 и *O. polymorpha* CBS4732 для ферментации обработанного каталитического гидролизата целлюлозы имеет относительно высокую эффективность, поскольку штаммы устойчивы к ингибиторам сбраживания. Таким образом, предлагаемая комбинация каталитического гидролиза обработки механически активированной целлюлозы и последующего сбраживания экстрагированного гидролизата термотолерантными дрожжами может быть перспективным альтернативным методом получения этанола и использована для получения других востребованных веществ, в том числе органических кислот или спиртов.

Ферменты класса гидролаз, гидролизующие сложноэфирные связи в молекулах, соединенных с жирнокислотными остатками, не только могут успешно применяться для получения МЭЖК и модифицированных жиров, но и в реакциях гидролиза органических веществ. В ходе проведенной работы была решена задача получения ферментного препарата, обладающего высокой термостабильностью по сравнению с ближайшими аналогами. Для поиска новых липолитических ферментов было проведено выделение термофильных бактерий, показано, что *U. thermosphaericus* обладает способностью к росту и липолитической активностью при температурах 37 – 65 °С. Клонирование эстеразы estUT1 из этой бактерии в *E. coli* выявило, что она относится к XIII семейству липолитических ферментов. Изучение ее свойств показало, что фермент обладает специфичностью к короткоцепочечным остаткам жирных кислот (преимущественно C₂), температурным и pH оптимумом (70 – 80 °С и pH 8.0, соответственно), близким к свойствам описанных ферментов XIII семейства. Фермент обладает высокой термостабильностью (время полуинактивации 15 ч при 60 °С) и устойчивостью к химическим веществам (за исключением ДМСО и хлороформа), что превышает параметры отдельных аналогов. Поскольку в *E. coli* эстераза преимущественно находится в тельцах включения, то для повышения уровня ее экспрессии была применена коэкспрессия с шаперонами KJE, ClpB и ELS, что позволило на порядок увеличить удельную активность растворимой фракции белка. Было выявлено, что estUT1 экспрессировалась только при наличии дополнительного процессируемого домена TgxA, наличие которого снижало активность и термостабильность фермента. Тем не

менее свойства estUT1-TrxA позволяют использовать ее в реакции гидролиза органических соединений со сложноэфирной связью с коротким радикалом, в том числе инсектицида малатиона. С этой целью методом ПСФА была получена эстераза ПСФА-estUT1-TrxA. Исследование ее свойств показало, что поперечная сшивка ферментных агрегатов повышала термо- и pH-стабильность ферментного препарата, а также его устойчивость к химическим ингибиторам. Ферментный препарат ПСФА-estUT1-TrxA был применен для гидролиза малатиона в среде WW, причем показатели водоочистки были выше, чем у применяющихся в настоящее время методов (биологической очистки и озонирования). Выявлено, что он обеспечивает процент разложения малатиона более 55% после 25 циклов реакции (350 ч), что превосходит параметры альтернативных способов биоразложения малатиона. Таким образом, подходы, использованные в этой работе, могут быть применены в дальнейшем для клонирования других липолитических ферментов и приготовления на их основе иммобилизованных ферментных препаратов.

Таким образом, в работе продемонстрирован комплексный подход к разработке комбинированных способов переработки компонентов биомассы в востребованные вещества, а также к гидролизу и переэтерификации веществ с использованием биокатализа. 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. Внедрение таких процессов на практике в дальнейшем позволит повысить их экологичность и энергоэффективность.

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 получить 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, получаемым при использовании мезофильных дрожжей при сбраживании кислотных гидролизатов целлюлозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parajuli R., Dalgaard T., Jørgensen U., Adamsen A. P. S., Knudsen M. T., Birkved M., Gylling M., Schjørring J. K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: A review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – Т. 43. – С. 244-263.
2. Maity S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – Т. 43. – С. 1427-1445.
3. Новые физические и каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы для решения задач экологически чистой и ресурсосберегающей энергетики. / 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. – Новосибирск: Издательско-полиграфический центр НГУ, 2020. – 394 с.
4. 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. – Т. 17, № 1. – С. 70-77.
5. 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. – Т. 17, № 1. – С. 78-85.
6. Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals // *Energy Conversion and Management*. – 2010. – Т. 51, № 7. – С. 1412-1421.
7. Culaba A. B., Ubando A. T., Ching P. M. L., Chen W. H., Chang J. S. Biofuel from microalgae: Sustainable pathways // *Sustainability (Switzerland)*. – 2020. – Т. 12, № 19. – С. 1-19.
8. Arenas E. G., Rodriguez Palacio M. C., Juantorena A. U., Fernando S. E. L., Sebastian P. J. Microalgae as a potential source for biodiesel production: techniques, methods, and other challenges // *International Journal of Energy Research*. – 2017. – Т. 41, № 6. – С. 761-789.
9. Gong J., You F. Value-added chemicals from microalgae: Greener, more economical, or both? // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. 82-96.

10. 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. № 2. – С. 63-72.
11. C. Wancura J. H., Tres M. V., Jahn S. L., de Oliveira J. V. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2020. – Т. 67, № 4. – С. 648-667.
12. Применение биотехнологии для переработки липидов растительного происхождения в ценные продукты и их влияние на здоровье человека. / Сорокина К. Н., Самойлова Ю. В., Пилигаев А. В., Тулупов А. А., Пармон В. Н. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2017. – 150 с.
13. Holm H. C., Cowan D. The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2008. – Т. 110, № 8. – С. 679-691.
14. Dror A., Kanteev M., Kagan I., Gihaz S., Shahar A., Fishman A. Structural insights into methanol-stable variants of lipase T6 from *Geobacillus stearothermophilus* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Т. 99, № 22. – С. 9449-9461.
15. Sasso F., Natalello A., Castoldi S., Lotti M., Santambrogio C., Grandori R. *Burkholderia cepacia* lipase is a promising biocatalyst for biofuel production // Biotechnology Journal. – 2016. – Т. 11, № 7. – С. 954-960.
16. Шестеренко Е. А., Романовская И. И., Севастьянов О. В., Андронати С. А. Карбоксилэстеразы в энантиоселективном синтезе органических соединений // Biotechnologia acta. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 9-21.
17. Albayati S. H., Masomian M., Ishak S. N. H., Ali M. S. B. M., Thean A. L., Shariff F. B. M., Noor N. D. B. M., Rahman R. N. Z. R. A. Main structural targets for engineering lipase substrate specificity // Catalysts. – 2020. – Т. 10, № 7 - С. 747.
18. Robak K., Balcerek M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass // Food Technology and Biotechnology. – 2018. – Т. 56, № 2. – С. 174-187.
19. Geboers J. A., Van De Vyver S., Ooms R., Op De Beeck B., Jacobs P. A., Sels B. F. Chemocatalytic conversion of cellulose: Opportunities, advances and pitfalls // Catalysis Science and Technology. – 2011. – Т. 1, № 5. – С. 714-726.
20. Liu X., Min X., Liu H., Cao Y., Liu Y., Han M., Sun Z. M., Ji S. Efficient conversion of cellulose to 5-hydroxymethylfurfural catalyzed by a cobalt-phosphonate catalyst // Sustainable Energy and Fuels. – 2020. – Т. 4, № 11. – С. 5795-5801.
21. Choudhary J., Singh S., Nain L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass // Electronic Journal of Biotechnology. – 2016. – Т. 21. – С. 82-92.

22. Чернова Н. И., Киселева С. В., Калинина О. Ю. Биодизель из микроводорослей: методы индукции липидов и скрининга перспективных штаммов // Альтернативная энергетика и экология. – 2015. – № 21. – С. 44-54.
23. Сергеева Я. Э., Мостова Е. Б., Горин К. В., Комова А. В., Конова И. А., Пожидаев В. М., Готовцев П. М., Васильев Р. Г., Синюков С. П. Расчет характеристик биодизельного топлива на основе жирнокислотного состава липидов некоторых биотехнологически значимых микроорганизмов // Биотехнология. – 2017. – Т. 33, № 1. – С. 53-61.
24. Knothe G. Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. Prediction of fuel properties of algal biodiesel // Energy and Fuels. – 2012. – Т. 26, № 8. – С. 5265-5273.
25. Sadvakasova A. K., Akmukhanova N. R., Bolatkhan K., Zayadan B. K., Ussebayeva A. A., Bauenova M. O., Akhmetkaliyeva A. E., Allakhverdiev S. I. Search for new strains of microalgae-producers of lipids from natural sources for biodiesel production // International Journal of Hydrogen Energy. – 2019. – Т. 44, № 12. – С. 5844-5853.
26. Zhang L., Hu F., Wan X., Pan Y., Hu H. Screening of high temperature-tolerant oleaginous diatoms // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2020. – Т. 30, № 7. – С. 1072-1081.
27. Rai M. P., Gupta S. Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans* // Energy Conversion and Management. – 2017. – Т. 141. – С. 85-92.
28. Gnouma A., Sehli E., Medhioub W., Ben Dhieb R., Masri M., Mehlmer N., Slimani W., Sebai K., Zouari A., Brück T., Medhioub A. Strain selection of microalgae isolated from Tunisian coast: characterization of the lipid profile for potential biodiesel production // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2018. – Т. 41, № 10. – С. 1449-1459.
29. Соловченко А. Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 192-202.
30. Cha T. S., Yee W., Phua P. S. P., Loh S. H., Aziz A. A brief period of darkness induces changes in fatty acid biosynthesis towards accumulation of saturated fatty acids in *Chlorella vulgaris* UMT-M1 at stationary growth phase // Biotechnology Letters. – 2021. – Т. 43, № 4. – С. 803-812.
31. Lari Z., Abrishamchi P., Ahmadzadeh H., Soltani N. Differential carbon partitioning and fatty acid composition in mixotrophic and autotrophic cultures of a new marine isolate *Tetraselmis* sp. KY114885 // Journal of Applied Phycology. – 2019. – Т. 31, № 1. – С. 201-210.
32. Kabir F., Gulfranz M., Raja G. K., Inam-ul-Haq M., Awais M., Mustafa M. S., Khan S. U., Tlili I., Shadloo M. S. Screening of native hyper-lipid producing microalgae strains for biomass and lipid production // Renewable Energy. – 2020. – Т. 160. – С. 1295-1307.

33. Arguelles E. D., Laurena A. C., Monsalud R. G., Martinez-Goss M. R. Fatty acid profile and fuel-derived physico-chemical properties of biodiesel obtained from an indigenous green microalga, *Desmodesmus* sp. (I-AU1), as potential source of renewable lipid and high quality biodiesel // *Journal of Applied Phycology*. – 2018. – T. 30, № 1. – C. 411-419.
34. Andeden E. E., Ozturk S., Aslim B. Evaluation of thirty microalgal isolates as biodiesel feedstocks based on lipid productivity and triacylglycerol (TAG) content // *Current Microbiology*. – 2021. – T. 78, № 2. – C. 775-788.
35. Santhakumaran P., Kookal S. K., Mathew L., Ray J. G. Bioprospecting of three rapid-growing freshwater green algae, promising biomass for biodiesel production // *Bioenergy Research*. – 2019. – T. 12, № 3. – C. 680-693.
36. Sanchez Rizza L., Sanz Smachetti M.E., Do Nascimento M., Salerno G.L., and Curatti L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol // *Algal Research*. - 2017. – T. 22. – C. 140–147.
37. Heredia V., Gonçalves O., Marchal L., Pruvost J. Producing energy-rich microalgae biomass for liquid biofuels: Influence of strain selection and culture conditions // *Energies*. – 2021. – T. 14, № 5. - C. 1246.
38. Tripathi S., Choudhary S., Poluri K. M. Insights into lipid accumulation features of *Coccomyxa* sp. IITRSTKM4 under nutrient limitation regimes // *Environmental Technology and Innovation*. – 2021. – T. 24. – C. 101786.
39. Premaratne M., Liyanaarachchi V. C., Nishshanka G. K. S. H., Nimarshana P. H. V., Ariyadasa T. U. Nitrogen-limited cultivation of locally isolated *Desmodesmus* sp. For sequestration of CO₂ from simulated cement flue gas and generation of feedstock for biofuel production // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2021. – T. 9, № 4. – C. 105765.
40. Tarazona Delgado R., Guarieiro M. S., Antunes P. W., Cassini S. T., Terreros H. M., Fernandes V. O. Effect of nitrogen limitation on growth, biochemical composition, and cell ultrastructure of the microalga *Picocystis salinarum* // *Journal of Applied Phycology*. – 2021. – T. 33, № 4. – C. 2083-2092.
41. Sarkar S., Manna M. S., Bhowmick T. K., Gayen K. Effect of different illumination patterns on the growth and biomolecular synthesis of isolated *Chlorella thermophila* in a 50 L pilot-scale photobioreactor // *Process Biochemistry*. – 2021. – T. 109. – C. 87-97.
42. Li D., Yuan Y., Cheng D., Zhao Q. Effect of light quality on growth rate, carbohydrate accumulation, fatty acid profile and lutein biosynthesis of *Chlorella* sp. AE10 // *Bioresource Technology*. – 2019. – T. 291. – C. 121783.
43. Klein B. C., Bastos R. G., Filho R. M., Maciel M. R. W. Effect of light, CO₂ and nitrate concentration on *Chlorella vulgaris* growth and composition in a flat-plate photobioreactor // *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. – 2021. – T. 38, № 2. – C. 251-263.

44. Deamici K. M., De Moraes M. G., Santos L. O., Muylaert K., Gardarin C., Costa J. A. V., Laroche C. Static magnetic fields effects on polysaccharides production by different microalgae strains // *Applied Sciences (Switzerland)*. – 2021. – T. 11, № 11. – C. 5299.
45. Chandra N., Shukla P., Mallick N. Role of cultural variables in augmenting carbohydrate accumulation in the green microalga *Scenedesmus acuminatus* for bioethanol production // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – T. 26. – C. 101632.
46. Watanabe K., Tanaka K., Asada K., Kasai Z. The growth promoting effect of phytic acid on callus tissues of rice seed // *Plant and Cell Physiology*. – 1971. – T. 12, № 1. – C. 161-164.
47. Qian P., Gao K., Gao Z., Xue C., Hu X., Liu Q., Dong J., Deng X. Regulating the growth and chemical compositions of a freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* by adding myo-inositol to culture media // *Algal Research*. – 2021. – T. 55. – C. 102150.
48. Rempel A., Nadal Biolchi G., Farezin Antunes A. C., Gutkoski J. P., Treichel H., Colla L. M. Cultivation of microalgae in media added of emergent pollutants and effect on growth, chemical composition, and use of biomass to enzymatic hydrolysis // *Bioenergy Research*. – 2021. – T. 14, № 1. – C. 265-277.
49. Rani S., Ojha C. S. P. *Chlorella sorokiniana* for integrated wastewater treatment, biomass accumulation and value-added product estimation under varying photoperiod regimes: A comparative study // *Journal of Water Process Engineering*. – 2021. – T. 39. – C. 101889.
50. Noguchi M., Aizawa R., Nakazawa D., Hakumura Y., Furuhashi Y., Yang S., Ninomiya K., Takahashi K., Honda R. Application of real treated wastewater to starch production by microalgae: Potential effect of nutrients and microbial contamination // *Biochemical Engineering Journal*. – 2021. – T. 169. – C. 107973.
51. Maltsev Y., Maltseva I., Maltseva S., Kociolek J. P., Kulikovskiy M. A new species of freshwater algae *Nephrochlamys yushanlensis* sp. nov. (Selenastraceae, Sphaeropleales) and its lipid accumulation during nitrogen and phosphorus starvation // *Journal of Phycology*. – 2021. – T. 57, № 2. – C. 606-618.
52. Zarrinmehr M. J., Farhadian O., Heyrati F. P., Keramat J., Koutra E., Kornaros M., Daneshvar E. Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana* // *Egyptian Journal of Aquatic Research*. – 2020. – T. 46, № 2. – C. 153-158.
53. Almutairi A. W. Improvement of chemical composition of *Tisochrysis lutea* grown mixotrophically under nitrogen depletion towards biodiesel production // *Molecules*. – 2020. – T. 25, № 20. – C. 4609.
54. Andeden E. E., Ozturk S., Aslim B. Effect of alkaline pH and nitrogen starvation on the triacylglycerol (TAG) content, growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Auxenochlorella protothecoides* KP7 // *Journal of Applied Phycology*. – 2021. – T. 33, № 1. – C. 211-225.

55. Patnaik R., Mallick N. Individual and combined supplementation of carbon sources for growth augmentation and enrichment of lipids in the green microalga *Tetrademus obliquus* // Journal of Applied Phycology. – 2020. – T. 32, № 1. – C. 205-219.
56. Polat E., Yüksel E., Altınbaş M. Effect of different iron sources on sustainable microalgae-based biodiesel production using *Auxenochlorella protothecoides* // Renewable Energy. – 2020. – T. 162. – C. 1970-1978.
57. Sun Y., Huang Y. Effect of trace elements on biomass, lipid productivity and fatty acid composition in *Chlorella sorokiniana* // Revista Brasileira de Botanica. – 2017. – T. 40, № 4. – C. 871-881.
58. Savvidou M. G., Boli E., Logothetis D., Lymperopoulou T., Ferraro A., Louli V., Mamma D., Kekos D., Magoulas K., Kolisis F. N. A study on the effect of macro-and micro-nutrients on *Nannochloropsis oceanica* growth, fatty acid composition and magnetic harvesting efficiency // Plants. – 2020. – T. 9, № 5. – C. 660.
59. Rayati M., Rajabi Islami H., Shamsaie Mehrgan M. Light light intensity improves growth, lipid productivity, and fatty acid profile of *Chlorococcum oleofaciens* (Chlorophyceae) for biodiesel production // Bioenergy Research. – 2020. – T. 13, № 4. – C. 1235-1245.
60. Krzemińska I., Nosalewicz A., Reszczyńska E., Pawlik-Skowrońska B. Enhanced light-induced biosynthesis of fatty acids suitable for biodiesel production by the yellow-green alga *Eustigmatos magnus* // Energies. – 2020. – T. 13, № 22. – C. 6098.
61. Chaisutyakorn P., Praiboon J., Kaewsuralikhit C. The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production // Journal of Applied Phycology. – 2018. – T. 30, № 1. – C. 37-45.
62. Gonçalves C. F., Menegol T., Rech R. Biochemical composition of green microalgae *Pseudoneochloris marina* grown under different temperature and light conditions // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – T. 18. – C. 101032.
63. Sonmez C., Elcin E., Akin D., Oktem H. A., Yucel M. Evaluation of novel thermo-resistant *Micractinium* and *Scenedesmus* sp. for efficient biomass and lipid production under different temperature and nutrient regimes // Bioresource Technology. – 2016. – T. 211. – C. 422-428.
64. Li Z., Yang S. T., Zhou Z. Y., Peng S. Y., Zhang Q. H., Long H. Z., Li H. G. Enhancement of lipid production in *Desmodesmus intermedius* Z8 by ultrasonic stimulation coupled with nitrogen and phosphorus stress // Biochemical Engineering Journal. – 2021. – T. 172. – C. 108061.
65. Wu G., Gao Z., Du H., Lin B., Yan Y., Li G., Guo Y., Fu S., Wei G., Wang M., Cui M., Meng C. The effects of abscisic acid, salicylic acid and jasmonic acid on lipid accumulation in two freshwater *Chlorella* strains // Journal of General and Applied Microbiology. – 2018. – T. 64, № 1. – C. 42-49.

66. Zhang L., Pei H., Chen S., Jiang L., Hou Q., Yang Z., Yu Z. Salinity-induced cellular cross-talk in carbon partitioning reveals starch-to-lipid biosynthesis switching in low-starch freshwater algae // *Bioresource Technology*. – 2018. – T. 250. – C. 449-456.
67. Church J., Hwang J. H., Kim K. T., McLean R., Oh Y. K., Nam B., Joo J. C., Lee W. H. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production // *Bioresource Technology*. – 2017. – T. 243. – C. 147-153.
68. Atikij T., Syaputri Y., Iwahashi H., Praneenararat T., Sirisattha S., Kageyama H., Waditee-Sirisattha R. Enhanced lipid production and molecular dynamics under salinity stress in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (137C) // *Marine Drugs*. – 2019. – T. 17, № 8. – C. 484.
69. Anand V., Kashyap M., Samadhiya K., Ghosh A., Kiran B. Salinity driven stress to enhance lipid production in *Scenedesmus vacuolatus*: A biodiesel trigger? // *Biomass and Bioenergy*. – 2019. – T. 127. – C. 105252.
70. Hang L. T., Mori K., Tanaka Y., Morikawa M., Toyama T. Enhanced lipid productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* with combination of NaCl and CaCl₂ stresses // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2020. – T. 43, № 6. – C. 971-980.
71. Boukhris S., Athmouni K., Hamza-Mnif I., Siala-Elleuch R., Ayadi H., Nasri M., Sellami-Kamoun A. The potential of a brown microalga cultivated in high salt medium for the production of high-value compounds // *BioMed Research International*. – 2017. – T. 2017. – C. 4018562.
72. Polat E., Yüksel E., Altınbaş M. Mutual effect of sodium and magnesium on the cultivation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* // *Biomass and Bioenergy*. – 2020. – T. 132. – C. 105441.
73. Mirzadeh S., Nosrati M., Shojaosadati S. A. Synergistic effect of nutrient and salt stress on lipid productivity of *Chlorella vulgaris* through two-stage cultivation // *Bioenergy Research*. – 2020. – T. 13, № 2. – C. 507-517.
74. Teh K. Y., Loh S. H., Aziz A., Takahashi K., Effendy A. W. M., Cha T. S. Lipid accumulation patterns and role of different fatty acid types towards mitigating salinity fluctuations in *Chlorella vulgaris* // *Scientific Reports*. – 2021. – T. 11, № 1. – C. 438.
75. Rizwan M., Mujtaba G., Memon S. A., Lee K. Influence of salinity and nitrogen in dark on *Dunaliella tertiolecta*'s lipid and carbohydrate productivity // *Biofuels*. – 2020.10.1080/17597269.2020.1762275.
76. Anand V., Kashyap M., Ghosh A., Samadhiya K., Kiran B. A strategy for lipid production in *Scenedesmus* sp. by multiple stresses induction // *Biomass Conversion and Biorefinery*. – 2021.10.1007/s13399-021-01392-2.
77. Yun C. J., Hwang K. O., Han S. S., Ri H. G. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703 // *Biomass and Bioenergy*. – 2019. – T. 127. – C. 105277.

78. Singh R., Upadhyay A. K., Chandra P., Singh D. P. Sodium chloride incites reactive oxygen species in green algae *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*: Implication on lipid synthesis, mineral nutrients and antioxidant system // *Bioresource Technology*. – 2018. – T. 270. – C. 489-497.
79. Ji X., Cheng J., Gong D., Zhao X., Qi Y., Su Y., Ma W. The effect of NaCl stress on photosynthetic efficiency and lipid production in freshwater microalga—*Scenedesmus obliquus* XJ002 // *Science of the Total Environment*. – 2018. – T. 633. – C. 593-599.
80. Indrayani I., Moheimani N. R., de Boer K., Bahri P. A., Borowitzka M. A. Temperature and salinity effects on growth and fatty acid composition of a halophilic diatom, *Amphora* sp. MUR258 (Bacillariophyceae) // *Journal of Applied Phycology*. – 2020. – T. 32, № 2. – C. 977-987.
81. Mehta P., Rani R., Gupta R., Mathur A. S., Puri S. K. Biomass and lipid production of a novel freshwater thermo-tolerant mutant strain of *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738 in seawater salinity recycled medium // *Algal Research*. – 2018. – T. 36. – C. 88-95.
82. Mata T. M., Martins A. A., Oliveira O., Oliveira S., Mendes A. M., Caetano N. S. Lipid content and productivity of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris* under mixotrophic conditions and salinity stress // *Chemical Engineering Transactions*. – 2016. – T. 49. – C. 187-192.
83. Kaplan E., Sayar N. A., Kazan D., Sayar A. A. Assessment of different carbon and salinity level on growth kinetics, lipid, and starch composition of *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 // *International Journal of Green Energy*. – 2020. – T. 17, № 4. – C. 290-300.
84. Ermis H., Altinbas M. Effect of salinity on mixed microalgae grown in anaerobic liquid digestate // *Water and Environment Journal*. – 2020. – T. 34, № S1. – C. 820-830.
85. Sun X. M., Ren L. J., Bi Z. Q., Ji X. J., Zhao Q. Y., Huang H. Adaptive evolution of microalgae *Schizochytrium* sp. under high salinity stress to alleviate oxidative damage and improve lipid biosynthesis // *Bioresource Technology*. – 2018. – T. 267. – C. 438-444.
86. Kato Y., Ho S. H., Vavricka C. J., Chang J. S., Hasunuma T., Kondo A. Evolutionary engineering of salt-resistant *Chlamydomonas* sp. strains reveals salinity stress-activated starch-to-lipid biosynthesis switching // *Bioresource Technology*. – 2017. – T. 245. – C. 1484-1490.
87. Ho S. H., Nakanishi A., Kato Y., Yamasaki H., Chang J. S., Misawa N., Hirose Y., Minagawa J., Hasunuma T., Kondo A. Dynamic metabolic profiling together with transcription analysis reveals salinity-induced starch-to-lipid biosynthesis in alga *Chlamydomonas* sp. JSC4 // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – C. 45471.
88. Sturme M. H. J., Gong Y., Heinrich J. M., Klok A. J., Eggink G., Wang D., Xu J., Wijffels R. H. Transcriptome analysis reveals the genetic foundation for the dynamics of starch and lipid production in *Ettlia oleoabundans* // *Algal Research*. – 2018. – T. 33. – C. 142-155.

89. Yang H., Hu C. Regulation and remodeling of intermediate metabolite and membrane lipid during NaCl-induced stress in freshwater microalga *Micractinium* sp. XJ-2 for biofuel production // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2020. – T. 117, № 12. – C. 3727-3738.
90. Wang Z., Hao L., Ren Z., Lin C. S. K., Li Y. Metabolic profiling identified phosphatidylcholin as potential biomarker in boosting lipid accumulation in multiple microalgae // *Biochemical Engineering Journal*. – 2021. – T. 174. - C. 108130.
91. Hounsflow E., Evans C. A., Pandhal J., Sydney T., Couto N., Pham T. K., Gilmour D. J., Wright P. C. Quantitative proteomic comparison of salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii* and the snow alga *Chlamydomonas nivalis* reveals mechanisms for salt-triggered fatty acid accumulation via reallocation of carbon resources // *Biotechnology for Biofuels*. – 2021. – T. 14, № 1. - C. 121.
92. Su H., Feng J., Lv J., Liu Q., Nan F., Liu X., Xie S. Molecular mechanism of lipid accumulation and metabolism of oleaginous *Chlorococcum sphacosum* GD from soil under salt stress // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22, № 3. – C. 1-15.
93. You Z., Zhang Q., Peng Z., Miao X. Lipid droplets mediate salt stress tolerance in *Parachlorella kessleri* // *Plant Physiology*. – 2019. – T. 181, № 2. – C. 510-526.
94. Panahi B., Frahadian M., Dums J. T., Hejazi M. A. Integration of cross species RNA-seq meta-analysis and machine-learning models identifies the most important salt stress-responsive pathways in microalga *Dunaliella* // *Frontiers in Genetics*. – 2019. – T. 10, C. 752.
95. Li X., Han B., Zhao Y., Li T., Zhao P., Yu X. Improvement in lipid production in *Monoraphidium* sp. QLY-1 by combining fulvic acid treatment and salinity stress // *Bioresource Technology*. – 2019. – T. 294. – C. 122179.
96. Xing C., Li J., Lam S. M., Yuan H., Shui G., Yang J. The role of glutathione-mediated triacylglycerol synthesis in the response to ultra-high cadmium stress in *Auxenochlorella protothecoides* // *Journal of Environmental Sciences (China)*. – 2021. – T. 108. – C. 58-69.
97. Sulochana S. B., Arumugam M. Targeted metabolomic and biochemical changes during nitrogen stress mediated lipid accumulation in *Scenedesmus quadricauda* CASA CC202 // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – T. 8. – C. 585632.
98. Hulatt C. J., Smolina I., Dowle A., Kopp M., Vasanth G. K., Hoarau G. G., Wijffels R. H., Kiron V. Proteomic and transcriptomic patterns during lipid remodeling in *Nannochloropsis gaditana* // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21, № 18. – C. 1-23.
99. Shi Y., Liu M., Ding W., Liu J. Novel insights into phosphorus deprivation boosted lipid synthesis in the marine alga *Nannochloropsis oceanica* without compromising biomass production // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – T. 68, № 41. – C. 11488-11502.
100. Kato Y., Oyama T., Inokuma K., Vavricka C. J., Matsuda M., Hidese R., Satoh K., Oono Y., Chang J. S., Hasunuma T., Kondo A. Enhancing carbohydrate repartitioning into lipid and carotenoid by

- disruption of microalgae starch debranching enzyme // *Communications Biology*. – 2021. – T. 4, № 1. – C. 450.
101. Calhoun S., Bell T. A. S., Dahlin L. R., Kunde Y., LaButti K., Louie K. B., Kuftin A., Treen D., Dilworth D., Mihaltcheva S., Daum C., Bowen B. P., Northen T. R., Guarnieri M. T., Starkenburg S. R., Grigoriev I. V. A multi-omic characterization of temperature stress in a halotolerant *Scenedesmus* strain for algal biotechnology // *Communications Biology*. – 2021. – T. 4, № 1. – C. 333.
102. Feijão E., Franzitta M., Cabrita M. T., Caçador I., Duarte B., Gameiro C., Matos A. R. Marine heat waves alter gene expression of key enzymes of membrane and storage lipids metabolism in *Phaeodactylum tricornutum* // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2020. – T. 156. – C. 357-368.
103. Qu D., Miao X. Carbon flow conversion induces alkali resistance and lipid accumulation under alkaline conditions based on transcriptome analysis in *Chlorella* sp. BLD // *Chemosphere*. – 2021. – T. 265. – C. 129046.
104. Südfeld C., Hubáček M., Figueiredo D., Naduthodi M. I. S., van der Oost J., Wijffels R. H., Barbosa M. J., D'Adamo S. High-throughput insertional mutagenesis reveals novel targets for enhancing lipid accumulation in *Nannochloropsis oceanica* // *Metabolic Engineering*. – 2021. – T. 66. – C. 239-258.
105. Chungjatupornchai W., Fa-aaroonsawat S. Enhanced triacylglycerol production in oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by co-overexpression of lipogenic genes: plastidial LPAAT1 and ER-located DGAT2 // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2021. – T. 131, № 2. – C. 124-130.
106. Xue J., Chen T. T., Zheng J. W., Balamurugan S., Liu Y. H., Yang W. D., Liu J. S., Li H. Y. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the oleaginous microalga *Nannochloropsis* uncovers its potential role in promoting lipogenesis // *Biotechnology Journal*. – 2020. – T. 15, № 2. – C. e1900135.
107. Wu S., Gu W., Huang A., Li Y., Kumar M., Lim P. E., Huan L., Gao S., Wang G. Elevated CO₂ improves both lipid accumulation and growth rate in the glucose-6-phosphate dehydrogenase engineered *Phaeodactylum tricornutum* // *Microbial Cell Factories*. – 2019. – T. 18, № 1. – C. 161.
108. Hao X., Luo L., Jouhet J., Rébeillé F., Maréchal E., Hu H., Pan Y., Tan X., Chen Z., You L., Chen H., Wei F., Gong Y. Enhanced triacylglycerol production in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* by inactivation of a Hotdog-fold thioesterase gene using TALEN-based targeted mutagenesis // *Biotechnology for Biofuels*. – 2018. – T. 11, № 1. – C. 312.
109. Klaitong P., Fa-aaroonsawat S., Chungjatupornchai W. Accelerated triacylglycerol production and altered fatty acid composition in oleaginous microalga *Neochloris oleoabundans* by overexpression of diacylglycerol acyltransferase 2 // *Microbial Cell Factories*. – 2017. – T. 16, № 1. – C. 61.
110. Nzayisenga J. C., Sellstedt A. Metabolomic study of heterotrophically grown *Chlorella* sp. isolated from wastewater in northern Sweden // *Molecules*. – 2021. – T. 26, № 9. – C. 2410.

111. Wong Y. K., Ho K. C., Tsang Y. F., Wang L., Yung K. K. L. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in column photobioreactor for biomass production and lipid accumulation // Water Environment Research. – 2016. – T. 88, № 1. – С. 40-46.
112. Gupta S., Pawar S. B., Pandey R. A., Kanade G. S., Lokhande S. K. Outdoor microalgae cultivation in airlift photobioreactor at high irradiance and temperature conditions: effect of batch and fed-batch strategies, photoinhibition, and temperature stress // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2019. – T. 42, № 2. – С. 331-344.
113. Feng P., Deng Z., Hu Z., Fan L. Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors // Bioresource Technology. – 2011. – T. 102, № 22. – С. 10577-10584.
114. Rodolfi L., Zittelli G. C., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor // Biotechnology and Bioengineering. – 2009. – T. 102, № 1. – С. 100-112.
115. Nogueira N., Nascimento F. J. A., Cunha C., Cordeiro N. *Nannochloropsis gaditana* grown outdoors in annular photobioreactors: operation strategies // Algal Research. – 2020. – T. 48. – С. 101913.
116. Drira N., Dhouibi N., Hammami S., Piras A., Rosa A., Porcedda S., Dhaouadi H. Fatty acids from high rate algal pond's microalgal biomass and osmotic stress effects // Bioresource Technology. – 2017. – T. 244. – С. 860-864.
117. Пилигаев А. В., Сорокина К. Н., Пармон В. Н. Получение высокоэнергетической биомассы при гетеротрофной культивации микроводорослей в процессах водоочистки // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2015. – Т. 13, № 4. – С. 19-26.
118. Nepstad D. C., Stickler C. M., Soares-Filho B., Merry F. Interactions among Amazon land use, forests and climate: prospects for a near-term forest tipping point // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2008. – T. 363, № 1498. – С. 1737-1746.
119. González-Delgado A. D., Kafarov V. Microalgae based biorefinery: Issues to consider // CTyF - Ciencia, Tecnologia y Futuro. – 2011. – T. 4, № 4. – С. 5-22.
120. Slade R., Bauen A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects // Biomass and Bioenergy. – 2013. – T. 53. – С. 29-38.
121. Соловченко А. Е., Лобакова Е. С., Барский Е. Л., Саванина Я. В., Лукьянов А. А., Карпичников М. П. Экологическая фотобиотехнология для очистки сточных вод // Биотехнология. – 2011. № 6. – С. 70-88.
122. Park J. Y., Park M. S., Lee Y. C., Yang J. W. Advances in direct transesterification of algal oils from wet biomass // Bioresource Technology. – 2015. – T. 184. – С. 267-275.

123. Власкин М. С., Григоренко А. В., Чернова Н. И., Киселева С. В., Кумар В. Получение бионефти путем гидротермального сжижения влажной биомассы микроводорослей // Альтернативная энергетика и экология. – 2018. № 22-24. – С. 68-79.
124. Barros A. I., Gonçalves A. L., Simões M., Pires J. C. M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2015. – Т. 41. – С. 1489-1500.
125. Vanthoor-Koopmans M., Wijffels R. H., Barbosa M. J., Eppink M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel // Bioresource Technology. – 2013. – Т. 135. – С. 142-149.
126. González-Balderas R. M., Velásquez-Orta S. B., Valdez-Vazquez I., Orta Ledesma M. T. Intensified recovery of lipids, proteins, and carbohydrates from wastewater-grown microalgae *Desmodesmus* sp. by using ultrasound or ozone // Ultrasonics Sonochemistry. – 2020. – Т. 62. – С. 104852.
127. Krishnan S., Ghani N. A., Aminuddin N. F., Quraishi K. S., Azman N. S., Cravotto G., Leveque J. M. Microwave-assisted lipid extraction from *Chlorella vulgaris* in water with 0.5%–2.5% of imidazolium based ionic liquid as additive // Renewable Energy. – 2020. – Т. 149. – С. 244-252.
128. Bensalem S., Lopes F., Bodénès P., Pareau D., Français O., Le Pioufle B. Understanding the mechanisms of lipid extraction from microalga *Chlamydomonas reinhardtii* after electrical field solicitations and mechanical stress within a microfluidic device // Bioresource Technology. – 2018. – Т. 257. – С. 129-136.
129. Ramola B., Kumar V., Nanda M., Mishra Y., Tyagi T., Gupta A., Sharma N. Evaluation, comparison of different solvent extraction, cell disruption methods and hydrothermal liquefaction of *Oedogonium macroalgae* for biofuel production // Biotechnology Reports. – 2019. – Т. 22. – С. e00340.
130. Zou X., Xu K., Chang W., Qu Y., Li Y. Rapid extraction of lipid from wet microalgae biomass by a novel buoyant beads and ultrasound assisted solvent extraction method // Algal Research. – 2021. – Т. 58. – С. 102431.
131. He Y., Huang Z., Zhong C., Guo Z., Chen B. Pressurized liquid extraction with ethanol as a green and efficient technology to lipid extraction of *Isochrysis* biomass // Bioresource Technology. – 2019. – Т. 293. – С. 122049.
132. Ahmed E. A., Abo El-Enin S. A., Hamouda A. S., Mahmoud H. M. Solvent extraction techniques of lipid from algal species in wastewater treatment station // Egyptian Journal of Chemistry. – 2019. – Т. 62, № 8. – С. 1551-1562.
133. Angles E., Jaouen P., Pruvost J., Marchal L. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening // Algal Research. – 2017. – Т. 21. – С. 27-34.

134. Goh B. H. H., Ong H. C., Cheah M. Y., Chen W. H., Yu K. L., Mahlia T. M. I. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: a critical review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2019. – Т. 107. – С. 59-74.
135. Pinkert A., Marsh K. N., Pang S., Staiger M. P. Ionic liquids and their interaction with cellulose // Chemical Reviews. – 2009. – Т. 109, № 12. – С. 6712-6728.
136. Rezaei Motlagh S., Harun R., Awang Biak D. R., Hussain S. A., Omar R., Khezri R., Elgharbawy A. A. Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of lipid and eicosapentaenoic acid from *Nannochloropsis oceanica* biomass: experimental optimization approach // Journal of Applied Phycology. – 2021. – Т. 33, № 4. – С. 2015-2029.
137. Lu H., Yu X., Li H., Tu S. T., Sebastian S. Lipids extraction from wet *Chlorella pyrenoidosa* sludge using recycled [BMIM]Cl // Bioresource Technology. – 2019. – Т. 291. – С. 121819.
138. Malekghasemi S., Kariminia H. R., Plechkova N. K., Ward V. C. A. Direct transesterification of wet microalgae to biodiesel using phosphonium carboxylate ionic liquid catalysts // Biomass and Bioenergy. – 2021. – Т. 150. – С. 106126.
139. Miao C., Li H., Lü P., Wang Z., Zhuang X., Yuan Z. Preparation of biodiesel from microalgae by direct transesterification under ultrasonic-assisted ionic liquid composite conditions // Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering. – 2017. – Т. 33, № 17. – С. 248-254.
140. Wahidin S., Idris A., Shaleh S. R. M. Ionic liquid as a promising biobased green solvent in combination with microwave irradiation for direct biodiesel production // Bioresource Technology. – 2016. – Т. 206. – С. 150-154.
141. Lee H., Shin W. S., Jung J. Y., Kim C. W., Lee J. W., Kwon J. H., Yang J. W. Optimization of variables affecting the direct transesterification of wet biomass from *Nannochloropsis oceanica* using ionic liquid as a co-solvent // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2015. – Т. 38, № 5. – С. 981-987.
142. Freedman B., Butterfield R. O., Pryde E. H. Transesterification kinetics of soybean oil 1 // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1986. – Т. 63, № 10. – С. 1375-1380.
143. Василенко А. П., Иванникова Е. М., Систер В. Г., Ямчук А. И., Цедилин А. Н., Иванникова Ю. М. Микроводоросли - источник альтернативного топлива // Технические науки - от теории к практике. – 2015. № 47. – С. 63-68.
144. 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. – Т. 19, № 2. – С. 149-162.

145. Nematian T., Shakeri A., Salehi Z., Saboury A. A. Lipase immobilized on functionalized superparamagnetic few-layer graphene oxide as an efficient nanobiocatalyst for biodiesel production from *Chlorella vulgaris* bio-oil // *Biotechnology for Biofuels*. – 2020. – T. 13, № 1. – C. 57.
146. Nematian T., Salehi Z., Shakeri A. Conversion of bio-oil extracted from *Chlorella vulgaris* microalgae to biodiesel via modified superparamagnetic nano-biocatalyst // *Renewable Energy*. – 2020. – T. 146. – C. 1796-1804.
147. Picó E. A., López C., Cruz-Izquierdo Á., Munarriz M., Iruretagoyena F. J., Serra J. L., Llama M. J. Easy reuse of magnetic cross-linked enzyme aggregates of lipase B from *Candida antarctica* to obtain biodiesel from *Chlorella vulgaris* lipids // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2018. – T. 126, № 4. – C. 451-457.
148. Tran D. T., Chen C. L., Chang J. S. Effect of solvents and oil content on direct transesterification of wet oil-bearing microalgal biomass of *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized lipase as the biocatalyst // *Bioresource Technology*. – 2013. – T. 135. – C. 213-221.
149. de Vasconcellos A., Miller A. H., Aranda D. A. G., Nery J. G. Biocatalysts based on nanozeolite-enzyme complexes: Effects of alkoxysilane surface functionalization and biofuel production using microalgae lipids feedstock // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2018. – T. 165. – C. 150-157.
150. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2010. – T. 14, № 2. – C. 557-577.
151. Makareviciene V., Gumbyte M., Sendzikiene E. Simultaneous extraction of microalgae *Ankistrodesmus* sp. oil and enzymatic transesterification with ethanol in the mineral diesel medium // *Food and Bioproducts Processing*. – 2019. – T. 116. – C. 89-97.
152. Navarro López E., Robles Medina A., Esteban Cerdán L., González Moreno P. A., Macías Sánchez M. D., Molina Grima E. Fatty acid methyl ester production from wet microalgal biomass by lipase-catalyzed direct transesterification // *Biomass and Bioenergy*. – 2016. – T. 93. – C. 6-12.
153. He Y., Wang X., Wei H., Zhang J., Chen B., Chen F. Direct enzymatic ethanolysis of potential *Nannochloropsis* biomass for co-production of sustainable biodiesel and nutraceutical eicosapentaenoic acid // *Biotechnology for Biofuels*. – 2019. – T. 12, № 1. – C. 78.
154. Sánchez-Bayo A., Morales V., Rodríguez R., Vicente G., Bautista L. F. Biodiesel Production (FAEEs) by Heterogeneous Combi-Lipase Biocatalysts Using Wet Extracted Lipids from Microalgae // *Catalysts*. – 2019. – T. 9, № 3. – C. 296.
155. Abou El-Souod G. W., Morsy E. M., Hassan L. H. S., El-Sheekh M. M. Efficient saccharification of the microalga *Chlorella vulgaris* and its conversion into ethanol by fermentation // *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*. – 2021. – T. 45, № 3. – C. 767-774.

156. Constantino A., Rodrigues B., Leon R., Barros R., Raposo S. Alternative chemo-enzymatic hydrolysis strategy applied to different microalgae species for bioethanol production // *Algal Research*. – 2021. – T. 56. – C. 02329.
157. Dhandayuthapani K., Sarumathi V., Selvakumar P., Temesgen T., Asaithambi P., Sivashanmugam P. Study on the ethanol production from hydrolysate derived by ultrasonic pretreated defatted biomass of *Chlorella sorokiniana* NITTS3 // *Chemical Data Collections*. – 2021. – T. 31. – C. 100641.
158. Kaur A., Taggar M. S., Kalia A., Singh M. Nitrate-induced carbohydrate accumulation in *Chlorella sorokiniana* and its potential for ethanol production // *Bioenergy Research*. – 2021.10.1007/s12155-021-10292-2.
159. Onay M. Enhancing carbohydrate productivity from *Nannochloropsis gaditana* for bio-butanol production // *Energy Reports*. – 2020. – T. 6. – C. 63-67.
160. Stanislaus M. S., Zhang N., Yuan Y., Zheng H., Zhao C., Hu X., Zhu Q., Yang Y. Improvement of biohydrogen production by optimization of pretreatment method and substrate to inoculum ratio from microalgal biomass and digested sludge // *Renewable Energy*. – 2018. – T. 127. – C. 670-677.
161. Liu H., Zhang Z., Zhang H., Lee D. J., Zhang Q., Lu C., He C. Evaluation of hydrogen yield potential from *Chlorella* by photo-fermentation under diverse substrate concentration and enzyme loading // *Bioresource Technology*. – 2020. – T. 303. – C. 122956.
162. Chen S., Qu D., Xiao X., Miao X. Biohydrogen production with lipid-extracted *Dunaliella* biomass and a new strain of hyper-thermophilic archaeon *Thermococcus eurythermalis* A501 // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2020. – T. 45, № 23. – C. 12721-12730.
163. Kassim M. A., Rashid M. A., Halim R. Towards biorefinery production of microalgal biofuels and bioproducts: production of acetic acid from the fermentation of *Chlorella* sp. and *Tetraselmis suecica* hydrolysates // *Green and Sustainable Chemistry*. – 2017. – T. 7, № 2. – C. 152-171.
164. Usmanbaha N., Jariyaboon R., Reungsang A., Kongjan P., Chu C. Y. Optimization of batch dark fermentation of *Chlorella* sp. using mixed-cultures for simultaneous hydrogen and butyric acid production // *Energies*. – 2019. – T. 12, № 13. – C. 2529.
165. He S., Fan X., Katukuri N. R., Yuan X., Wang F., Guo R. B. Enhanced methane production from microalgal biomass by anaerobic bio-pretreatment // *Bioresource Technology*. – 2016. – T. 204. – C. 145-151.
166. Dickinson S., Mientus M., Frey D., Amini-Hajibashi A., Ozturk S., Shaikh F., Sengupta D., El-Halwagi M. M. A review of biodiesel production from microalgae // *Clean Technologies and Environmental Policy*. – 2017. – T. 19, № 3. – C. 637-668.
167. Никольская А. Б., Холстов А. В., Лягин И. В., Мамедова Ф., Ефременко Е. Н., Варфоломеев С. Д. Имобилизированные клетки *Chlorella vulgaris* для решения задач альтернативной

- энергетики и экологии // Альтернативная энергетика и экология. – 2012. – Т. 4, № 108. – С. 95-100.
168. Gentili F. G., Fick J. Algal cultivation in urban wastewater: an efficient way to reduce pharmaceutical pollutants // *Journal of Applied Phycology*. – 2017. – Т. 29, № 1. – С. 255-262.
169. Escapa C., Coimbra R. N., Paniagua S., García A. I., Otero M. Nutrients and pharmaceuticals removal from wastewater by culture and harvesting of *Chlorella sorokiniana* // *Bioresource Technology*. – 2015. – Т. 185. – С. 276-284.
170. 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. – Т. 250. – С. 538-547.
171. Luo J., Wu J., Zhang Q., Feng Q., Wu L., Cao J., Li C., Fang F. Efficient production of short-chain fatty acids from anaerobic fermentation of liquor wastewater and waste activated sludge by breaking the restrictions of low bioavailable substrates and microbial activity // *Bioresource Technology*. – 2018. – Т. 268. – С. 549-557.
172. Tan X. B., Meng J., Tang Z., Yang L. B., Zhang W. W. Optimization of algae mixotrophic culture for nutrients recycling and biomass/lipids production in anaerobically digested waste sludge by various organic acids addition // *Chemosphere*. – 2020. – Т. 244. – С. 125509.
173. Ummalyma S. B., Pandey A., Sukumaran R. K., Sahoo D. Bioremediation by Microalgae: Current and emerging trends for effluents treatments for value addition of waste streams // *Bioremediation by Microalgae: Current and Emerging Trends for Effluents Treatments for Value Addition of Waste Streams*. – Singapore: Springer Nature - 2018. – С. 355-375.
174. Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A., Talarek M., Bralska M., Zambrzycka E. The effect of lead on the growth, content of primary metabolites, and antioxidant response of green alga *Acutodesmus obliquus* (Chlorophyceae) // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015. – Т. 22, № 23. – С. 19112-19123.
175. Marchello A. E., Barreto D. M., Lombardi A. T. Effects of titanium dioxide nanoparticles in different metabolic pathways in the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) // *Water, Air, and Soil Pollution*. – 2018. – Т. 229, № 2. – С. 48.
176. Alam M. A., Wan C., Zhao X. Q., Chen L. J., Chang J. S., Bai F. W. Enhanced removal of Zn^{2+} or Cd^{2+} by the flocculating *Chlorella vulgaris* JSC-7 // *Journal of Hazardous Materials*. – 2015. – Т. 289. – С. 38-45.
177. Bhattacharya S., Pramanik S. K., Gehlot P. S., Patel H., Gajaria T., Mishra S., Kumar A. Process for Preparing Value-Added Products from Microalgae Using Textile Effluent through a Biorefinery Approach // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2017. – Т. 5, № 11. – С. 10019-10028.

178. 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. – Т. 18, № 6. – С. 61-73.
179. Kapoor M., Gupta M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications // Process Biochemistry. – 2012. – Т. 47, № 4. – С. 555-569.
180. Thakur V., Tewari R., Sharma R. Evaluation of production parameters for maximum lipase production by *P. stutzeri* MTCC 5618 and scale-up in bioreactor // Chinese Journal of Biology. – 2014. – Т. 2014. – С. 208462.
181. Yang S., Qin Z., Duan X., Yan Q., Jiang Z. Structural insights into the substrate specificity of two esterases from the thermophilic *Rhizomucor miehei* // Journal of Lipid Research. – 2015. – Т. 56, № 8. – С. 1616-1624.
182. Singh L., Sharma G., Sharma A., Awasthi G., Kumar L., Ali M. I., Moin S. Purification, isolation, and characterization of esterase from *Rhodococcus* sp. lKe-021 // Journal of Pure and Applied Microbiology. – 2020. – Т. 14, № 2. – С. 1387-1395.
183. Myrtollari K., Katsoulakis N., Zarafeta D., Pavlidis I. V., Skretas G., Smonou I. Activity and specificity studies of the new thermostable esterase EstDZ2 // Bioorganic Chemistry. – 2020. – Т. 104. – С. 104214.
184. Yang Y., Ghatge S., Hur H. G. Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from thermoalkaliphilic bacterium *Bacillus thermocloaceae* // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2019. – Т. 83, № 5. – С. 882-891.
185. Li W., Shi H., Ding H., Wang L., Zhang Y., Li X., Wang F. Characterization of two novel thermostable esterases from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* // Protein Expression and Purification. – 2018. – Т. 152. – С. 64-70.
186. Maester T. C., Pereira M. R., Machado Sierra E. G., Balan A., de Macedo Lemos E. G. Characterization of EST3: a metagenome-derived esterase with suitable properties for biotechnological applications // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2016. – Т. 100, № 13. – С. 5815-5827.
187. Zhang T., Chen H., Ni Z., Tian R., Jia J., Chen Z., Yang S. Expression and characterization of a new thermostable esterase from *Clostridium thermocellum* // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2015. – Т. 177, № 7. – С. 1437-1446.
188. Xin L., Hui-Ying Y. Purification and characterization of an extracellular esterase with organic solvent tolerance from a halotolerant isolate, *Salimicrobium* sp. LY19 // BMC Biotechnology. – 2013. – Т. 13. – С. 108.
189. Asoodeh A., Ghanbari T. Characterization of an extracellular thermophilic alkaline esterase produced by *Bacillus subtilis* DR8806 // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – Т. 85-86. – С. 49-55.

190. Jaouani A., Neifar M., Hamza A., Chaabouni S., Martinez M. J., Gtari M. Purification and characterization of a highly thermostable esterase from the actinobacterium *Geodermatophilus obscurus* strain G20 // *Journal of Basic Microbiology*. – 2012. – T. 52, № 6. – C. 653-660.
191. Ay F., Karaoglu H., Inan K., Canakci S., Belduz A. O. Cloning, purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from *Anoxybacillus* sp. PDF1 // *Protein Expression and Purification*. – 2011. – T. 80, № 1. – C. 74-79.
192. Gao X., Mao X., Lu P., Secundo F., Xue C., Sun J. Cloning, expression, and characterization of a novel thermostable and alkaline-stable esterase from *Stenotrophomonas maltophilia* OUC_est10 catalytically active in organic solvents // *Catalysts*. – 2019. – T. 9, № 5. – C. 401.
193. Lee C. M., Seo S., Kim S. Y., Song J., Sim J. S., Hahn B. S., Kim D. H., Yoon S. H. Biochemical characterization of a novel thermostable esterase from the metagenome of Dokdo islets marine sediment // *Microbiology and Biotechnology Letters*. – 2017. – T. 45, № 1. – C. 63-70.
194. Cai X., Lin L., Shen Y., Wei W., Wei D. Z. Functional expression of a novel methanol-stable esterase from *Geobacillus subterraneus* DSM13552 for biocatalytic synthesis of cinnamyl acetate in a solvent-free system // *BMC Biotechnology*. – 2020. – T. 20, № 1. – C. 36.
195. Yang Z., Zhang Y., Shen T., Xie Y., Mao Y., Ji C. Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSL family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2 // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2013. – T. 115, № 2. – C. 133-137.
196. Zhu Y., Zheng W., Ni H., Liu H., Xiao A., Cai H. Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6 // *Journal of Basic Microbiology*. – 2015. – T. 55, № 10. – C. 1219-1231.
197. Montoro-García S., Martínez-Martínez I., Navarro-Fernández J., Takami H., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer Á. Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family // *Journal of Bacteriology*. – 2009. – T. 191, № 9. – C. 3076-3085.
198. Ewis H. E., Abdelal A. T., Lu C. D. Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus* // *Gene*. – 2004. – T. 329, № 1-2. – C. 187-195.
199. Jo E., Kim J., Lee A., Moon K., Cha J. Identification and characterization of a novel thermostable gdsl-type lipase from *Geobacillus thermocatenulatus* // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2021. – T. 31, № 3. – C. 483-491.
200. Lu M., Dukunde A., Daniel R. Biochemical profiles of two thermostable and organic solvent-tolerant esterases derived from a compost metagenome // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – T. 103, № 8. – C. 3421-3437.

201. 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. – Т. 17, № 4-1. – С. 651-658.
202. 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. – Т. 17, № 4-1. – С. 666-674.
203. Abol-Fotouh D., AlHagar O. E. A., Hassan M. A. Optimization, purification, and biochemical characterization of thermoalkaliphilic lipase from a novel *Geobacillus stearothermophilus* FMR12 for detergent formulations // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Т. 181. – С. 125-135.
204. Özdemir F. İ., Tülek A., Erdoğan D. Identification and heterologous production of a lipase from *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263T and tailoring its N-terminal by a His-Tag epitope // Protein Journal. – 2021. – Т. 40, № 3. – С. 436-447.
205. Zhang J., Tian M., Lv P., Luo W., Wang Z., Xu J. High-efficiency expression of the thermophilic lipase from *Geobacillus thermocatenulatus* in *Escherichia coli* and its application in the enzymatic hydrolysis of rapeseed oil // 3 Biotech. – 2020. – Т. 10, № 12. – С. 523.
206. Druteika G., Sadauskas M., Malunavicius V., Lastauskiene E., Statkeviciute R., Savickaite A., Gudiukaite R. New engineered *Geobacillus* lipase GD-95RM for industry focusing on the cleaner production of fatty esters and household washing product formulations // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2020. – Т. 36, № 3. – С. 36.
207. Ekinici A. P., D'Inçer B., Baltaş N., Adigüzel A. Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22 // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2016. – Т. 31, № 2. – С. 325-331.
208. Zhu Y., Li H., Ni H., Xiao A., Li L., Cai H. Molecular cloning and characterization of a thermostable lipase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT9 // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Т. 31, № 2. – С. 295-306.
209. Mahadevan G. D., Neelagund S. E. Thermostable lipase from *Geobacillus* sp. Iso5: bioseparation, characterization and native structural studies // Journal of Basic Microbiology. – 2014. – Т. 54, № 5. – С. 386-396.
210. Кондратьев М. С., Кабанов А. В., Самченко А. А., Комаров В. М., Хечинашвили Н. Н. Параллельные вычисления в разработке термостабильных мутантов липаз // Журнала структурной химии. – 2018. – Т. 59, № 8. – С. 2035-2040.

211. Nguyen H. C., Nguyen N. T., Su C. H., Wang F. M., Tran T. N., Liao Y. T., Liang S. H. Biodiesel production from insects: From organic waste to renewable energy // *Current Organic Chemistry*. – 2019. – Т. 23, № 14. – С. 1499-1508.
212. Szczesna Antczak M., Kubiak A., Antczak T., Bielecki S. Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process // *Renewable Energy*. – 2009. – Т. 34, № 5. – С. 1185-1194.
213. Лакина Н. В., Шкилева И. П., Долуда В. Ю., Шумилов В. В., Бурматова О. С., Сальникова К. Е., Рубин М. А., Шиманская Е. И. Исследование структуры и свойств биокатализаторов, используемых в синтезе биодизеля // *Научно-технический вестник Поволжья*. – 2015. № 6. – С. 52-54.
214. Nguyen H. C., Huong D. T. M., Juan H. Y., Su C. H., Chien C. C. Liquid lipase-catalyzed esterification of oleic acid with methanol for biodiesel production in the presence of superabsorbent polymer: optimization by using response surface methodology // *Energies*. – 2018. – Т. 11, № 5. – С. 1085.
215. Bartha-Vári J. H., Moisă M. E., Bencze L. C., Irimie F. D., Paizs C., Toşa M. I. Efficient biodiesel production catalyzed by nanobioconjugate of lipase from *Pseudomonas fluorescens* // *Molecules*. – 2020. – Т. 25, № 3. – С. 651.
216. Palanisamy K., Kuppanmuthu K., Jeyaseelan A. *Bacillus* sp. PS35 lipase-immobilization on styrene-divinyl benzene resin and application in fatty acid methyl ester synthesis // *Iranian Journal of Biotechnology*. – 2015. – Т. 13, № 3. – С. 39-46.
217. Ying M., Chen G. Study on the production of biodiesel by magnetic cell biocatalyst based on lipase-producing *Bacillus subtilis* // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2007. – Т. 137-140, № 1-12. – С. 793-803.
218. Mendes A. A., Oliveira P. C., Vélez A. M., Giordano R. C., Giordano R. D. L. C., de Castro H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2012. – Т. 50, № 3. – С. 503-511.
219. Moreira A. B. R., Perez V. H., Zanin G. M., de Castro H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite // *Energy and Fuels*. – 2007. – Т. 21, № 6. – С. 3689-3694.
220. Freitas L., Da Rós P. C. M., Santos J. C., de Castro H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya* sp.) // *Process Biochemistry*. – 2009. – Т. 44, № 10. – С. 1068-1074.
221. Kumari V., Shah S., Gupta M. N. Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica* // *Energy and Fuels*. – 2007. – Т. 21, № 1. – С. 368-372.

222. Романенко А. В., Воропаев И. Н., Абдуллина Р. М., Чумаченко В. А. Разработка палладиевых катализаторов на углеродных носителях семейства Сибунит для процессов гидрирования растительных масел // Химия твердого топлива. – 2014. – Т. 6. – С. 33-39.
223. Savchenko V. I., Makaryan I. A. Palladium catalyst for the production of pure margarine: Catalyst and new non-filtration technology improve production and quality // Platinum Metals Review. – 1999. – Т. 43, № 2. – С. 74-82.
224. Tarrago-Trani M. T., Phillips K. M., Lemar L. E., Holden J. M. New and existing oils and fats used in products with reduced trans-fatty acid content // Journal of the American Dietetic Association. – 2006. – Т. 106, № 6. – С. 867-880.
225. Di Cosimo R., Mc Auliffe J., Poulouse A. J., Bohlmann G. Industrial use of immobilized enzymes // Chemical Society Reviews. – 2013. – Т. 42, № 15. – С. 6437-6474.
226. Osório N. M., Da Fonseca M. M. R., Ferreira-Dias S. Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2006. – Т. 108, № 7. – С. 545-553.
227. Терещук Л. В., Старовойтова К. В. Использование ферментной переэтерификации в технологии производства заменителей молочного жира // Техника и технология пищевых производств. – 2019. – Т. 49, № 2. – С. 270-280.
228. Pacheco C., Palla C., Crapiste G. H., Carrín M. E. Optimization of reaction conditions in the enzymatic interesterification of soybean oil and fully hydrogenated soybean oil to produce plastic fats // JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2013. – Т. 90, № 3. – С. 391-400.
229. Zhang H., Xu X., Nilsson J., Mu H., Adler-Nissen J., Høy C. E. Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated *Thermomyces lanuginosa* lipase in a large-scale study // JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2001. – Т. 78, № 1. – С. 57-64.
230. Shankar Shetty U., Sunki Reddy Y. R., Khatoon S. Plastic fats from sal, mango and palm oil by lipase catalyzed interesterification // Journal of Food Science and Technology. – 2014. – Т. 51, № 2. – С. 315-321.
231. Самойлова Ю. В., Сорокина К. Н., Пармон В. Н. Перспективы применения ферментативной переэтерификации масел для получения модифицированных жиров // Катализ в промышленности. – 2016. – Т. 16, № 3. – С. 57-63.
232. Tecelão C., Silva J., Dubreucq E., Ribeiro M. H., Ferreira-Dias S. Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2010. – Т. 65, № 1-4. – С. 122-127.

233. Liu S. L., Dong X. Y., Wei F., Wang X., Lv X., Zhong J., Wu L., Quek S. Y., Chen H. Ultrasonic pretreatment in lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with high 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol content // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2015. – T. 23. – C. 100-108.
234. Sinisterra J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview // *Ultrasonics*. – 1992. – T. 30, № 3. – C. 180-185.
235. Geed S. R., Kureel M. K., Shukla A. K., Singh R. S., Rai B. N. Biodegradation of malathion and evaluation of kinetic parameters using three bacterial species // *Resource-Efficient Technologies*. – 2016. – T. 2. – C. S3-S11.
236. Beltrán F. J., González M., González J. F. Industrial wastewater advanced oxidation. Part 1. UV radiation in the presence and absence of hydrogen peroxide // *Water Research*. – 1997. – T. 31, № 10. – C. 2405-2414.
237. Acharya K. P., Shilpkar P., Shah M. C., Chellapandi P. Biodegradation of insecticide monocrotophos by *Bacillus subtilis* KPA-1, isolated from agriculture soils // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2015. – T. 175, № 4. – C. 1789-1804.
238. Pailan S., Gupta D., Apte S., Krishnamurthi S., Saha P. Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2015. – T. 103. – C. 191-195.
239. Khan S., Zaffar H., Irshad U., Ahmad R., Khan A. R., Shah M. M., Bilal M., Iqbal M., Naqvi T. Biodegradation of malathion by *Bacillus licheniformis* strain ML-1 // *Archives of Biological Sciences*. – 2016. – T. 68, № 1. – C. 51-59.
240. Mohamed Z. K., Ahmed M. A., Fetyan N. A., Elnagdy S. M. Isolation and molecular characterisation of malathion-degrading bacterial strains from waste water in Egypt // *Journal of Advanced Research*. – 2010. – T. 1, № 2. – C. 145-149.
241. Xie Z., Xu B., Ding J., Liu L., Zhang X., Li J., Huang Z. Heterologous expression and characterization of a malathion-hydrolyzing carboxylesterase from a thermophilic bacterium, *Alicyclobacillus tengchongensis* // *Biotechnology Letters*. – 2013. – T. 35, № 8. – C. 1283-1289.
242. Adhikari S., Chattopadhyay P., Ray L. Biosorption of malathion by immobilized cells of *Bacillus* sp. S14 // *Chemical Speciation and Bioavailability*. – 2010. – T. 22, № 4. – C. 271-276.
243. Diao J., Zhao G., Li Y., Huang J., Sun Y. Carboxylesterase from *Spodoptera litura*: immobilization and use for the degradation of pesticides // *Procedia Environmental Sciences*. – 2013. – T. 18. – C. 610-619.
244. Li Z., Su K., Ren J., Yang D., Cheng B., Kim C. K., Yao X. Direct catalytic conversion of glucose and cellulose // *Green Chemistry*. – 2018. – T. 20, № 4. – C. 863-872.

245. Pyo S. H., Glaser S. J., Rehnberg N., Hatti-Kaul R. Clean production of levulinic acid from fructose and glucose in salt water by heterogeneous catalytic dehydration // *ACS Omega*. – 2020. – T. 5, № 24. – C. 14275-14282.
246. Liu X., Liu Z., Zhang Q., Wu H., Wang R. Hydrothermal catalytic conversion of glucose into lactic acid with acidic MIL-101(Fe) // *Journal of Chemistry*. – 2020. – T. 2020. – C. 1341563.
247. Georgieva T. I., Ahring B. K. Evaluation of continuous ethanol fermentation of dilute-acid corn stover hydrolysate using thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – T. 77, № 1. – C. 61-68.
248. Kundu S., Ghose T. K., Mukhopadhyay S. N. Bioconversion of cellulose into ethanol by *Clostridium thermocellum*—product inhibition // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1983. – T. 25, № 4. – C. 1109-1126.
249. Joe Shaw A., Jenney Jr F. E., Adams M. W. W., Lynd L. R. End-product pathways in the xylose fermenting bacterium, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2008. – T. 42, № 6. – C. 453-458.
250. Almeida J. R. M., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2007. – T. 82, № 4. – C. 340-349.
251. Agbogbo F. K., Coward-Kelly G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis* // *Biotechnology Letters*. – 2008. – T. 30, № 9. – C. 1515-1524.
252. Castro R. C. A., Roberto I. C. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2014. – T. 172, № 3. – C. 1553-1564.
253. Ryabova O. B., Chmil O. M., Sibirny A. A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *FEMS Yeast Research*. – 2003. – T. 4, № 2 – C. 157-164.
254. Vasylyshyn R., Kurylenko O., Ruchala J. Shevchuk N., Kuliesiene N., Khroustalyova G., Rapoport A., Daugelavicius R., Dmytruk K., Sibirny A. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast // *Microbial Cell Factories*. – 2020. – T.19. – C. 96.
255. Nonklang S., Abdel-Banat B. M. A., Cha-aim K., Moonjai N., Hoshida H., Limtong S., Yamada M., Akada R. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – T. 74, № 24. – C. 7514-7521.

256. Camargo D., Gomes S. D., Sene L. Ethanol production from sunflower meal biomass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 // Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2014. – T. 37, № 11. – C. 2235-2242.
257. Nachaiwieng W., Lumyong S., Yoshioka K., Watanabe T., Khanongnuch C. Bioethanol production from rice husk under elevated temperature simultaneous saccharification and fermentation using *Kluyveromyces marxianus* CK8 // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2015. – T. 4, № 4. – C. 543-549.
258. Wang R., Li L., Zhang B., Gao X., Wang D., Hong J. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a xylose isomerase pathway // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2013. – T. 40, № 8. – C. 841-854.
259. Banat I. M., Nigam P., Marchant R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 1992. – T. 8, № 3. – C. 259-263.
260. Rodrussamee N., Lertwattanasakul N., Hirata K., Suprayogi, Limtong S., Kosaka T., Yamada M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – T. 90, № 4. – C. 1573-1586.
261. Limtong S., Sringiew C., Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* // Bioresource Technology. – 2007. – T. 98, № 17. – C. 3367-3374.
262. Malairuang K., Krajang M., Rotsattarat R., Chamsart S. Intensive multiple sequential batch simultaneous saccharification and cultivation of *Kluyveromyces marxianus* SS106 thermotolerant yeast strain for single-step ethanol fermentation from raw cassava starch // Processes. – 2020. – T. 8, № 8. – C. 898.
263. Suzuki T., Hoshino T., Matsushika A. High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains // Enzyme and Microbial Technology. – 2019. – T. 129. – C. 109359.
264. Singh A., Bedore S. R., Sharma N. K., Lee S. A., Eiteman M. A., Neidle E. L. Removal of aromatic inhibitors produced from lignocellulosic hydrolysates by *Acinetobacter baylyi* ADP1 with formation of ethanol by *Kluyveromyces marxianus* // Biotechnology for Biofuels. – 2019. – T. 12, № 1. – C. 91.
265. Prasetyo J., Naruse K., Kato T., Boonchird C., Harashima S., Park E. Y. Bioconversion of paper sludge to biofuel by simultaneous saccharification and fermentation using a cellulase of paper sludge origin and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14 // Biotechnology for Biofuels. – 2011. – T. 4. – C. 35.

266. Phong H. X., Klanrit P., Dung N. T. P., Yamada M., Thanonkeo P. Isolation and characterization of thermotolerant yeasts for the production of second-generation bioethanol // *Annals of Microbiology*. – 2019. – T. 69, № 7. – C. 765-776.
267. Rahman K. H. A., Ismail K. S. K., Najimudin N. Growth of thermotolerant *Pichia kudriavzevii* UniMAP 3-1 strain for ethanol production using xylose and glucose at different fermentation temperatures // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – T. 765. 2021. – C. 012107.
268. Wiatrowski M. K., Klein B. C., Davis R. W., Quiroz-Arita C., Tan E. C. D., Hunt R. W., Davis R. E. Techno-Economic Assessment for the Production of Algal Fuels and Value-Added Products: Opportunities for High-Protein Microalgae Conversion // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. – 2022. – T. 15. - №8.
269. Slegers P. M., Olivieri G., Breitmayer E., Sijtsma L., Eppink M.H.M., Wijffels R.H., Reith J.H. Design of Value Chains for Microalgal Biorefinery at Industrial Scale: Process Integration and Techno-Economic Analysis // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. - № 8. - C. 550758.
270. Branco-Vieira M., Mata T. M., Martins A. A., Freitas M. A. V., Caetano N. S. Economic analysis of microalgae biodiesel production in a small-scale facility // *Energy Reports*. – 2020. – T. 6. № 8. – C. 325-332.
271. Silva M. I.; Gonçalves A. L., Vilar V. J. P., Pires J. C. M. Experimental and techno-economic study on the use of microalgae for paper industry effluents remediation // *Sustainability*. – 2021. - № 13. – C. 1314.
272. Heo H. Y., Heo S., Lee J. H. Comparative Techno-Economic Analysis of Transesterification Technologies for Microalgal Biodiesel Production // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2019. – T. 58, № 40. – C. 18772–18779.
273. Nazifa R., Forruque A. S., Anjum B. I., Mofijur M., Sarfaraz K. Strategies to Produce Cost-Effective Third-Generation Biofuel From Microalgae // *Frontiers in Energy Research*. – 2021. – T. 9. – C. 749968.
274. Biernat K., Matuszewska A., Samson-Bręk I., Owczuk M. Biological Methods in Biodiesel Production and Their Environmental Impact // *Applied Sciences*. – 2021. – T. 11. – C. 10946.
275. Fukuda H., Kondo A., Noda H., Review. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2001. - № 92. C. 405–416.
276. Lisboa P., Rodrigues A. R., Martín J. L., Simões P., Barreiros S., Paiva A. Economic analysis of a plant for biodiesel production from waste cooking oil via enzymatic transesterification using supercritical carbon dioxide // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2014. – T. 85. - C. 31-40.
277. Копицын Д.С., Бескоровайный А.В., Альмяшева Н.Р., Котелев М.С., Новиков А.А. Сравнение биокатализаторов на основе ковалентно иммобилизованных липаз для

ферментативной переэтерификации масложировых смесей // Масложировая промышленность. – 2015. – № 1. – С. 31-35.

278. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Рудина Н.А., Мосеенков С.И., Кузнецов В.Л. Углерод-силикатные матрицы для приготовления гетерогенных биокатализаторов. синтез нановолокнистого углерода на катализаторе Ni/SiO₂ и исследование полученных адсорбентов для иммобилизации термостабильной липазы // Кинетика и катализ. – 2013. – Т. 54, № 6 – С. 792.

279. Юзбашева Е.Ю., Юзбашев Т.В., Лаптев И.А., Ларина А.С., Синеокий С.П. Генетическая конструкция для экспозиции белка на поверхности клеточной стенки дрожжей *Yarrowia lipolytica* // Патент RU 2451749 С1. 27.05.2012.

280. Копицын Д.С., Альмяшева Н.Р., Жигалова Л.В., Новиков А.А. Сравнение иммобилизованных клеток *Yarrowia lipolytica* и липазы *Candida antarctica* в процессе метанолиза триглицеридов жирных кислот // Теоретические и прикладные проблемы агропромышленного комплекса. – 2014. – № 4. – С. 3-5.

281. Миннебаев Л.Ф., Юдина А.В., Емышева Н.В., Вершинин С.С., Шахмаев Р.Н., Зорин В.В. Получение биодизельного топлива интерэтерификацией сурепного масла этилацетатом в присутствии Novozym 435 // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20, № 4. – С. 22-24.

282. Mohanty C., Das P.K., Purohit G.K., Pattanaik S., Palo S. Extraction of Glucose from Colocasia esculenta Starch: A Major Substrate for Ethanol Production // International Journal of Scientific Research in Biological Sciences. – 2021. Т.8, № 3. – С. 35-40.

283. Heo J. B., Lee Y. S., Chung C. H. Seagrass-based platform strategies for sustainable hydroxymethylfurfural (HMF) production: toward bio-based chemical products // Critical Reviews in Biotechnology. – 2021. – Т. 41, № 6. – С. 902-917.

284. Danner H., Braun R. Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass // Chemical Society Reviews. – 1999. – Т. 28. – С. 395-405.

285. Hoang, T. D., Nghiem, N. Recent developments and current status of commercial production of fuel ethanol // Fermentation. – 2021. – Т. 7. – С. 314.

286. Cornils, B., Lappe, P. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry – Germany, Weinheim, Wiley – VCH Verlag, 2010. – С. 287-304.

287. Chatterjee R., Millard C.S., Champion K., Clark D.P., Donnelly M.I. Mutation of the ptsG gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli* // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Т. 67, № 1. – С. 148-154.

288. 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. – Т. 16, № 1. – С. 74-83.

289. Zhang B., Zhan B., Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Т. 170. – С. 113791.
290. Slade R., Bauen A., Shah N. The greenhouse gas emissions performance of cellulosic ethanol supply chains in Europe // *Biotechnology for Biofuels*. – 2009. – Т. 2, № 1. – С. 15.
291. Direct catalytic conversion of glucose and cellulose // *Green Chemistry*. – 2018. – Т. 20. – С. 863-872.
292. 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. – Т. 10, № 3. – С. 562-574.
293. *Algal Culturing Techniques*. / Andersen R. A. – New York: Elsevier Academic Press, 2005. – 578 с.
294. Waterbury J. B., Stanier R. Y. Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments // *The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria* / Starr M. P. и др. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981. – С. 221-223.
295. Largeau C., Casadevall E., Berkloff C., Dhamelinourt P. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii* // *Phytochemistry*. – 1980. – Т. 19, № 6. – С. 1043-1051.
296. OECD. Guidelines for Testing of Chemicals Simulation Tests-Aerobic Sewage Treatment. Technical Report. – Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 1996. – 19-142 с.
297. 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.
298. Розанов А. С., Сорокина К. Н., Пельтек С. Е. Штамм бактерии *Escherichia coli* XL1-blue/pQS-G3, продуцент термостабильной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 // Патент РФ №RU2540873C1. 10.02.2015.
299. de Marco A., Deuerling E., Mogk A., Tomoyasu T., Bukau B. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli* // *BMC Biotechnology*. – 2007. – Т. 7. – С. 32.
300. 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. – Т. 12. – С. 368-376.
301. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling // *Bioinformatics*. – 2006. – Т. 22, № 2. – С. 195-201.

302. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures // *Journal of Applied Crystallography*. – 1993. – T. 26, № 2. – C. 283-291.
303. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society, 4th Ed. – Champaign: American Oil Chemists' Society, 1993.
304. Bancos I., Bida J. P., Tian D., Bundrick M., John K., Holte M. N., Her Y. F., Evans D., Saenz D. T., Poeschla E. M., Hook D., Georg G., Maher Iii L. J. High-throughput screening for growth inhibitors using a yeast model of familial paraganglioma // *PLoS ONE*. – 2013. – T. 8, № 2.
305. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – T. 227, № 5259. – C. 680-685.
306. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – T. 72, № 1. – C. 248-254.
307. Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E., Dörmann P., Weckwerth W., Gibon Y., Stitt M., Willmitzer L., Fernie A. R., Steinhauser D. GMD@CSB.DB: The Golm metabolome database // *Bioinformatics*. – 2005. – T. 21, № 8. – C. 1635-1638.
308. Collos Y., Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P. J. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures // *Journal of Applied Phycology*. – 1999. – T. 11, № 2. – C. 179-184.
309. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th Edition. / Clesceri L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D.: APHA American Public Health Association, 1998. – 1325 c.
310. Cogan E. B., Birrell G. B., Griffith O. H. A robotics-based automated assay for inorganic and organic phosphates // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – T. 271, № 1. – C. 29-35.
311. Lee S., Lee D. K. What is the proper way to apply the multiple comparison test? // *Korean Journal of Anesthesiology*. – 2018. – T. 71, № 5. – C. 353-360.
312. Pang Z., Chong J., Zhou G., De Lima Morais D. A., Chang L., Barrette M., Gauthier C., Jacques P. E., Li S., Xia J. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – T. 49, № W1. – C. W388-W396.
313. Piligaev A. V., Sorokina K. N., Bryanskaya A. V., Demidov E. A., Kukushkin R. G., Kolchanov N. A., Parmon V. N., Pel'tek S. E. Research on the biodiversity of Western Siberia microalgae for third-generation biofuel production processes // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. – 2013. – T. 3, № 6. – C. 487-492.
314. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. / Bischoff H. W. B. H. C. – Austin, Tex.: University of Texas, 1963.

315. Yuan X., Wang M., Park C., Sahu A. K., Ergas S. J. Microalgae growth using high-strength wastewater followed by anaerobic co-digestion // *Water Environment Research*. – 2012. – T. 84, № 5. – C. 396-404.
316. Tousova Z., Froment J., Oswald P., Slobodník J., Hilscherova K., Thomas K. V., Tollefsen K. E., Reid M., Langford K., Blaha L. Identification of algal growth inhibitors in treated waste water using effect-directed analysis based on non-target screening techniques // *Journal of Hazardous Materials*. – 2018. – T. 358. – C. 494-502.
317. Francisco É. C., Neves D. B., Jacob-Lopes E., Franco T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2010. – T. 85, № 3. – C. 395-403.
318. Vello V., Chu W. L., Lim P. E., Majid N. A., Phang S. M. Metabolomic profiles of tropical *Chlorella* species in response to physiological changes during nitrogen deprivation // *Journal of Applied Phycology*. – 2018. – T. 30, № 6. – C. 3131-3151.
319. Vello V., Umashankar S., Phang S. M., Chu W. L., Lim P. E., Nazia A. M., Liew K. E., Swarup S., Chew F. T. Metabolomic profiles of tropical *Chlorella* and *Parachlorella* species in response to physiological changes during exponential and stationary growth phase // *Algal Research*. – 2018. – T. 35. – C. 61-75.
320. Shi T. Q., Wang L. R., Zhang Z. X., Sun X. M., Huang H. Stresses as first-line tools for enhancing lipid and carotenoid production in microalgae // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. – T. 8. – C. 610.
321. Hena S., Abida N., Tabassum S. Screening of facultative strains of high lipid producing microalgae for treating surfactant mediated municipal wastewater // *RSC Advances*. – 2015. – T. 5, № 120. – C. 98805-98813.
322. Paliwal C., Mitra M., Bhayani K., Bharadwaj S. V. V., Ghosh T., Dubey S., Mishra S. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae // *Bioresource Technology*. – 2017. – T. 244. – C. 1216-1226.
323. Osundeko O., Dean A. P., Davies H., Pittman J. K. Acclimation of microalgae to wastewater environments involves increased oxidative stress tolerance activity // *Plant and Cell Physiology*. – 2014. – T. 55, № 10. – C. 1848-1857.
324. Qin L., Wang Z., Sun Y., Shu Q., Feng P., Zhu L., Xu J., Yuan Z. Microalgae consortia cultivation in dairy wastewater to improve the potential of nutrient removal and biodiesel feedstock production // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – T. 23, № 9. – C. 8379-8387.
325. Lv H., Xia F., Liu M., Cui X., Wahid F., Jia S. Metabolomic profiling of the astaxanthin accumulation process induced by high light in *Haematococcus pluvialis* // *Algal Research*. – 2016. – T. 20. – C. 35-43.

326. Lunn J. E. Evolution of sucrose synthesis // *Plant Physiology*. – 2002. – T. 128, № 4. – C. 1490-1500.
327. Scott S. A., Davey M. P., Dennis J. S., Horst I., Howe C. J., Lea-Smith D. J., Smith A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2010. – T. 21, № 3. – C. 277-286.
328. Williams S. P., Gillaspay G. E., Perera I. Y. Biosynthesis and possible functions of inositol pyrophosphates in plants // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – T. 6. – C. 67.
329. Sharma K. K., Schuhmann H., Schenk P. M. High lipid induction in microalgae for biodiesel production // *Energies*. – 2012. – T. 5, № 5. – C. 1532-1553.
330. Dunahay T. G., Jarvis E. E., Dais S. S., Roessler P. G. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1996. – T. 57, № 1. – C. 223.
331. Zhang L., Liu J. Enhanced fatty acid accumulation in *Isochrysis galbana* by inhibition of the mitochondrial alternative oxidase pathway under nitrogen deprivation // *Bioresource Technology*. – 2016. – T. 211. – C. 783-786.
332. Trentacoste E. M., Shrestha R. P., Smith S. R., Glé C., Hartmann A. C., Hildebrand M., Gerwick W. H. Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – T. 110, № 49. – C. 19748.
333. Zhu L. D., Li Z. H., Hiltunen E. strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock // *BioMed Research International*. – 2016. – T. 2016. – C. 8792548.
334. Li X., Příbyl P., Bišová K., Kawano S., Cepák V., Zachleder V., Čížková M., Brányiková I., Vítová M. The microalga *Parachlorella kessleri*-a novel highly efficient lipid producer // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2012. – T. 110, № 1. – C. 97-107.
335. Li Y., Han D., Sommerfeld M., Hu Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions // *Bioresource Technology*. – 2011. – T. 102, № 1. – C. 123-129.
336. Lefebvre O., Moletta R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review // *Water Research*. – 2006. – T. 40, № 20. – C. 3671-3682.
337. Salama el S., Kim H. C., Abou-Shanab R. A., Ji M. K., Oh Y. K., Kim S. H., Jeon B. H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress // *Bioprocess Biosystems Engineering*. – 2013. – T. 36, № 6. – C. 827-833.
338. 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. – T. 11. – C. 100548.

339. Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A. A., Ibraheem I. B. M. Microalgae and wastewater treatment // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2012. – T. 19, № 3. – C. 257-275.
340. Prestegard S. K., Knutsen G., Herfindal L. Adenosine content and growth in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): effect of salinity, light, temperature and nitrate // Diatom Research. – 2014. – T. 29, № 4. – C. 361-369.
341. Perrineau M. M., Zelzion E., Gross J., Price D. C., Boyd J., Bhattacharya D. Evolution of salt tolerance in a laboratory reared population of *Chlamydomonas reinhardtii* // Environ Microbiol. – 2014. – T. 16, № 6. – C. 1755-1766.
342. Verbruggen N., Hermans C. Proline accumulation in plants: a review // Amino Acids. – 2008. – T. 35, № 4. – C. 753-759.
343. Lizzul A. M., Hellier P., Purton S., Baganz F., Ladommatos N., Campos L. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases // Bioresource Technology. – 2014. – T. 151. – C. 12-18.
344. Kobayashi N., Noel E. A., Barnes A., Watson A., Rosenberg J. N., Erickson G., Oyler G. A. Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure // Bioresource Technology. – 2013. – T. 150. – C. 377-386.
345. Rosenberg J. N., Kobayashi N., Barnes A., Noel E. A., Betenbaugh M. J., Oyler G. A. Comparative analyses of three *Chlorella* species in response to light and sugar reveal distinctive lipid accumulation patterns in the microalga *C. sorokiniana* // PLoS ONE. – 2014. – T. 9, № 4. – C. e92460-e92460.
346. Wang Y., Chiu S. Y., Ho S. H., Liu Z., Hasunuma T., Chang T. T., Chang K. F., Chang J. S., Ren N. Q., Kondo A. Improving carbohydrate production of *Chlorella sorokiniana* NIES-2168 through semi-continuous process coupled with mixotrophic cultivation // Biotechnol Journal. – 2016. – T. 11, № 8. – C. 1072-1081.
347. Abou-Shanab R. A. I., Raghavulu S. V., Hassanin N. M. A., Kim S., Kim Y. J., Oh S. U., Oh Y.-K., Jeon B.-H. Manipulating nutrient composition of microalgal growth media to improve biomass yield and lipid content of *Micractinium pusillum* // African Journal of Biotechnology. – 2012. – T. 11, № 96. – C. 16270-16276.
348. Cheng D., Li D., Yuan Y., Zhou L., Li X., Wu T., Wang L., Zhao Q., Wei W., Sun Y. Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution // Biotechnology for Biofuels. – 2017. – T. 10, № 1. – C. 75.
349. Mandotra S. K., Kumar P., Suseela M. R., Nayaka S., Ramteke P. W. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities // Bioresource Technology. – 2016. – T. 201. – C. 222-229.

350. Mandotra S. K., Kumar P., Suseela M. R., Ramteke P. W. Fresh water green microalga *Scenedesmus abundans*: A potential feedstock for high quality biodiesel production // Bioresource Technology. – 2014. – Т. 156. – С. 42-47.
351. Duong V. T., Ahmed F., Thomas-Hall S. R., Quigley S., Nowak E., Schenk P. M. High protein- and high lipid-producing microalgae from northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2015. – Т. 3, С. 53.
352. Ji M. K., Yun H. S., Hwang J. H., Salama E. S., Jeon B. H., Choi J. Effect of flue gas (CO₂) on the growth, carbohydrate and fatty acid composition of a green microalga *Scenedesmus obliquus* for biofuel production // Environmental Technology. – 2017. – Т. 38, № 16. – С. 2085-2092.
353. Vishwakarma R., Dhar D. W., Saxena S. Influence of nutrient formulations on growth, lipid yield, carbon partitioning and biodiesel quality potential of *Botryococcus* sp. and *Chlorella* sp. // Environmental Science and Pollution Research. – 2019. – Т. 26, № 8. – С. 7589-7600.
354. Taleb A., Legrand J., Takache H., Taha S., Pruvost J. Investigation of lipid production by nitrogen-starved *Parachlorella kessleri* under continuous illumination and day/night cycles for biodiesel application // Journal of Applied Phycology. – 2018. – Т. 30, № 2. – С. 761-772.
355. Xue C., Gao K., Qian P., Dong J., Gao Z., Liu Q., Chen B., Deng X. Cultivation of *Chlorella sorokiniana* in a bubble-column bioreactor coupled with cooking cocoon wastewater treatment: effects of initial cell density and aeration rate // Water Science & Technology. – 2021. – Т. 83 11. – С. 2615-2628.
356. Abou-Shanab R. A. I., El-Dalatony M. M., El-Sheekh M. M., Ji M.-K., Salama E.-S., Kabra A. N., Jeon B.-H. Cultivation of a new microalga, *Micractinium reisseri*, in municipal wastewater for nutrient removal, biomass, lipid, and fatty acid production // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2014. – Т. 19, № 3. – С. 510-518.
357. Singh A. K., Farooqi H., Abdin M. Z., Kumar S. Bioremediation of municipal wastewater and biodiesel production by cultivation of *Parachlorella kessleri*-I // The Role of Microalgae in Wastewater Treatment / Sukla L. B. и др. – Singapore: Springer Singapore, 2019. – С. 15-28.
358. 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. 09.10.2014.
359. Hanifzadeh M., Garcia E. C., Viamajala S. Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: Role of Ca and Mg // Renewable Energy. – 2018. – Т. 127. – С. 989-997.
360. Srivastava G., Nishchal, Goud V. V. Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR_047) // Bioresource Technology. – 2017. – Т. 242. – С. 244-252.

361. Chen H., Zhang Y., He C., Wang Q. Ca^{2+} signal transduction related to neutral lipid synthesis in an oil-producing green alga *Chlorella* sp. C2 // Plant and Cell Physiology. – 2014. – T. 55, № 3. – C. 634-644.
362. Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances // Plant J. – 2008. – T. 54, № 4. – C. 621-639.
363. El-Sheekh M. M., El-Mohsnawy E., Mabrouk M. E. M., Zoheir W. F. Enhancement of biodiesel production from the green microalga *Micractinium reisseri* via optimization of cultivation regimes // Journal of Taibah University for Science. – 2020. – T. 14, № 1. – C. 437-444.
364. Ramanna L., Guldhe A., Rawat I., Bux F. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources // Bioresource Technology. – 2014. – T. 168. – C. 127-135.
365. Chia M. A., Lombardi A. T., Melão M. D. G. G., Parrish C. C. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxioophyceae, Chlorophyta) // European Journal of Phycology. – 2013. – T. 48, № 1. – C. 1-11.
366. Asadi P., Rad H. A., Qaderi F. Lipid and biodiesel production by cultivation isolated strain *Chlorella sorokiniana* pa.91 and *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater treatment plant effluents // Journal of Environmental Health Science and Engineering. – 2020. – T. 18, № 2. – C. 573-585.
367. Park K. C., Whitney C. G., Kozera C., O'Leary S. J., McGinn P. J. Seasonal isolation of microalgae from municipal wastewater for remediation and biofuel applications // Journal of Applied Microbiology. – 2015. – T. 119, № 1. – C. 76-87.
368. Sabeti M. B., Hejazi M. A., Karimi A. Enhanced removal of nitrate and phosphate from wastewater by *Chlorella vulgaris*: Multi-objective optimization and CFD simulation // Chinese Journal of Chemical Engineering. – 2019. – T. 27, № 3. – C. 639-648.
369. Sayadi M. H., Ahmadpour N., Fallahi Capoorchali M., Rezaei M. R. Removal of nitrate and phosphate from aqueous solutions by microalgae: An experimental study // Global Journal of Environmental Science and Management. – 2016. – T. 2, № 4. – C. 357-364.
370. Kim S., Lee Y., Hwang S.-J. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – T. 85. – C. 511-516.
371. Shen Y., Yuan W., Pei Z., Mao E. Culture of microalga *Botryococcus* in livestock wastewater // Transactions of the ASABE. – 2008. – T. 51, № 4. – C. 1395-1400.
372. O'Rourke R., Gaffney M., Murphy R. The effects of *Parachlorella kessleri* cultivation on brewery wastewater // Water Science & Technology. – 2016. – T. 73, № 6. – C. 1401-1408.

373. Figler A., B-Béres V., Dobronoki D., Márton K., Nagy S. A., Bácsi I. salt tolerance and desalination abilities of nine common green microalgae isolates // *Water*. – 2019. – T. 11, № 12. – C. 2527.
374. Liu Y., Yildiz I. The effect of salinity concentration on algal biomass production and nutrient removal from municipal wastewater by *Dunaliella salina* // *International Journal of Energy Research*. – 2018. – T. 42, № 9. – C. 2997-3006.
375. Bohutskyi P., Liu K., Nasr L. K., Byers N., Rosenberg J. N., Oyler G. A., Betenbaugh M. J., Bouwer E. J. Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2015. – T. 99, № 14. – C. 6139-6154.
376. Slegers P. M., Wijffels R. H., van Straten G., van Boxtel A. J. B. Design scenarios for flat panel photobioreactors // *Applied Energy*. – 2011. – T. 88, № 10. – C. 3342-3353.
377. Chia M. A., Lombardi A. T., Melão Mda G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media // *Anais da Academia Brasileira de Ciências* – 2013. – T. 85, № 4. – C. 1427-1438.
378. Engin I. K., Cekmecelioglu D., Yücel A. M., Oktem H. A. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production // *Bioresource Technology*. – 2018. – T. 251. – C. 128-134.
379. Liang C., Zhai Y., Xu D., Ye N., Zhang X., Wang Y., Zhang W., Yu J. Correlation between lipid and carotenoid synthesis and photosynthetic capacity in *Haematococcus pluvialis* grown under high light and nitrogen deprivation stress // *Grasas y Aceites*. – 2015. – T. 66, № 2. – C. e077.
380. Li X., Příbyl P., Bišová K., Kawano S., Cepák V., Zachleder V., Čížková M., Brányíková I., Vítová M. The microalga *Parachlorella kessleri* - a novel highly efficient lipid producer // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2013. – T. 110, № 1. – C. 97-107.
381. Gao Y., Feng J., Lv J., Liu Q., Nan F., Liu X., Xie S. Physiological changes of *Parachlorella kessleri* TY02 in lipid accumulation under nitrogen stress // *International journal of environmental research and public health*. – 2019. – T. 16, № 7. – C. 1188.
382. Pikoli M. R., Sari A. F., Solihat N. A., Permana A. H. Characteristics of tropical freshwater microalgae *Micractinium conductrix*, *Monoraphidium* sp. and *Choricystis parasitica*, and their potency as biodiesel feedstock // *Heliyon*. – 2019. – T. 5, № 12. – C. e02922.
383. 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. – T. 8, № 51. – C. 18947-18956.

384. Juárez A. B., Velez C. G., Iniguez A. R., Martínez D. E., Rodríguez M. C., Vigna M. S., del Carmen Ríos de Molina M. A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina // *Phycologia*. – 2011. – T. 50, № 4. – C. 413-421.
385. Ibrahim N. E., Ma K. Industrial Applications of Thermostable Enzymes from Extremophilic Microorganisms // *Current Biochemical Engineering*. – 2017. – T. 4, № 2. – C. 75-98.
386. Lu Y., Lu F., Wang X., Bie X., Sun H., Wuyundalai, Lu Z. Identification of bacteria producing a thermophilic lipase with positional non-specificity and characterization of the lipase // *Annals of Microbiology*. – 2009. – T. 59, № 3. – C. 565-571.
387. Salameh M. d. A., Wiegel J. Purification and characterization of two highly thermophilic alkaline lipases from *Thermosyntropha lipolytica* // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – T. 73, № 23. – C. 7725-7731.
388. Kumar A., Dhar K., Kanwar S. S., Arora P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications // *Biological Procedures Online*. – 2016. – T. 18, № 1. – C. 2.
389. Gladden J. M., Park J. I., Bergmann J., Reyes-Ortiz V., D'haeseleer P., Quirino B. F., Sale K. L., Simmons B. A., Singer S. W. Discovery and characterization of ionic liquid-tolerant thermophilic cellulases from a switchgrass-adapted microbial community // *Biotechnology for Biofuels*. – 2014. – T. 7, № 1. – C. 15.
390. Ben Bacha A., Moubayed N. M., Abid I. Thermostable, alkaline and detergent-tolerant lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus stearothermophilus* // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. – 2015. – T. 52, № 2. – C. 179-188.
391. Liu W., Li M., Yan Y. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0–1 and used for biodiesel production // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 15711.
392. Saïda F., Uzan M., Odaert B., Bontems F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools // *Curr Protein Pept Sci*. – 2006. – T. 7, № 1. – C. 47-56.
393. de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli* // *Microbial Cell Factories*. – 2009. – T. 8, № 1. – C. 26.
394. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y. I., Abraham N., Li X.-Z., Zhou T. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – T. 9. – C. 630551.
395. Ferrer M., Chernikova T. N., Timmis K. N., Golyshin P. N. Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* strain // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – T. 70, № 8. – C. 4499-4504.

396. LaVallie E. R., DiBlasio E. A., Kovacic S., Grant K. L., Schendel P. F., McCoy J. M. A Thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm // *Bio/Technology*. – 1993. – T. 11, № 2. – C. 187-193.
397. Arpigny J. L., Jaeger K. E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties // *Biochemical Journal*. – 1999. – T. 343, № 1. – C. 177-183.
398. Hitch T. C. A., Clavel T. A proposed update for the classification and description of bacterial lipolytic enzymes // *Peer Journal*. – 2019. – T. 2019, № 7. – C. e7249.
399. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies // *Protein Expression and Purification*. – 2003. – T. 28, № 1. – C. 1-8.
400. 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.
401. Rao L., Xue Y., Zheng Y., Lu J. R., Ma Y. A novel alkaliphilic bacillus esterase belongs to the 13th bacterial lipolytic enzyme family // *PLoS ONE*. – 2013. – T. 8, № 4. – C. e60645.
402. Brod F. C. A., Vernal J., Bertoldo J. B., Terenzi H., Arisi A. C. M. Cloning, expression, purification, and characterization of a novel esterase from *Lactobacillus plantarum* // *Molecular Biotechnology*. – 2010. – T. 44, № 3. – C. 242-249.
403. Ateşlier Z. B. B., Metin K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – T. 38, № 5. – C. 628-635.
404. Mogk A., Mayer M. P., Deuerling E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology // *ChemBioChem*. – 2002. – T. 3, № 9. – C. 807-814.
405. Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rüdiger S., Röder D., Langen H., Bukau B. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB // *EMBO Journal*. – 1999. – T. 18, № 24. – C. 6934-6949.
406. Sørensen H. P., Mortensen K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* // *Microbial Cell Factories*. – 2005. – T. 4, № 1. – C. 1.
407. Shuo-Shuo C., Xue-Zheng L., Ji-Hong S. Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948 // *Protein Expression and Purification*. – 2011. – T. 77, № 2. – C. 166-172.
408. Liu L., Yang H., Shin H. D., Chen R. R., Li J., Du G., Chen J. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives // *Bioengineered*. – 2013. – T. 4, № 4. – C. 212-223.
409. Lee S., Kim S. M., Lee R. T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance // *Antioxidants and Redox Signaling*. – 2013. – T. 18, № 10. – C. 1165-1207.

410. Su E., Xu J., Wu X. High-level soluble expression of *Serratia marcescens* H30 lipase in *Escherichia coli* // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2015. – Т. 62, № 1. – С. 79-86.
411. Alquéres S. M. C., Branco R. V., Freire D. M. G., Alves T. L. M., Martins O. B., Almeida R. V. Characterization of the recombinant thermostable lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus*: effects of thioredoxin fusion tag and Triton X-100 // Enzyme research. – 2011. – Т. 2011. – С. 316939-316939.
412. Cowan D. A., Fernandez-Lafuente R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization // Enzyme and Microbial Technology. – 2011. – Т. 49, № 4. – С. 326-346.
413. Новиков А. А., Котелев М. С., Семенов А. П., Гущин 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. 10.09.2014.
414. Abol Fotouh D. M., Bayoumi R. A., Hassan M. A. Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and application in leather industry // Enzyme research. – 2016. – Т. 2016. – С. 9034364.
415. Akshita M., Nitin Kumar S., Reena G. Purification and characterization of lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. // Current Biotechnology. – 2016. – Т. 5, № 1. – С. 81-89.
416. Bhardwaj K. K., Saun N. K., Gupta R. Immobilization of lipase from *Geobacillus* sp. and its application in synthesis of methyl salicylate // Journal of Oleo Science. – 2017. – Т. 66, № 4. – С. 391-398.
417. Sánchez-Otero M. G., Valerio-Alfaro G., García-Galindo H. S., Oliart-Ros R. M. Immobilization in the presence of Triton X-100: modifications in activity and thermostability of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 lipase // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2008. – Т. 35, № 12. – С. 1687-1693.
418. 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. – Т. 15, № 6. – С. 90-96.
419. Yang G., Wu J., Xu G., Yang L. Comparative study of properties of immobilized lipase onto glutaraldehyde-activated amino-silica gel via different methods // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – Т. 78, № 2. – С. 351-356.
420. Dehghani M. H., Niasar Z. S., Mehrnia M. R., Shayeghi M., Al-Ghouti M. A., Heibati B., McKay G., Yetilmezsoy K. Optimizing the removal of organophosphorus pesticide malathion from water using multi-walled carbon nanotubes // Chemical Engineering Journal. – 2017. – Т. 310. – С. 22-32.
421. Sheldon R. A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts // Organic Process Research and Development. – 2011. – Т. 15, № 1. – С. 213-223.

422. Mahmud S. S., Yusof F., Jami M. S., Khanahmadi S. Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2016. – T. 3, № 1.
423. Khanahmadi S., Yusof F., Amid A., Mahmud S. S., Mahat M. K. Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk // *Journal of Biotechnology*. – 2015. – T. 202. – C. 153-161.
424. Gupta R., Beg Q., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – T. 59, № 1. – C. 15-32.
445. Han J. Y., Kim H. K. Transesterification using the cross-linked enzyme aggregate of *Photobacterium lipolyticum* Lipase M37 // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – T. 21, № 11. – C. 1159-1165.
426. Dong T., Zhao L., Huang Y., Tan X. Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive // *Bioresource Technology*. – 2010. – T. 101, № 16. – C. 6569-6571.
427. Moradi G. R., Arjmandzadeh E., Ghanei R. Single-Stage Biodiesel Production from Used Soybean Oil by using a Sulfuric-Acid Catalyst // *Energy Technology*. – 2013. – T. 1, № 4. – C. 226-232.
428. Ehsan M., Chowdhury M. T. H. Production of biodiesel using alkaline based catalysts from waste cooking oil: A case study // *Procedia Engineering*. – T. 105. – 2015. – C. 638-645.
429. Vasić K., Podrepšek G. H., Knez Ž., Leitgeb M. Biodiesel production using solid acid catalysts based on metal oxides // *Catalysts*. – 2020. – T. 10, № 2. – C. 237.
430. Sheldon R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – T. 92, № 3. – C. 467-477.
431. Teo C. L., Jamaluddin H., Zain N. A. M., Idris A. Biodiesel production via lipase catalysed transesterification of microalgae lipids from *Tetraselmis* sp. // *Renewable Energy*. – 2014. – T. 68. – C. 1-5.
432. Surendhiran D., Sirajunnisa A. R., Vijay M. An alternative method for production of microalgal biodiesel using novel *Bacillus* lipase // *3 Biotech*. – 2015. – T. 5, № 5. – C. 715-725.
433. Chen J. Z., Wang S., Zhou B., Dai L., Liu D., Du W. A robust process for lipase-mediated biodiesel production from microalgae lipid // *RSC Advances*. – 2016. – T. 6, № 54. – C. 48515-48522.
434. Ostojčić M., Budžaki S., Flanjak I., Bilić Rajs B., Barišić I., Tran N. N., Hessel V., Strelec I. Production of biodiesel by *Burkholderia cepacia* lipase as a function of process parameters // *Biotechnology Progress*. – 2021. – T. 37, № 2. – C. e3109.
435. Zhao X., Qi F., Yuan C., Du W., Liu D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: enzyme immobilization, process simulation and optimization // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2015. – T. 44. – C. 182-197.

436. Sendzikiene E., Makareviciene V., Gumbyte M. Reactive extraction and fermental transesterification of rapeseed oil with butanol in diesel fuel media // *Fuel Processing Technology*. – 2015. – Т. 138. – С. 758-764.
437. Zeikus J. G., Jain M. K., Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1999. – Т. 51, № 5. – С. 545-552.
438. Плаксин Г. В., Бакланова О. Н., Лавренков А. В., Лихолобов В. А. Углеродные материалы семейства сибунит и некоторые методы регулирования их свойств // *Химия твердого топлива*. – 2014. № 6. – С. 26-32.
439. Thoma C., Konnerth J., Sailer-Kronlachner W., Rosenau T., Potthast A., Solt P., van Herwijnen H. W. G. Hydroxymethylfurfural and its derivatives: potential key reactants in adhesives // *ChemSusChem*. – 2020. – Т. 13, № 20. – С. 5408-5422.
440. Kumar S., Dheeran P., P. Singh S., M. Mishra I., K. Adhikari D. Cooling system economy in ethanol production using thermotolerant yeast *Kluyveromyces* Sp. IPE453 // *American Journal of Microbiological Research*. – 2013. – Т. 1, № 3. – С. 39-44.
441. Rajesh Banu J., Preethi, Kavitha S., Gunasekaran M., Kumar G. Microalgae based biorefinery promoting circular bioeconomy-techno economic and life-cycle analysis // *Bioresource Technology*. – 2020. – Т. 302. – С. 122822.
442. Zhao Y., Qiao T., Han B., Dong X., Geng S., Ning D., Ma T., Yu X. Simultaneous enhancement of biomass and lipid production of *Monoraphidium* sp. QLZ-3 in a photobioreactor by using walnut shell extracts // *Energy Conversion and Management*. – 2020. – Т. 204. – С. 112326.
444. Lam M. K., Lee K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward // *Biotechnology Advances*. – 2012. – Т. 30, № 3. – С. 673-690.
445. Berthod A., Ruiz-Ángel M. J., Carda-Broch S. Recent advances on ionic liquid uses in separation techniques // *Journal of Chromatography A*. – 2018. – Т. 1559. – С. 2-16.
446. Miazek K., Kratky L., Sulc R., Jirout T., Aguedo M., Richel A., Goffin D. Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: A review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Т. 18, № 7. – С. 1429.
447. Sun C. H., Fu Q., Liao Q., Xia A., Huang Y., Zhu X., Reungsang A., Chang H. X. Life-cycle assessment of biofuel production from microalgae via various bioenergy conversion systems // *Energy*. – 2019. – Т. 171. – С. 1033-1045.
448. Bauer G., Lima S., Chenevard J., Sugnaux M., Fischer F. Biodiesel via *in situ* wet microalgae biotransformation: zwitter-type ionic liquid supported extraction and transesterification // *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. – 2017. – Т. 5, № 2. – С. 1931-1937.

449. Cao H., Zhang Z., Wu X., Miao X. Direct biodiesel production from wet microalgae biomass of *Chlorella pyrenoidosa* through *in situ* transesterification // BioMed Research International. – 2013. – T. 2013. – C. 930686.
450. Maurya R., Chokshi K., Ghosh T., Trivedi K., Pancha I., Kubavat D., Mishra S., Ghosh A. Lipid extracted microalgal biomass residue as a fertilizer substitute for *Zea mays* // Frontiers in Plant Science. – 2016. – T. 6. – C. 1266.
451. Phwan C. K., Chew K. W., Sebayang A. H., Ong H. C., Ling T. C., Malek M. A., Ho Y. C., Show P. L. Effects of acids pre-treatment on the microbial fermentation process for bioethanol production from microalgae // Biotechnology for Biofuels. – 2019. – T. 12. – C. 191.
452. Harun R., Danquah M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production // Chemical Engineering Journal. – 2011. – T. 168, № 3. – C. 1079-1084.
453. Templeton D. W., Quinn M., Van Wyche S., Hyman D., Laurens L. M. L. Separation and quantification of microalgal carbohydrates // Journal of Chromatography A. – 2012. – T. 1270. – C. 225-234.
454. Hossain M. N. B., Basu J. K., Mamun M. The production of ethanol from micro-algae *Spirulina* // Procedia Engineering. – 2015. – T. 105. – C. 733-738.
455. Lee J., Sim S. J., Bott M., Um Y., Oh M. K., Woo H. M. Succinate production from CO₂-grown microalgal biomass as carbon source using engineered *Corynebacterium glutamicum* through consolidated bioprocessing // Scientific Reports. – 2014. – T. 4. – C. 5819.
456. Nguyen C. M., Kim J.-S., Hwang H. J., Park M. S., Choi G. J., Choi Y. H., Jang K. S., Kim J.-C. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli // Bioresource Technology. – 2012. – T. 110. – C. 552-559.
457. Saxena R. K., Saran S., Isar J., Kaushik R. Production and applications of succinic acid // Current Developments in Biotechnology and Bioengineering / Pandey A. и др. Elsevier, 2017. – C. 601-630.
458. Gunnarsson I. B., Karakashev D., Angelidaki I. Succinic acid production by fermentation of *Jerusalem artichoke* tuber hydrolysate with *Actinobacillus succinogenes* 130Z // Industrial Crops and Products. – 2014. – T. 62. – C. 125-129.
459. Kim D. Y., Yim S. C., Lee P. C., Lee W. G., Lee S. Y., Chang H. N. Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E // Enzyme and Microbial Technology. – 2004. – T. 35, № 6-7. – C. 648-653.
460. Zheng Z., Chen T., Zhao M., Wang Z., Zhao X. Engineering *Escherichia coli* for succinate production from hemicellulose via consolidated bioprocessing // Microbial Cell Factories. – 2012. – T. 11. – C. 37.

461. Ito Y., Hirasawa T., Shimizu H. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve succinic acid production based on metabolic profiling // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2014. – T. 78, № 1. – C. 151-159.
462. Knoshaug E. P., Mohagheghi A., Nagle N. J., Stickel J. J., Dong T., Karp E. M., Kruger J. S., Brandner D. G., Manker L. P., Rorrer N. A., Hyman D. A., Christensen E. D., Pienkos P. T. Demonstration of parallel algal processing: Production of renewable diesel blendstock and a high-value chemical intermediate // Green Chemistry. – 2018. – T. 20, № 2. – C. 457-468.
- 463 453. Maslova O., Stepanov N., Senko O., Efremenko E. Production of various organic acids from different renewable sources by immobilized cells in the regimes of separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SFF) // Bioresource Technology. – 2019. – T. 272. – C. 1-9.
464. Kim Y. H., Choi Y. K., Park J., Lee S., Yang Y. H., Kim H. J., Park T. J., Hwan Kim Y., Lee S. H. Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass // Bioresource Technology. – 2012. – T. 109. – C. 312-315.
465. Pan J., Muppaneni T., Sun Y., Reddy H. K., Fu J., Lu X., Deng S. Microwave-assisted extraction of lipids from microalgae using an ionic liquid solvent [BMIM][HSO₄] // Fuel. – 2016. – T. 178. – C. 49-55.
466. Choi S. A., Oh Y. K., Jeong M. J., Kim S. W., Lee J. S., Park J. Y. Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris* // Renewable Energy. – 2014. – T. 65. – C. 169-174.
467. Young G., Nippen F., Titterbrandt S., Cooney M. J. Direct transesterification of biomass using an ionic liquid co-solvent system // Biofuels. – 2011. – T. 2, № 3. – C. 261-266.
468. Santana H., Cereijo C. R., Teles V. C., Nascimento R. C., Fernandes M. S., Brunale P., Campanha R. C., Soares I. P., Silva F. C. P., Sabaini P. S., Siqueira F. G., Brasil B. S. A. F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization // Bioresource Technology. – 2017. – T. 228. – C. 133-140.
469. 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. – T. 317. – C. 124026.
470. Ashokkumar V., Salam Z., Tiwari O. N., Chinnasamy S., Mohammed S., Ani F. N. An integrated approach for biodiesel and bioethanol production from *Scenedesmus bijugatus* cultivated in a vertical tubular photobioreactor // Energy Conversion and Management. – 2015. – T. 101. – C. 778-786.
471. Salvachúa D., Mohagheghi A., Smith H., Bradfield M. F. A., Nicol W., Black B. A., Biddy M. J., Dowe N., Beckham G. T. Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation // Biotechnology for Biofuels. – 2016. – T. 9, № 1. – C. 28.

472. Almqvist H., Pateraki C., Alexandri M., Koutinas A., Lidén G. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from batch fermentation of mixed sugars // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2016. – T. 43, № 8. – C. 1117-1130.
473. 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.
474. Tran D. T., Yeh K. L., Chen C. L., Chang J. S. Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase // Bioresource Technology. – 2012. – T. 108. – C. 119-127.
475. Li Q., Yan Y. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase // Applied Energy. – 2010. – T. 87, № 10. – C. 3148-3154.
476. Calero J., Verdugo C., Luna D., Sancho E. D., Luna C., Posadillo A., Bautista F. M., Romero A. A. Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation // New Biotechnology. – 2014. – T. 31, № 6. – C. 596-601.
477. Navarro López E., Robles Medina A., González Moreno P. A., Esteban Cerdán L., Martín Valverde L., Molina Grima E. Biodiesel production from *Nannochloropsis gaditana* lipids through transesterification catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase // Bioresource Technology. – 2016. – T. 203. – C. 236-244.
478. Martins L. B., Soares J., da Silveira W. B., Sousa R. C. S., Martins M. A. Dilute sulfuric acid hydrolysis of *Chlorella vulgaris* biomass improves the multistage liquid-liquid extraction of lipids // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2020.10.1007/s13399-020-00661-w.
479. D'Oca M. G. M., Viêgas C. V., Lemões J. S., Miyasaki E. K., Morón-Villarreyes J. A., Primel E. G., Abreu P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa* // Biomass and Bioenergy. – 2011. – T. 35, № 4. – C. 1533-1538.
480. Wang Y., Liu J., Gerken H., Zhang C., Hu Q., Li Y. Highly-efficient enzymatic conversion of crude algal oils into biodiesel // Bioresource Technology. – 2014. – T. 172. – C. 143-149.
481. Xiong W., Li X., Xiang J., Wu Q. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2008. – T. 78, № 1. – C. 29-36.
482. Nie K., Xie F., Wang F., Tan T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2006. – T. 43, № 1-4. – C. 142-147.

483. Lai J. Q., Hu Z. L., Sheldon R. A., Yang Z. Catalytic performance of cross-linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production // *Process Biochemistry*. – 2012. – Т. 47, № 12. – С. 2058-2063.
484. Thangaraj B., Solomon P. J., Muniyandi B., Ranganathan S., Lin L. Catalysis in biodiesel production—a review // *Clean Energy*. – 2019. – Т. 3, № 1. – С. 2-23.
485. Karmee S. K., Patria R. D., Lin C. S. K. Techno-economic evaluation of biodiesel production from waste cooking oil—a case study of Hong Kong // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Т. 16, № 3. – С. 4362-4371.
486. Guettler M. V., Mahendra K. J., Soni B. K. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. Patent US5504004A. 02.04.1996.
487. Jeong G. T., Kim S. K. Thermochemical conversion of defatted microalgae *Scenedesmus obliquus* into levulinic and formic acids // *Fuel*. – 2021. – Т. 283. – С. 118907.
488. Gholami A., Pourfayaz F., Maleki A. Techno-economic assessment of biodiesel production from canola oil through ultrasonic cavitation // *Energy Reports*. – 2021. – Т. 7. – С. 266-277.
489. Otero C., López-Hernandez A., García H. S., Hernández-Martín E., Hill Jr C. G. Continuous enzymatic transesterification of sesame oil and a fully hydrogenated fat: Effects of reaction conditions on product characteristics // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2006. – Т. 94, № 5. – С. 877-887.
490. Colla L. M., Ficanha A. M. M., Rizzardi J., Bertolin T. E., Reinehr C. O., Costa J. A. V. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation // *BioMed Research International*. – 2015. – Т. 2015. – С. 725959.
491. Самойлова Ю. В., Пилигаев А. В., Сорокина К. Н., Пармон В.Н. Применение иммобилизированной рекомбинантной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* в реакции переэтерификации подсолнечного и гидрированного соевого масла // *Катализ в промышленности*. – 2016. № 5. – С. 66-74.
492. Neff W. E., El-Agaimy M. A., Mounts T. L. Oxidative stability of blends and interesterified blends of soybean oil and palm olein // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1994. – Т. 71, № 10. – С. 1111-1116.
493. Sellami M., Ghamgui H., Frikha F., Gargouri Y., Miled N. Enzymatic transesterification of palm stearin and olein blends to produce zero-trans margarine fat // *BMC Biotechnology*. – 2012. – Т. 12. – С. 48.
494. Xie W., Huang M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe₃O₄ nanocomposite: characterization and application for biodiesel production // *Energy Conversion and Management*. – 2018. – Т. 159. – С. 42-53.

495. Kim S. H., Kim S. J., Park S., Kim H. K. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – T. 85-86. – C. 10-16.
496. Winayanuwattikun P., Piriyanananon K., Wongsathonkittikun P., Charoenpanich J. Immobilization of a thermophilic solvent-stable lipase from *Acinetobacter baylyi* and its potential for use in biodiesel production // ScienceAsia. – 2014. – T. 40, № 5. – C. 327-334.
497. Li K., Fan Y., He Y., Zeng L., Han X., Yan Y. *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis // Scientific Reports. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 16473.
498. Rodrigues J., Canet A., Rivera I., Osório N. M., Sandoval G., Valero F., Ferreira-Dias S. Biodiesel production from crude Jatropha oil catalyzed by non-commercial immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* and *Carica papaya* lipases // Bioresource Technology. – 2016. – T. 213. – C. 88-95.
499. Santaraite M., Sendzikiene E., Makareviciene V., Kazancev K. Biodiesel production by lipase-catalyzed *in situ* transesterification of rapeseed oil containing a high free fatty acid content with ethanol in diesel fuel media // Energies. – 2020. – T. 13, № 10. – C. 2588.
500. Xu Y., Du W., Zeng J., Liu D. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using Lipozyme TL IM in a solvent-free medium // Biocatalysis and Biotransformation. – 2004. – T. 22, № 1. – C. 45-48.
501. Nouredini H., Gao X., Philkana R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil // Bioresource Technology. – 2005. – T. 96, № 7. – C. 769-777.
502. Zhang H., Xu X., Mu H., Nilsson J., Adler-Nissen J., Høy C. E. Lipozyme IM-catalyzed interesterification for the production of margarine fats in a 1 kg scale stirred tank reactor // Starch/Staerke. – 2000. – T. 52, № 6-7. – C. 221-228.
503. Lai O. M., Ghazali H. M., Chong C. L. Effect of enzymatic transesterification on the melting points of palm stearin-sunflower oil mixtures // JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1998. – T. 75, № 7. – C. 881-886.
504. Neeharika T. S. V. R., Rallabandi R., Ragini Y., Kaki S. S., Rani K. N. P., Prasad R. B. N. Lipase catalyzed interesterification of rice bran oil with hydrogenated cottonseed oil to produce trans free fat // Journal of Food Science and Technology. – 2015. – T. 52, № 8. – C. 4905-4914.
505. Deutschmann R., Dekker R. F. H. From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research // Biotechnology Advances. – 2012. – T. 30, № 6. – C. 1627-1640.
506. Uçkun Kiran E., Trzcinski A. P., Liu Y. Enhancing the hydrolysis and methane production potential of mixed food waste by an effective enzymatic pretreatment // Bioresource Technology. – 2015. – T. 183. – C. 47-52.
507. Galbe M., Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – T. 59, № 6. – C. 618-628.

508. Соловьева И. В., Окунев О. Н., Вельков В. В., Кошелев А. В., Бубнова Т. В., Кондратьева А. А., Скомаровский А. А., Сеницын А. П. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* - суперпродуцентов целлюлаз и ксиланаз // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 2. – С. 172-178.
509. Thankappan S., Kandasamy S., Joshi B., Sorokina K. N., Taran O. P., Uthandi S. Bioprospecting thermophilic glycosyl hydrolases, from hot springs of Himachal Pradesh, for biomass valorization // AMB Express. – 2018. – Т. 8, № 1. – С. 168.
510. Pang J., Wang A., Zheng M., Zhang T. Hydrolysis of cellulose into glucose over carbons sulfonated at elevated temperatures // Chemical Communications. – 2010. – Т. 46, № 37. – С. 6935-6937.
511. Громов Н. В., Таран О. П., Яценко Д. А., Аюпов А. Б., Лоппине-Серани А., Амони С., Агабеков В. Е. Разработка сульфированных катализаторов на основе графитоподобного углеродного материала сибунит для гидролиза целлюлозы // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Химия. – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 87-99.
512. Kawamoto H., Saito S., Hatanaka W., Saka S. Catalytic pyrolysis of cellulose in sulfolane with some acidic catalysts // Journal of Wood Science. – 2007. – Т. 53, № 2. – С. 127-133.
513. Сорокина К. Н., Таран О. П., Медведева Т. Б., Пармон В. Н. Способ получения 5-гидроксиметилфурфурола и этанола из целлюлозы // Патент РФ № RU2636004C1. 17.11.2017.
514. Wang J., Ren J., Liu X., Lu G., Wang Y. High yield production and purification of 5-hydroxymethylfurfural // AIChE Journal. – 2013. – Т. 59, № 7. – С. 2558-2566.
515. Jönsson L. J., Alriksson B., Nilvebrant N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification // Biotechnology for Biofuels. – 2013. – Т. 6, № 1. – С. 16.
516. Ha S. J., Galazka J. M., Kim S. R., Choi J. H., Yang X., Seo J. H., Glass N. L., Cate J. H., Jin Y. S. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Т. 108, № 2. – С. 504-509.
517. Birgen C., Dürre P., Preisig H. A., Wentzel A. Butanol production from lignocellulosic biomass: revisiting fermentation performance indicators with exploratory data analysis // Biotechnology for Biofuels. – 2019. – Т. 12, № 1. – С. 167.
518. Yu X., Zheng Y., Dorgan K. M., Chen S. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid // Bioresource Technology. – 2011. – Т. 102, № 10. – С. 6134-6140.
519. Akhtar J., Idris A., Abd. Aziz R. Recent advances in production of succinic acid from lignocellulosic biomass // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Т. 98, № 3. – С. 987-1000.

520. Abdel-Rahman M. A., Tashiro Y., Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits // *Journal of Biotechnology*. – 2011. – T. 156, № 4. – С. 286-301.
521. Gírio F. M., Fonseca C., Carneiro F., Duarte L. C., Marques S., Bogel-Lukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review // *Bioresource Technology*. – 2010. – T. 101, № 13. – С. 4775-4800.
522. Bai F. W., Anderson W. A., Moo-Young M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks // *Biotechnology Advances*. – 2008. – T. 26, № 1. – С. 89-105.
523. Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2003. – T. 63, № 3. – С. 258-266.
524. Pasha C., Rao L. V. Thermotolerant Yeasts for Bioethanol Production Using Lignocellulosic Substrates // *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* / Satyanarayana T., Kunze G. – Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. – С. 551-588.
525. Saha B., Abu-Omar M. M. Advances in 5-hydroxymethylfurfural production from biomass in biphasic solvents // *Green Chemistry*. – 2014. – T. 16, № 1. – С. 24-38.
526. Saito H., Posas F. Response to Hyperosmotic Stress // *Genetics*. – 2012. – T. 192, № 2. – С. 289.
527. Ariyanti D., Hadiyanto H. Ethanol production from whey by *Kluyveromyces marxianus* in batch fermentation system: kinetics parameters estimation // *Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis*. – 2013. – T. 7, № 3. – С. 179-184.
528. Dmytruk K. V., Sibirny A. A. Metabolic engineering of the yeast *Hansenula polymorpha* for the construction of efficient ethanol producers // *Cytology and Genetics*. – 2013. – T. 47, № 6. – С. 329-342.
529. Matsushika A., Goshima T., Hoshino T. Transcription analysis of recombinant industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals the molecular basis for fermentation of glucose and xylose // *Microbial Cell Factories*. – 2014. – T. 13, № 1. – С. 16.
530. Abdel-Banat B. M. A., Hoshida H., Ano A., Nonklang S., Akada R. High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – T. 85, № 4. – С. 861-867.
531. Сорокина К. Н., Пармон В. Н. Штамм дрожжей *Kluyveromyces marxianus* ВКПМ Y- 4290, применяемый для получения этанола на каталитических гидролизатах целлюлозы // Патент РФ №RU2626544C1. 28.07.2017.
532. Nonklang S., Ano A., Abdel-Banat B. M. A., Saito Y., Hoshida H., Akada R. Construction of flocculent *Kluyveromyces marxianus* strains suitable for high-temperature ethanol fermentation // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2009. – T. 73, № 5. – С. 1090-1095.

533. Fonseca G. G., Gombert A. K., Heinzle E., Wittmann C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source // FEMS Yeast Research. – 2007. – T. 7, № 3. – C. 422-435.
534. Nigam J. N., Margaritis A., Lachance M. A. Aerobic fermentation of D-xylose to ethanol by *Clavispora* sp. // Applied and Environmental Microbiology. – 1985. – T. 50, № 4. – C. 763-766.
535. Freer S. N., Greene R. V. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitaniae* // Journal of Biological Chemistry. – 1990. – T. 265, № 22. – C. 12864-12868.
536. Yuangsaard N., Yongmanitchai W., Yamada M., Limtong S. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate // Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. – 2013. – T. 103, № 3. – C. 577-588.
537. Costa D. A., De Souza C. J. A., Costa P. S., Rodrigues M. Q. R. B., Dos Santos A. F., Lopes M. R., Genier H. L. A., Silveira W. B., Fietto L. G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – T. 98, № 8. – C. 3829-3840.
538. Rugthaworn P., Murata Y., Machida M., Apiwatanapiwat W., Hirooka A., Thanapase W., Dangjarean H., Ushiwaka S., Morimitsu K., Kosugi A., Arai T., Vaithanomsat P. Growth inhibition of thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus*, in hydrolysates from cassava pulp // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – T. 173, № 5. – C. 1197-1208.
539. da Costa J. A., Marques J. E., Jr., Gonçalves L. R. B., Rocha M. V. P. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide // Bioresource Technology. – 2015. – T. 179. – C. 249-259.
540. Alriksson B., Horvath I. S., Sjöde A., Nilvebrant N.-O., Jönsson L. J. Ammonium hydroxide detoxification of spruce acid hydrolysates // Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals / Davison B. H. и др. – Totowa, NJ: Humana Press, 2005. – C. 911-922.
541. Martinez A., Rodriguez M. E., York S. W., Preston J. F., Ingram L. O. Effects of Ca(OH)₂ treatments ('overliming') on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates // Biotechnology and Bioengineering. – 2000. – T. 69, № 5. – C. 526-536.
542. da Silva D. D. V., de Arruda P. V., Vicente F. M. C. F., Sene L., da Silva S. S., das Graças de Almeida Felipe M. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production // Annals of Microbiology. – 2015. – T. 65, № 2. – C. 687-694.
543. Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression // Biotechnology for Biofuels. – 2011. – T. 4, № 1. – C. 8.

544. Goswami M., Meena S., Navatha S., Prasanna Rani K. N., Pandey A., Sukumaran R. K., Prasad R. B. N., Prabhavathi Devi B. L. A. Hydrolysis of biomass using a reusable solid carbon acid catalyst and fermentation of the catalytic hydrolysate to ethanol // *Bioresource Technology*. – 2015. – Т. 188. – С. 99-102.
545. Lau M. W., Dale B. E. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Т. 106, № 5. – С. 1368-1373.
546. Технология гидролизных производств. / Холькин Ю. И. – Издательство: Лесная промышленность, 1989. – 496 с.
547. Dasgupta D., Suman S. K., Pandey D., Ghosh D., Khan R., Agrawal D., Jain R. K., Vadde V. T., Adhikari D. K. Design and optimization of ethanol production from bagasse pith hydrolysate by a thermotolerant yeast *Kluyveromyces* sp. IIPE453 using response surface methodology // *SpringerPlus*. – 2013. – Т. 2, № 1.
548. Xu D. Y., Yang Y., Yang Z. Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media // *Journal of Biotechnology*. – 2011. – Т. 152, № 1-2. – С. 30-36.
549. Zheng G. W., Yu H. L., Li C. X., Pan J., Xu J. H. Immobilization of *Bacillus subtilis* esterase by simple cross-linking for enzymatic resolution of DL-menthyl acetate // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. – 2011. – Т. 70, № 3-4. – С. 138-143.
550. Schofield D. A., DiNovo A. A. Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S // *J Appl Microbiol*. – 2010. – Т. 109, № 2. – С. 548-557.
551. Sorokina K. N., Samoylova Y. V., Parmon V. N. Thermostable Esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus*: Effect of TrxA Tag on the Enzyme Properties // *Catalysis in Industry*. – 2020. – Т. 12, № 2. – С. 148-154.
552. Scott M. J., Jones M. N. The biodegradation of surfactants in the environment // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2000. – Т. 1508, № 1. – С. 235-251.
553. Amin M. T., Alazba A. A., Manzoor U. A review of removal of pollutants from water/wastewater using different types of nanomaterials // *Advances in Materials Science and Engineering*. – 2014. – Т. 2014.
554. Ormad M. P., Miguel N., Claver A., Matesanz J. M., Ovelleiro J. L. Pesticides removal in the process of drinking water production // *Chemosphere*. – 2008. – Т. 71, № 1. – С. 97-106.
555. Al-Maqdi K. A., Elmerhi N., Athamneh K., Bilal M., Alzamly A., Ashraf S.S., Shah I. Challenges and Recent Advances in Enzyme-Mediated Wastewater Remediation-A Review // *Nanomaterials (Basel)*. – 2021. – Т.11, №11. – С. 3124.

556. Cheng H., Zhao Y. L., Luo X. J., Xu D. S., Cao X., Xu J. H., Dai Q., Zhang X. Y., Ge J., Bai Y. P. Cross-linked enzyme-polymer conjugates with excellent stability and detergent-enhanced activity for efficient organophosphate degradation // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2018. – T. 5, № 1. – C. 49.
557. 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.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Результаты Z-оценки (анализ результатов первичного отбора штаммов микроводорослей по накоплению биомассы, липидов и углеводов)

Штамм	Биомасса			Липиды			Углеводы		
	BBM	OECD	WW	BBM	OECD	WW	BBM	OECD	WW
NIES-2164	-0.50369	0.471671	0.28433	0.302025	-0.33161	-0.39684	-1.01746	-0.82692	-0.55065
A-1113	-0.66741	-0.77299	-0.10946	-0.23302	-0.42948	-0.47689	-0.00728	-0.31219	-0.13727
A-1115	-0.83763	-0.70657	-0.74856	-0.48385	-0.42942	-0.48036	-0.47433	-0.38191	-0.05489
A-1138	-0.55244	-0.74721	-0.70424	-0.61204	-0.44778	-0.48309	-0.28723	-0.36848	-0.48216
A-1162	-0.04867	-0.86679	-0.82309	0.04947	-0.47684	-0.47891	-0.01516	-0.11578	0.292876
A-1144	-1.0785	-1.44969	-1.37844	-0.86598	-0.42984	-0.48267	-0.91259	-0.8895	-0.71393
IPPAS C-1	2.266878	1.813175	1.991019	2.035018	2.312185	0.523798	-0.40911	-0.48168	-0.08507
IPPAS C-15	-0.35077	-0.19274	-0.38643	-0.6976	-0.27609	0.230221	-0.79065	-0.6282	-0.54992
A-1135	-0.87129	0.072119	-0.0202	-0.01633	-0.43424	-0.50234	-1.1089	-1.18236	-0.80881
IC-62	0.969151	0.823509	1.14383	1.01022	3.240655	3.113708	-0.50058	-0.25082	-0.89138
A-1176	-0.70422	-1.02317	-1.07436	-0.71205	-0.51214	-0.49126	-0.28934	-0.54797	-0.61565
A-1182	-0.80911	-0.91809	-0.85365	-0.80877	-0.51126	-0.48983	-0.41825	-0.32461	0.077171
IC-82	0.039428	-0.65535	-0.2866	-0.04677	-0.17774	-0.25948	0.293668	0.518593	0.287635
A-1123	-0.29598	-1.04597	-0.91163	1.206565	-0.11845	-0.0726	-0.38942	-0.83564	-0.94921
IC-10	-0.44783	0.208616	-0.15083	-0.1701	-0.50206	-0.4689	-0.10205	-0.29394	0.108846
IC-75	-0.97632	-0.27608	-0.19168	-0.72854	-0.47142	-0.49818	-0.62688	-0.68395	-0.41479
IC-44	0.641464	1.644262	1.4287	2.363103	2.086627	2.769115	-0.23633	-0.04751	-0.78856
IC-76	2.110525	2.45359	2.659811	2.162565	1.406779	2.185238	0.513734	0.50153	-0.89489
A-1139	-1.557	-1.07807	-1.04228	-1.04837	-0.42674	-0.49257	-0.56094	-0.5382	-0.84372
IC-11	1.805763	0.157556	0.030721	-1.11634	-0.54988	-0.42716	3.427382	2.82033	3.12044
IPPAS C-2	1.046356	0.780937	0.625264	-0.57794	-0.55473	-0.47296	1.811604	2.326289	2.44578
IPPAS C-9	0.606294	0.688592	0.589015	-0.41818	-0.54564	-0.43509	2.088458	2.037286	1.307001
IPPAS S-333	0.028992	0.015736	-0.07393	-0.09107	-0.28113	-0.43566	0.561151	0.547773	0.644405
IC-23	-0.05809	1.418471	1.379739	0.013896	-0.46676	-0.1527	0.467355	0.951929	1.267739
NIES-2280	0.375898	0.430688	-0.19799	-0.6716	-0.38482	-0.46096	0.096013	-0.11918	-0.21303
A-1175	0.614197	-0.94857	-0.98803	0.391153	0.149784	0.12728	-0.90133	-0.93887	-0.60717
A-1167	-0.17349	-0.28848	-0.1781	-0.23528	-0.43765	-0.49073	-0.14428	0.146305	0.090084

Статистический анализ данных первичного отбора штаммов микроводорослей методом
однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных
сравнений с поправкой Холма-Бонферрони для отобранных штаммов

Штамм	Биомасса			Липиды			Углеводы		
	BBM	OECD	WW	BBM	OECD	WW	BBM	OECD	WW
IPPAS C-1	IC-76, IC-11 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p<0.05$ для всех штаммов	IC-76 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IC-76, IC-44 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IC-44 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IC-44 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов
IC-44	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	IC-76, IPPAS C-1, $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IC-76, IPPAS C1 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IC-62 $p>0.05$	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов
IC-62	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p<0.05$ для всех штаммов	IC-44 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов
IC-76	IPPAS C-1, IC-11 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p<0.05$ для всех штаммов	IPPAS C-1 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IPPAS C-1, IC-44 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IC-44 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p<0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов
IC-11	IC-76, IPPAS C-1, $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p<0.05$ для всех штаммов	IPPAS C-2, IPPAS C-9 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p<0.05$ для всех штаммов
IPPAS C-2	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	IPPAS C-9 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IC-11, IPPAS C-2 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p<0.05$ для всех штаммов
IPPAS C-9	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	$p>0.05$ для всех штаммов	IPPAS C-2 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	IPPAS C-2, IC-11 $p>0.05$, для остальных – $p<0.05$	$p>0.05$ для всех штаммов

Приложение Б

Значения VIP и кратность изменения концентраций метаболитов при переходе от экспоненциальной (4 сут) к стационарной фазе (15 сут) роста по данным PLS-DA анализа метаболизма штамма *Micractinium* sp. IC-76 при культивировании на среде WW

Метаболит	VIP	σ	p -значение $\times 10^{-3}$ §	FC §§	log2(FC)
Сахароза	1.190	0.024	0.0192549	12.98168126	3.698405334
Пироглутаминовая кислота	1.189	0.035	0.200016	0.174040549	-2.522504619
Фосфорная кислота	1.189	0.046	0.403977	0.404310762	-1.306463489
Неидентифицированный метаболит №2	1.189	0.027	0.284566	-	-
Глюкозо-6-фосфат	1.188	0.037	0.314123	2.539181851	1.344363721
Аспарагиновая кислота	1.188	0.039	0.658056	0.073531276	-3.765498177
Мио-инозитол-2-фосфат	1.187	0.024	0.402412	4.147622976	2.052284757
Моноолеин	1.187	0.033	0.0892838	3.466977645	1.793678534
Эритроновая кислота	1.186	0.025	0.77678	-	-
Рафиноза	1.186	0.026	0.890461	-	-
Фруктозо-6-фосфат	1.184	0.079	2.006845	3.190400372	1.673737483
Стеариновая кислота	1.183	0.057	0.892135	2.115158693	1.080765908
N-ацетилглутаминовая кислота	1.183	0.078	0.172332	0.34267752	-1.545076542
Треонин	1.182	0.074	1.416431	0.382114445	-1.387923298
Моностеарин	1.179	0.065	2.106123	1.248517382	0.320215907
Аланин	1.178	0.102	2.649167	-	-
Серин	1.170	0.119	2.098687	0.3076342	-1.700712197
Глицерин	1.170	0.115	8.437323	4.017741638	2.006384794
Глицин	1.168	0.120	5.43649	1.683149132	0.751163009
Яблочная кислота	1.168	0.107	7.134137	0.558211072	-0.841117354
Галактозо-6-фосфат	1.163	0.124	9.775742	3.094758854	1.629826998
Олеиновая кислота	1.156	0.130	7.285333	1.206280646	0.270565596
Фумаровая кислота	1.153	0.113	1.244649	0.640951465	-0.64171298
Бензойная кислота	1.142	0.151	12.224702	0.372763446	-1.423667702
Миристиновая кислота	1.124	0.197	20.611411	1.626021397	0.701346242
Глицерин	1.114	0.167	29.425568	0.749725419	-0.415565778
Щавелевая кислота	1.109	0.167	9.393432	1.459868625	0.545838545
Глицерин-3-фосфат	1.081	0.227	27.642492	0.49697636	-1.008750867
Пальмитиновая кислота	0.961	0.301	51.3436	2.184604861	1.127372357
Валин	0.947	0.300	51.100896	1.3682854	0.452369182

Монобехенин	0.918	0.330	36.074222	1.052181736	0.073383913
Линоленовая кислота	0.883	0.367	7.672559	0.709751052	-0.494615012
Треоновая кислота	0.868	0.351	11.354877	0.871544786	-0.198353293
Молочная кислота	0.785	0.383	120.156303	0.83983503	-0.251822129
Монопальмитин	0.765	0.397	19.942017	1.02686575	0.03824758
Адипиновая кислота	0.740	0.408	153.535154	0.804815013	-0.313270877
Моноарахидин	0.693	0.419	70.50988	0.924049134	-0.113958529
Гликолевая кислота	0.599	0.452	182.663794	0.11763779	-3.087576508
Арахидоновая кислота	0.555	0.469	204.785879	5.570618831	2.477837603
Лимонная кислота	0.542	0.474	267.231459	1.152444496	0.20469727
Линолевая кислота	0.487	0.485	176.211443	0.897341846	-0.156270405
Мио-инозитол	0.442	0.489	276.325686	0.857647801	-0.221542778
Неидентифицированный метаболит №1	0.088	0.226	459.600025	1.033018058	0.046865473
Изолейцин	0	0	-	-	-
Аскорбиновая кислота	0	0	-	-	-
Неидентифицированный метаболит №3	0	0	-	-	-

§ Двухвыборочный односторонний t-тест.

§§ FC - кратность изменения.

Приложение В

Статистический анализ данных оценки влияния различных стрессовых факторов на способность штаммов микроводорослей к продукции биомассы, углеводов и нейтральных липидов методом однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений (тест Тьюки)

Штамм	Биомасса	Липиды	Углеводы
<i>C. sorokiniana</i> IPPAS C-1	$p < 0.001$ BBM (6000 лк) BBM (2000 лк) BBM-N (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк) BBM (4000 лк)	$p < 0.05$ BBM (2000 лк) BBM-N (2000 лк) Среда А (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM-N (2000 лк) Среда А (2000 лк) Среда В (2000 лк)
<i>P. kessleri</i> IPPAS C-2	$p < 0.05$ Среда А (2000 лк) BBM-P (2000 лк) BBM (4000 лк) BBM (6000 лк)	$p < 0.05$ BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)
<i>P. kessleri</i> IPPAS C-9	$p < 0.05$ Среда А (2000 лк) BBM-N (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк) BBM (4000 лк) BBM (6000 лк)
<i>P. kessleri</i> IPPAS C-15	$p < 0.05$ BBM-N (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк) BBM (4000 лк)
<i>P. kessleri</i> IPPAS S-333	$p < 0.05$ BBM-N (2000 лк) Среда В (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)
<i>P. kessleri</i> IC-11	$p < 0.05$ BBM-N (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM (2000 лк)	$p < 0.05$ BBM (2000 лк) BBM с 20 г л ⁻¹ солей (2000 лк)

Приложение Г

Анализ концентраций метаболитов *P. kessleri* IC-11 при переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста на средах BBM и WW с добавлением и без добавления 30 г л⁻¹ солей

Метаболит	VIP	p – значение $\times 10^{-3}$ а	FC ^б	log ₂ (FC)
Среда BBM				
1-моностеарин	6.3358	>50	0.81746	-0.29077
Сахароза	4.0686	7.2825	1.3257	0.4068
Галактозилглицерин	3.3079	0.0451	0.16544	-2.5956
Пальмитиновая кислота	1.9739	0.046	0.45991	-1.1206
Глицерин	1.6775	0.20707	0.12254	-3.0287
1-монопальмитин	1.6023	23.793	0.77444	-0.36877
Галактоза	1.4629	0.0996	0.023227	-5.4281
Аргинин	1.4045	0.0463	0.20273	-2.3024
Мио-инозитол	0.6504	0.0711	0.35701	-1.486
Фосфорная кислота	0.53944	1.4789	0.72706	-0.45985
3-фосфоглицерат	0.52112	0.15096	0.50252	-0.99274
Аспарагин	0.50649	0.98758	0.48092	-1.0561
Орнитин	0.40482	0.10543	0.11665	-3.0997
Пролин	0.38971	1.3705	0.81057	-0.30299
Рафиноза	0.38445	0.0798	5.5472	2.4718
Дигалактозилглицерол	0.36375	17.343	1.2232	0.2907
Глицин	0.31065	0.25499	0.40831	-1.2923
Серин	0.27865	0.00877	0.44922	-1.1545
2-галактозилглицерол	0.23648	10.312	0.62005	-0.68954
Треонин	0.22899	0.0705	0.51855	-0.94743
Монометилфосфат	0.21931	0.00431	0.064043	-3.9648
2-моностеарин	0.20888	>50	0.77634	-0.36524
Аланин	0.14695	0.00877	0.47543	-1.0727
Аскорбиновая кислота	0.079662	>50	33.562	5.0688
Тетрадекановая кислота	0.074794	0.28839	0.52704	-0.92401
2-кетоглутаровая кислота	0.067653	0.0161	0.0349	-4.8406
Альфа-глицерил арахидат	0.052617	>50	0.75269	-0.40987
Уридин	0.051809	0.92009	0.12464	-3.0042
Мио-инозитол 2-фосфат	0.049953	0.0802	3.0093	1.5894
Лизин	0.049737	6.2789	0.74562	-0.42349
Манноза	0.042906	0.16411	0.053943	-4.2124
Триптамин	0.041588	0.30118	0.48026	-1.0581
2-аминобутират	0.037023	0.37766	0.29811	-1.7461
Фумаровая кислота	0.036754	0.0162	3.28	1.7137
Яблочная кислота	0.036573	>50	0.87686	-0.18958
Эритроновая кислота	0.035623	>50	1.107	0.14663
Глюкоза	0.033172	0.66812	0.55178	-0.85782
Рибоза	0.031036	>50	1.8326	0.87388

Галактозо-6-фосфат	0.030207	0.20003	4.3887	2.1338
Гулонолактон	0.027698	0.60651	0.37749	-1.4055
Моноэтаноламин фосфат	0.024246	0.36448	3.72	1.8953
Треоновая кислота	0.023587	14.134	2.473	1.3062
Нонановая кислота	0.022586	0.43891	0.38676	-1.3705
Пироглутаминовая кислота	0.021457	0.0490	0.41154	-1.2809
Декановая кислота	0.019118	0.89875	0.25519	-1.9703
Фруктоза	0.015264	0.70777	0.31685	-1.6581
Глицериллиноленат	0.015248	>50	0.71407	-0.48586
Цистеин	0.012043	18.604	1.5246	0.60844
Валин	0.011571	1.0447	0.41365	-1.2735
Сорбоза	0.010269	0.23257	2.152	1.1057
Гулоза	0.010099	>50	0.39768	-1.3303
Себациновая кислота	0.00988	4.637	0.41845	-1.2569
Мономиристин	0.009672	>50	0.60657	-0.72125
Талофураноза	0.009291	0.0223	0.20843	-2.2624
Изопропилпальмитат	0.008497	>50	1.2256	0.29347
Бензойная кислота	0.008166	12.009	1.2168	0.28309
Пировиноградная кислота	0.007158	0.20133	0.52201	-0.93786
Додекандиовая кислота	0.006903	0.34189	0.26168	-1.9341
Фенилаланин	0.006478	0.41932	0.27413	-1.8671
Аденозин	0.004689	2.0048	0.59464	-0.7499
Субериновая кислота	0.004532	0.94723	2.8525	1.5122
Докозановая кислота	0.003816	>50	0.6497	-0.62216
Аденилат	0.003143	>50	0.8957	-0.15891
Глицериновая кислота	0.00285	7.4308	0.8262	-0.27544
Терефталевая кислота	0.00173	27.764	1.3297	0.41113
2-монопамитин	0.001443	>50	1.0144	0.020641
Галактинол	0.001438	>50	1.005	0.007154
Метилмалоновая кислота	0.001318	>50	0.92073	-0.11915
Аспарагиновая кислота	0.001293	>50	0.995	-0.00723
Молочная кислота	0.001246	>50	0.94628	-0.07967
Глутамин	0.001238	>50	1.0318	0.045174
Эритроза	0.000321	>50	0.97576	-0.0354
Пропиленгликоль	0.00021	>50	0.92576	-0.11129
Среда BBM-S				
Галактозилглицерол	5.2804	0.0248	0.014035	-6.1548
Рафиноза	3.4577	0.201	43.287	5.4358
Галактоза	3.211	0.00467	17.343	4.1162
Аденозинмонофосфат	2.7187	0.966	0.012436	-6.3293
Цистеин	2.4407	0.795	1.9036	0.9287
Декановая кислота	2.0102	0.000911	0.017873	-5.8061
Фосфорная кислота	1.9963	0.284	1.916	0.9381
Сахароза	1.8594	>50	0.96691	-0.04855
1-моностеарин	1.6587	>50	0.9711	-0.0423
Стеариновая кислота	1.3441	16.347	0.75052	-0.41405

1-монопальмитин	1.311	>50	0.88521	-0.17591
Аргинин	0.7925	3.301	1.9011	0.92682
Аспарагиновая кислота	0.5388	>50	0.35641	-1.4884
Линолевая кислота	0.52597	2.696	0.32062	-1.6411
Дигалактозилглицерол	0.48103	3.315	0.54666	-0.87127
Пролин	0.47628	2.753	1.1609	0.21523
Глицериллиноленат	0.44435	3.478	1.7529	0.80978
Мио-инозитол	0.42827	1.558	2.4192	1.2745
3-фосфоглицерат	0.4119	0.483	0.72993	-0.45417
Глицериновая кислота	0.40568	4.478	7.9813	2.9966
Яблочная кислота	0.39654	11.994	2.3751	1.248
Пальмитиновая кислота	0.33743	>50	0.9135	-0.13052
Глутамин	0.29267	0.00344	0.11214	-3.1566
Глицерин	0.26425	4.125	1.4647	0.55056
Пироглутаминовая кислота	0.25722	0.00243	0.21117	-2.2435
Серин	0.25685	6.386	1.4389	0.52494
Изопропилпальмитат	0.21876	>50	71.407	6.158
Аденозин	0.21476	5.549	70.119	6.1317
Глицин	0.1842	>50	1.5347	0.61793
Галактинол	0.16907	2.262	1.2853	0.36206
Рибоза	0.16422	0.0902	10.074	3.3326
Пропиленгликоль	0.13983	3.036	8.442	3.0776
Молочная кислота	0.13968	>50	0.021761	-5.5221
Лизин	0.13243	0.743	1.8189	0.86307
Гулонолактон	0.11649	0.0245	0.20227	-2.3056
Гулоза	0.098753	>50	0.11589	-3.1091
Альфа-глицерил арахидат	0.083693	25.683	0.79229	-0.3359
Аспарагин	0.081589	>50	1.0802	0.11128
Нонановая кислота	0.079385	2.452	3.2438	1.6977
Уридин	0.076413	0.14	25.593	4.6777
Метилмалоновая кислота	0.07425	0.555	3.0041	1.587
Мио-инозитол 2-фосфат	0.072073	>50	1.4641	0.55004
Мономиристин	0.070747	>50	0.4444	-1.1701
Глюкоза	0.069197	10.016	0.7442	-0.42623
Треонин	0.06372	22.667	1.1264	0.17167
Аланин	0.063711	>50	1.1531	0.20553
Терефталевая кислота	0.057012	2.97	5.1329	2.3598
Эритроза	0.049129	0.0564	2.3574	1.2372
2-кетоглутаровая кислота	0.034956	0.388	0.34361	-1.5412
Валин	0.034645	7.431	0.3842	-1.3801
2-моностеарин	0.027471	>50	0.97781	-0.03238
Фумаровая кислота	0.027001	6.935	1.7547	0.8112
2-аминобутират	0.026873	>50	1.4634	0.54932
Треоновая кислота	0.024366	1.716	0.38202	-1.3883
Пировиноградная кислота	0.019694	1.016	0.13627	-2.8755
Моноэтаноламин фосфат	0.015352	0.0924	1.8381	0.87822

Триптами́н	0.014954	>50	1.1444	0.19457
2-монопа́митин	0.014902	>50	0.90526	-0.1436
Аскори́новая кислота	0.014156	0.000573	5.556	2.474
Фрукто́за	0.014038	0.182	0.18123	-2.4641
Эритро́новая кислота	0.013745	>50	1.367	0.45106
Фенила́ланин	0.012664	6.47	0.56389	-0.82651
Субери́новая кислота	0.012505	0.745	5.0247	2.329
Талофу́раноза	0.011552	6.613	0.21196	-2.2382
Докоза́новая кислота	0.010066	3.958	0.23586	-2.084
Миристи́новая кислота	0.009457	>50	1.0445	0.062854
Бензо́йная кислота	0.006094	>50	1.1081	0.14812
2-галактозилглицерол	0.005276	>50	0.86344	-0.21183
Себа́циновая кислота	0.004913	>50	0.72979	-0.45445
Манно́за	0.002598	>50	1.1966	0.25893
Додека́ндиовая кислота	0.002234	>50	1.1506	0.20245
Галактозо-6-фосфат	0.002138	>50	1.1437	0.19365
Орнито́н	0.001535	>50	0.98408	-0.02315
Мономети́лфосфат	0	0.0013	0.1746	-2.5179
Среда WW				
Глицерин	5.9244	0.422	4.2436	2.0853
Галактозилглицерол	4.6168	0.00154	0.34318	-1.543
Дигалактозилглицерол	4.0124	0.707	0.38864	-1.3635
Рафи́ноза	2.53	0.535	4.8192	2.2688
Сахаро́за	1.4397	18.49	1.2112	0.2764
1-моностеа́рин	1.2768	>50	1.0832	0.11532
Галакто́за	1.0293	0.0748	2.3852	1.2541
Пальмити́новая кислота	0.54908	1.943	0.5875	-0.76734
1-монопа́льмитин	0.44405	14.671	1.176	0.23391
2-галактозилглицерол	0.40544	8.155	1.9154	0.93762
Глицери́новая кислота	0.327	1.886	14.824	3.8899
Мио-ино́зитол	0.23993	1.566	0.64746	-0.62715
Стеари́новая кислота	0.23275	29.923	0.8006	-0.32085
Линоле́вая кислота	0.20983	0.00943	0.38605	-1.3731
3-фосфо́глицерат	0.20907	0.936	0.372	-1.4266
Лимонна́я кислота	0.17384	0.872	0.33897	-1.5608
Галактино́л	0.16133	10.488	1.7141	0.77747
Пролин	0.13427	>50	0.71535	-0.48327
Лизин	0.10831	0.108	0.013332	-6.229
Серин	0.10693	0.00593	0.12976	-2.9461
Фосфо́рная кислота	0.06549	>50	0.8045	-0.31384
Фу́маровая кислота	0.063072	5.227	0.22661	-2.1417
2-моностеа́рин	0.061738	>50	1.1738	0.23122
Адено́зин	0.057266	0.218	5.5701	2.4777
Рибо́за	0.054594	3.684	38.303	5.2594
Глицин	0.052478	30.99	0.49631	-1.0107
Орнито́н	0.048436	0.0303	34.096	5.0915

2-кетоглутаровая кислота	0.047571	0.0000732	0.13584	-2.88
Моноэтаноламин фосфат	0.041924	0.0000117	29.646	4.8898
Миристиновая кислота	0.034015	3.29	0.67341	-0.57045
Аланин	0.03136	0.528	0.55831	-0.84087
Эритроновая кислота	0.030784	1.692	0.49785	-1.0062
Глутамин	0.023632	0.000376	0.058317	-4.0999
Треонин	0.023484	21.41	0.70034	-0.51387
Уридин	0.021247	1.419	0.48178	-1.0536
Талофураноза	0.01839	0.00441	0.073716	-3.7619
Гулонолактон	0.018127	0.174	13.386	3.7426
Монометилфосфат	0.015619	>50	0.77731	-0.36344
Аргинин	0.014649	>50	0.57637	-0.79494
Аспарагиновая кислота	0.013244	0.0259	0.46354	-1.1092
Изопропилпальмитат	0.013148	7.464	0.29296	-1.7712
Нонановая кислота	0.012951	1.148	0.26421	-1.9202
Глюкоза	0.011171	>50	1.2969	0.37509
Триптами	0.00961	0.0175	7.5665	2.9196
Цистеин	0.009448	0.0024	7.4554	2.8983
Альфа-глицерил арахидат	0.009063	>50	1.1055	0.14472
2-монопамитин	0.008191	>50	1.2126	0.27807
2-аминобутират	0.007451	0.713	1.7085	0.77276
Пропиленгликоль	0.007412	5.563	1.6745	0.74377
Мономиристин	0.005876	1.532	2.1287	1.09
Аспарагин	0.005455	2.079	2.211	1.1447
Пироглутаминовая кислота	0.005244	>50	1.2601	0.33351
Метилмалоновая кислота	0.00445	1.061	0.55338	-0.85365
Фенилаланин	0.004034	0.0784	0.26623	-1.9093
Сорбоза	0.003704	0.0808	0.2832	-1.8201
Фруктоза	0.003625	0.0447	0.28762	-1.7977
Манноза	0.003579	0.0998	0.29021	-1.7848
Себациновая кислота	0.003523	0.00606	0.2935	-1.7686
Галактозо-6-фосфат	0.003459	0.0711	3.3634	1.7499
Аскорбиновая кислота	0.003311	15.186	0.30654	-1.7059
Субериновая кислота	0.003219	12.762	0.31253	-1.6779
Эритроза	0.00316	0.000153	3.1591	1.6595
Гулоза	0.002336	>50	0.89848	-0.15444
Бензойная кислота	0.002	>50	0.90166	-0.14934
Треоновая кислота	0.00179	>50	1.1567	0.21003
Терефталевая кислота	0.001643	>50	1.344	0.42651
Валин	0.00122	>50	0.77079	-0.3756
Аденилат	0.001184	>50	1.1165	0.15897
Глицериллиноленат	0.000357	>50	1.0369	0.052325
Додекандиовая кислота	0.000258	>50	0.94402	-0.08312
Мио-инозитол 2-фосфат	0.000249	>50	1.0498	0.070149
Пировиноградная кислота	0.000163	>50	0.96608	-0.04978
Молочная кислота	0.000142	>50	1.0053	0.007588

Декановая кислота	0.0000332	>50	1.0064	0.009161
Среда WW-S				
Рафиноза	7.3322	0.00793	8.9726	3.1655
Галактоза	3.362	0.0197	29.95	4.9045
Фосфорная кислота	2.029	0.137	2.4234	1.277
Пролин	1.9427	0.166	0.013883	-6.1705
Сахароза	1.574	>50	0.94808	-0.07692
Галактинол	1.1638	0.199	2.1206	1.0845
Лимонная кислота	1.0011	28.148	0.19554	-2.3545
Глицериллиноленат	0.90446	0.00736	10.009	3.3232
1-моностеарин	0.80825	>50	0.97434	-0.03751
Монометилфосфат	0.56106	0.0723	30.975	4.9531
Мио-инозитол	0.55638	0.016	5.1322	2.3596
1-монопальмитин	0.55595	>50	0.89812	-0.15502
Аденозин	0.36172	0.352	39.878	5.3175
Пальмитиновая кислота	0.29739	>50	1.1875	0.24792
Глицерин	0.2634	21.965	0.76881	-0.3793
Дигалактозилглицерол	0.25537	5.268	1.4613	0.54727
Аланин	0.24503	>50	0.40571	-1.3015
Галактозилглицерол	0.21262	0.000381	25.254	4.6584
Стеариновая кислота	0.1947	>50	0.90889	-0.13783
Яблочная кислота	0.17547	16.561	1.445	0.53104
Аспарагин	0.15602	15.926	0.77585	-0.36615
Эритроновая кислота	0.14257	0.022	0.21618	-2.2097
Уридин	0.11693	0.0182	7.9396	2.9891
Линолевая кислота	0.11477	0.202	0.62614	-0.67543
Глицериновая кислота	0.11314	1.93	3.1031	1.6337
Молочная кислота	0.10282	0.464	3.1857	1.6716
3-фосфоглицерат	0.10207	>50	0.9116	-0.13352
Серин	0.099149	>50	0.80819	-0.30724
2-кетоглутаровая кислота	0.084624	0.0104	0.11038	-3.1795
Треонин	0.082445	>50	1.4467	0.53272
Бензойная кислота	0.074657	7.542	2.4738	1.3068
Глицин	0.073838	17.33	1.3039	0.38284
2-моностеарин	0.056705	>50	1.1076	0.1475
Цистеин	0.053184	0.528	6.0541	2.5979
Гулонолактон	0.051898	7.421	0.18503	-2.4342
Треоновая кислота	0.046691	0.308	4.9254	2.3002
2-аминобутират	0.042509	1.719	0.18436	-2.4394
Аспарагиновая кислота	0.040998	>50	1.1841	0.24382
Нонановая кислота	0.037725	16.57	0.49695	-1.0088
Моноэтаноламин фосфат	0.03639	0.789	2.6386	1.3998
Пировиноградная кислота	0.034354	21.483	0.21012	-2.2507
Галактозо-6-фосфат	0.03196	0.603	3.0817	1.6237
2-галактозилглицерин	0.030881	0.638	22.069	4.464
Метилмалоновая кислота	0.029784	0.314	0.24919	-2.0047

Рибоза	0.029329	>50	21.01	4.393
Мио-инозитол 2-фосфат	0.024443	4.519	1.248	0.31961
Аскорбиновая кислота	0.024193	0.000013	0.44825	-1.1576
Гулоза	0.021111	1.362	0.56995	-0.81108
Лизин	0.020822	31.325	0.78439	-0.35036
Миристиновая кислота	0.01976	>50	0.83227	-0.26487
Аргинин	0.018582	20.765	0.67901	-0.55849
Пироглутаминовая кислота	0.018423	8.706	1.5058	0.59052
Фумаровая кислота	0.013894	>50	0.7488	-0.41735
Додекандиовая кислота	0.013725	1.473	0.096486	-3.3735
Альфа-глицерил арахидат	0.012579	>50	1.0671	0.093685
Глюкоза	0.012213	>50	1.0901	0.12442
Сорбоза	0.009447	0.742	1.5023	0.58714
1-мономиристин	0.009434	0.571	7.4364	2.8946
Фруктоза	0.008491	0.502	0.14721	-2.764
Мономиристин	0.008002	3.281	0.57684	-0.79376
Декановая кислота	0.006875	>50	1.3811	0.46584
Глутамин	0.005839	>50	1.1373	0.18555
Эритроза	0.005188	4.786	2.1061	1.0746
Валин	0.004388	>50	0.91264	-0.13189
Аденилат	0.003102	>50	1.1051	0.14415
Пропиленгликоль	0.002935	>50	1.07	0.097677
Себациновая кислота	0.002341	29.986	1.3049	0.38395
Триптамин	0.002266	>50	0.99473	-0.00762
Изопропилпальмитат	0.002126	>50	0.89652	-0.1576
2-монопамитин	0.00063	>50	1.0069	0.009853
Терефталевая кислота	0.00047	>50	1.0242	0.034463

^a Двухвыборочный односторонний t-тест.

^b FC - кратность изменения.

Приложение Д

z-значения по данным Z-теста для накопления биомассы при различных температурах и субстратах для штаммов термотолерантных дрожжей.

Температура, °C	Штамм	Глюкоза	Манноза	Фруктоза	Целлобиоза
42	C1	1.24786	0.75002	0.97409	0.52662
	CBS4732	0.95628	-0.21512	2.56904	-1.11795
	D5	1.65007	1.32567	0.49260	0.82787
	B5	0.81424	0.06240	-0.09225	0.84808
	3B	0.31585	0.64368	0.21632	-1.50383
	3C	-1.02338	-0.81676	-0.54296	-0.33672
	1A	0.44482	0.47224	0.25034	-0.57165
	5A	-1.00420	0.30857	-0.45954	1.74805
	4D	-0.15085	1.54854	-1.14038	-0.04620
	4B	-0.72651	-1.62787	-1.02120	-1.28089
	4A	-1.24019	-1.40473	-0.98393	0.05232
	1B	-0.51971	-0.07770	0.28761	0.91818
	4C	-0.76404	-0.96891	-0.54968	-0.06388
45	C1	0.65624	-0.14868	0.55626	1.04577
	CBS4732	0.48399	1.86871	1.04780	1.07373
	D5	0.84529	0.57809	0.35077	0.12223
	B5	1.06045	0.27866	0.91248	-1.22829
	3B	0.34101	0.99682	0.81027	-1.47248
	3C	-	-	-	-
	1A	-0.42905	-0.99418	-0.75587	0.31117
	5A	-0.32049	-0.65919	0.22201	0.34186
	4D	-1.06623	-0.95116	-0.58165	-1.47248
	4B	-	-	-	-
	4A	-2.11711	-1.05384	-2.24938	0.60582
	1B	0.54589	0.08478	-0.31269	0.67267
	4C	-	-	-	-
48	C1	1.20036	1.33943	2.08232	-0.50456
	CBS4732	0.49943	-1.42713	0.12527	1.53309
	D5	0.49023	0.10461	-0.09145	0.69176
	B5	-0.41769	-0.04185	-0.35653	0.05849
	3B	-1.18187	0.46364	-0.33851	-0.80954
	3C	-	-	-	-
	1A	0.12396	-0.26343	-0.60217	-0.05464
	5A	-	-	-	-
	4D	-	-	-	-
	4B	-	-	-	-
	4A	-	-	-	-
	1B	-0.71439	-0.17523	-0.81888	-0.91445
	4C	-	-	-	-

Анализ статистически значимых различий между выбранными штаммами термотолерантных дрожжей по уровню накоплению биомассы в различных методом однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным анализом множественных сравнений с поправкой Холма-Бонферрони

Углевод	42 °C	45 °C	48 °C
Глюкоза	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Манноза	CBS4732-D5**	C1-CBS4732** CBS4732-B5** CBS4732-D5*	C1-CBS4732** CBS4732-D5** C1-B5*
Фруктоза	CBS4732-B5** CBS4732-D5** C1-CBS4732* C1-B5*	$p > 0.05$	C1-B5** C1-D5** C1-CBS4732*
Целлобиоза	CBS4732-B5** CBS4732-D5** C1-CBS4732*	CBS4732-B5** C1-B5** D5-B5*	$p > 0.05$

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$ - при сравнении всех штаммов при в одинаковых условиях