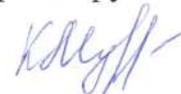


На правах рукописи



Мурзина Екатерина Дмитриевна

**Основы технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на
ферментативных гидролизатах зерновых**

Специальность: 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
технических наук

Москва – 2019 год

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д. И. Менделеева.

Научный руководитель: кандидат технических наук, доцент
Калёнов Сергей Владимирович,
доцент кафедры биотехнологии
Российского химико-технологического
университета имени Д. И. Менделеева

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Коннова Светлана Анатольевна,
заведующая кафедрой биохимии и биофизики
Саратовского национального
исследовательского государственного
университета имени Н. Г. Чернышевского

кандидат технических наук, доцент
Канарская Зоя Альбертовна,
доцент кафедры пищевой биотехнологии
Казанского национального исследовательского
технологического университета

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт морских
биологических исследований имени
А. О. Ковалевского РАН»

Защита состоится «13» июня 2019 г. в ___ часов ___ минут на заседании диссертационного совета Д999.095.03. при РХТУ им. Д. И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале (ауд. 443)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д. И. Менделеева, а также на официальном сайте РХТУ им. Д.И. Менделеева <https://diss.muctr.ru/author/288/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д999.095.03.
кандидат технических наук, доцент

Шакир Ирина Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Экосистемы, характеризующиеся повышенным содержанием солей, высоким уровнем температуры и облучения, встречающиеся в разных уголках планеты – в природных рассолах, открытых морях и озерах, в засоленных почвах, солонцах и солончаках, являются средой обитания микроорганизмов – экстремофилов, которые обладают специфическими физиолого-биохимическими свойствами, обеспечивающими им выживание в данных экосистемах в условиях повышенного осмотического давления, облучения, температуры и оксидативного стресса, и синтезируют уникальные биологически активных соединения. Данные микроорганизмы в настоящее время являются предметом широких исследований, как перспективные объекты для биотехнологических процессов и получения продуктов для использования в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве, как продуценты биологически активных соединений. [Michael C., 2010, Oren A., 2002]

Особенный интерес среди экстремально галофильных микроорганизмов представляют археобактерии, отличающиеся от прокариотических и эукариотических форм особенностями молекулярной организации. Среди них наиболее широкие исследования проведены с галоархеями *Halobacterium salinarum*, которые показали, что биомасса данных галобактерий может являться источником витаминов, микроэлементов, галоцинов, уникальных ферментов, фосфолипидов, C₅₀ – каротиноидов и бактериородопсина [Michael C., 2010, Oren A., 2002, Rodriguez-Valera F., 1988, Muthu Manikandan, 2009].

Препараты полученные на основе галобактерий используют в косметической и фармацевтической промышленности, археасомы *H. salinarum* являются перспективными средствами доставки лекарств. Имеются данные по использованию бактериородопсина в разработках биомолекулярных электронных устройств, в голографических пленках и оптических компьютерах [Hampp N. A., 2000, Mohammad Faezi Ghasemi, 2008, Kevin J. Wise, 2002, Thierry Benvegny, 2009, Babu Prasanti, 2014, El-Agamey Ali, 2004].

В промышленных масштабах получение биомассы галобактерий является трудоемким процессом. Использование триптона, пептона, дрожжевого экстракта в качестве основных источников питания, а также определенные требования к технологическому оформлению, материалам и оборудованию для культивирования, определяют повышение себестоимости продукции. При этом показано, что выход и состав биомассы отличается при незначительных изменениях параметров культивирования.

Для стабилизации культивирования *H. salinarum*, получения высокоплотностной культуры и удешевления способов выделения целевых компонентов из биомассы была разработана технология культивирования с использованием адсорбентов, что позволило уменьшить влияние ингибиторов при культивировании [Kalenov S.V., 2016].

Учитывая специфические потребности галобактерий к компонентам питательных сред, в настоящее время используются компоненты среды, которые, в основном, производятся зарубежными фирмами, отличаются характеристиками у разных производителей, иногда содержат ингибиторы роста галофильных микроорганизмов и являются достаточно дорогими. Разработка технологии получения биомассы галофилов при импортозамещении основных компонентов питательной среды в настоящее время является актуальной задачей для практической реализации процесса культивирования галобактерий.

Как основу питательной среды для выращивания микроорганизмов в биотехнологических производствах используют ферментативные гидролизаты зерновых как источники углеводов, аминокислот и ростовых факторов [Gibreel A., 2009, Kedia G., 2007, De Valdez G. F., 2010, Goldberg I., 2013, Evers A. D., 1999]. Получение крахмала, аминокислот из зерна путем его глубокой переработки решает сразу два вопроса: импортозамещения компонентов среды и хранения излишков зерна низкого качества. К тому же, для получения целевых компонентов биотехнологическими методами переработки подходит зерно любого класса и качества [Дашковский И., 2012].

Анализ литературы показывает, что к настоящему времени для увеличения эффективности получения биомассы *H. salinarum* не были использованы источники аминокислот и ростовых факторов, полученные из ферментоллизатов зерновых культур.

Также стоит отметить сложность сохранения биомассы галобактерий. Одними из наиболее термолабильных компонентов клеток галобактерий, которые в первую очередь подвергаются термодеградации, являются каротиноиды. Поэтому оптимизация режимов сушки является важной практической задачей.

Таким образом, **целью работы** является разработка основ технологии получения биомассы галобактерий *H. salinarum* на ферментоллизатах зерновых культур с дальнейшим ее высушиванием и длительным хранением.

Задачи исследования:

1. Подобрать ферментные препараты и режимы обработки зернового сырья для получения белковых ферментоллизатов, хорошо усваиваемых галобактериями;

2. Оптимизировать концентрацию компонентов питательной среды для увеличения выхода биомассы галобактерий и каротиноидов;
3. Определить протеолитическую активность галобактерий *H. salinarum*;
4. Осуществить высокоплотностное культивирование отобранных штаммов *H. salinarum* 353П и *H. salinarum* 353 П-1 в мембранном биореакторе на полученных гидролизатах;
5. Оптимизировать режимы высушивания биомассы галобактерий для сохранения биологически активных компонентов клеток;
6. Определить возможность длительного хранения сухой биомассы галобактерий *H. salinarum* с сохранением максимального содержания биологически активных веществ клеток.

Научная новизна. Впервые показана возможность культивирования галобактерий *H. salinarum* при использовании в качестве источника углерода ферментоллизатов зерновых культур, а также получена высокоплотностная культура в мембранном биореакторе на полученных ферментолизатах.

Оптимизирована распылительная сушка галобактерий *H. salinarum* для сохранения каротиноидов в биомассе и охарактеризовано состояние клеток после высушивания при длительном хранении.

Практическая значимость

Разработаны и апробированы в промышленных условиях основы технологии получения высокоплотностной культуры *H. salinarum* на ферментолизатах растительного сырья.

Показана возможность использования распылительного высушивания биомассы галобактерий с целью длительного сохранения клеток и их биологически активных веществ.

Получен акт внедрения результатов диссертации в производственный процесс.

На штамм бактерий *H. salinarum* 353П-1 (номер ВКПМ В-12794), превосходящий штамм бактерий *H. salinarum* 353П (номер ВКПМ В-1739) по выходу биомассы, каротиноидов, важнейших ненасыщенных жирных кислот и обладающий повышенной устойчивостью к вирусному поражению, получен патент № РФ 2662996.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на Международной конференции «Биотехнология: состояния и перспективы развития» (Москва, 2015), Международной конференции молодых ученых «Успехи в химии и химической технологии» (Москва, 2015, 2016), конференции «Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ» (Москва, 2016), XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 статей, в том числе 3 в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК, 5 тезисов докладов.

Работа выполнялась при поддержке гранта “Разработка технологии получения импортозамещающих пищевых ингредиентов и белковых кормовых продуктов, обогащенных функциональными компонентами, на основе возобновляемого растительного сырья” (Номер проекта: 16-19-10469).

Личный вклад автора состоял в анализе литературных источников, в проведении экспериментальной части и обсуждении полученных результатов, а также в непосредственном участии в подготовке публикаций и презентации докладов на конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, аналитического обзора литературы, экспериментальной части, выводов, библиографического списка, включающего 264 источника, в том числе 211 зарубежных авторов, приложений. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, иллюстрирована 24 рисунками, 16 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследований, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

В главе 1 «Обзор литературы» представлен анализ имеющихся данных о физико-химических свойствах галобактерий, содержании в них биологически активных веществ, особенностях культивирования, а также способах сохранения биомассы и биологически активных веществ микроорганизмов.

В главе 2 «Объекты и методы исследования». Объектами исследований являлись непатогенные штаммы галобактерий *H. salinarum* 353П (ВКПМ В-1739), полученный из ВКПМ ФГБУ «ГосНИИгенетика», и *H. salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794), выделенный в ходе исследований.

Базовая питательная среда для галобактерий (г/л): NaCl 250, MgSO₄×7H₂O 20, KCl 3,0, цитрат Na 3,0, CaCl₂ 0,2, триптон 5,0 (Serva), дрожжевой экстракт 2,0 (Organotechnie), глицерин 1,25.

Твердофазное культивирование галобактерий проводили в чашках Петри в течение 10-14 суток при 38,5 °С и постоянном освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 (500 Лк) при повышенной влажности.

Глубинное культивирование галобактерий *H. salinarum* осуществляли в колбах на 100 и 250 мл при 50% заполнении питательной средой, на шейкере G10 (New Brunswick, USA) при 150 об/мин, температуре 38,5°С, освещении 500 Лк на уровне колб лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 в течение 7 суток.

Для удаления ингибиторов/метаболитов, выделяемых галобактериями в ходе культивирования и влияющих на длительное хранение высушенной биомассы, осуществляли культивирование с адсорбентом – активированным углем АГ-3, инкапсулированным в агар [Kalenov S.V., 2016].

Галобактерии культивировали на гидролизатах зерновых культур, при соотношении крупы к воде равном 1:5 – 1:20. Предварительная тепловая обработка полученной суспензии острым паром для увеличения доступности компонентов и устранения ингибиторов протеаз [Мосолов В.В., 1971, Валуева Т.А., 2002] проводилась в автоклаве при изменении давления 0,7 – 1,5 ати и времени обработки от 10 до 40 минут.

Таблица 1. Характеристики выбранных зерновых круп

Название крупы	Содержание белков, г	Содержание жиров, г	Содержание углеводов, г
Кукурузная крупа	8,5	1,0	75
Ячневая крупа	13,0	1,3	65,2
Пшеничная крупа	15,5	1,3	67,9

*Заявленные производителями значения пищевой ценности круп на 100 г продукта

Для гидролиза использовали ферментные препараты Protex 40E и Протосубтилин ГЗх в концентрациях 1-4% от массы крупы (Табл. 2). Время гидролиза 1,5-2 часа. Гидролизаты отфуговывали при 12000 об/мин, 20 мин на центрифуге Eppendorf 5010R (Germany) и профильтровывали с помощью вакуумной фильтрации. Ферментоллизаты дополняли компонентами (г/л): глицерин 2,52, NaCl 250, MgSO₄×7H₂O 20, KCl 3,0, цитрат Na 3,0, CaCl₂ 0,2.

Таблица 2. Характеристики используемых ферментных препаратов

Фермент	Описание	pH	T, °C
Protex 40E (Genencor, USA)	Бактериальная щелочная протеаза <i>Bacillus subtilis</i> , активатор – ионы кальция	8,6	55
Протосубтилин ГЗх (Sibbiopharm, Россия)	Комплекс, содержащий нейтральные и щелочные протеазы <i>Bacillus subtilis</i> и ряд сопутствующих ферментов: β-глюканазу, целлюлазу, ксиланазу, α-амилазу	6,5	50

Для усиления протеолитической активности галобактерий в среду вносили ZnSO₄×7H₂O, MnSO₄×H₂O, FeSO₄×7 H₂O в различных концентрациях. Определение протеолитической активности с казеином в качестве субстрата проводили согласно статье [Murzina E.D., 2017, Dosadina E.E., 2018].

Активность роста галобактерий определяли по изменению оптической плотности спектрофотометром UV-2600 (Shimadzu, Japan) при длине волны 660 нм с последующим пересчетом на основе сухого веса с использованием калибровочной кривой (для палочковидных форм галобактерий). Подсчет клеток в небольших

объемах суспензии при разных уровнях разбавления проводили с помощью фазово-контрастного микроскопа.

Каротиноиды определяли по методике [Dummer M., 2011, Мурзина Е.Д., 2017] на ВЭЖХ (Agilent 1100) с колонкой Diasfer-110-C18 (5 $\mu\text{м}$, 250 мм * 4,6 мм) (BioChemMak ST, Россия), на базе ФГБУН ИНЭОС им. А. Н. Несмеянова РАН.

Аминокислотный состав образцов проводили по методике [Trofimova L., 2016] на ВЭЖХ L-8800 (Hitachi, Ltd.) с колонкой Hitachi Ion-Exchange Column 2622SC (4,6 мм * 80 мм) (Hitachi, Ltd., P/N 855-3508) на базе НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова.

Галобактерии культивировали при использовании ферментоллизатов пшеничной и ячневой круп в лабораторных биореакторах Minifors (Infors, Швейцария) с рабочим объемом 3 л (общий объемом 5 л) и Фермус (Нижний Новгород) с рабочим объемом 7 л (общий объем 10 л) в течении 7 суток при pH 7,5 – 7,8, температуре 37,5 – 38,5 $^{\circ}\text{C}$ при освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640. В качестве инокулята использовали культуру галобактерий *H. salinarum* в стационарной фазе роста в объеме 10% об. Высокоплотностное непрерывное культивирование проводили с использованием мембранного модуля (NFY-4021S) и перистальтических насосов Longer Pump.

Для сушки готовили высококонцентрированную суспензию галобактерий: 1 объем биомассы, изначально нормализованной по оптической плотности до 3,15 г/л к 1 объему супернатанта [Kalenov S.V., 2016].

Образцы сушили на распылительной сушке В-290, (компания ВÜСНI, Швейцария) с двухпоточным пневматическим соплом с внутренним диаметром 0,7 мм. Параметры сушки представлены в таблице 3. Высушивание оптимизировали с помощью искусственной нейронной сети с тремя нейронами в выходном слое, которые соответствовали концентрации каротиноидов в биомассе сразу после сушки, через 4, 6 месяцев и через год.

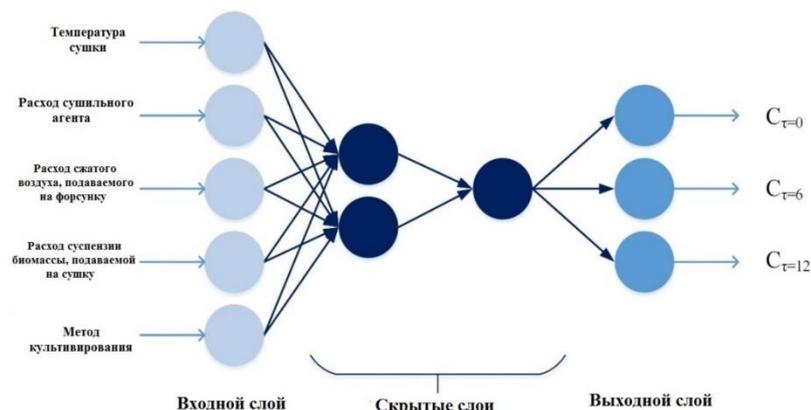


Рис. 1. Выбранная нейронная сеть

Режимы обеспечивали минимальное разрушение каротиноидов и приемлемое содержание влаги в образцах. Модель ANN также учитывала некоторые изменения содержания каротиноидов при хранении и влияние метода культивирования. Данная сеть схематично отражена на рисунке 1. Нейронная сеть была использована для расчета неизвестных значений на всем диапазоне исследуемых параметров.

Лиофильную сушку образцов проводили на CoolSafe 55-4 (ScanVak, Denmark).

Высушенные образцы хранили при температуре 4⁰С в течение 2 лет. В процессе хранения осуществлялся отбор проб непосредственно после высушивания, спустя 4, 6 и 12 месяцев с целью определения микробиологических и биохимических характеристик образцов.

Таблица 3. Параметры распылительной сушки

Номер опыта	Температура сушки, °С	Расход сушильного агента, м ³ /ч	Расход сжатого воздуха, подаваемого на форсунку, м ³ /ч	Расход суспензии биомассы, подаваемой на сушку, кг/ч
1	150	34	1,05	0,342
2	120	30	1,05	0,342
3	150	30	0,67	0,342
4	120	34	0,67	0,342
5	150	30	1,05	0,207
6	120	34	1,05	0,207
7	150	34	0,67	0,207
8	120	30	0,67	0,207
9	150	30	1,05	0,342
10	120	34	1,05	0,342
11	150	34	0,67	0,342
12	120	30	0,67	0,342
13	150	34	1,05	0,207
14	120	30	1,05	0,207
15	150	30	0,67	0,207
16	120	90	0,67	0,207

При получении количественных показателей исследования проводили не менее, чем в трех биологических повторностях, и использовали средние показатели.

Электронно-микроскопические исследования высушенных образцов проводили на фазово-контрастном микроскопе Nikon Eclipse Ci (Nikon, Japan), трансмиссионном электронном микроскопе JEM-100CX2 (JEOL, Japan) и сканирующем электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL, Japan) на базе ЦКП РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Глава 3. «РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ»

3.1. Культивирование галобактерий на ферментолизатах зерновых.

Впервые для культивирования *H. salinarum*, которые не способны потреблять углеводы, использовали ферментолизаты зерновых культур, полученные обработкой

нейтральными и щелочными протеазами бактерий рода *Bacillus*, характеризующимися низкой стоимостью, что предпочтительно для промышленного применения. На основании предварительных экспериментов и сравнительной оценки ферментных препаратов по критериям ферментативной активности отобраны ферментные препараты Protex 40E и Протосубтилин ГЗх.

Для получения ферментоллизатов предварительно проводили тепловую обработку перемолотой крупы, при этом варьировали продолжительность и давление острого пара. Оптимальное значение соотношения субстрата и воды равно 1:10. Ферментолиз проводили при различных количествах вносимого фермента. Концентрацию сырого протеина в ферментоллизатах определяли методом Кьельдаля. Концентрации сырого протеина в полученных ферментоллизатах пшеничной, ячневой и кукурузной круп и среде для культивирования галобактерий, содержащей триптон и дрожжевой экстракт, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Концентрации сырого протеина в ферментоллизатах и стандартной среде для культивирования галобактерий

Источник углерода	Концентрация сырого протеина в среде, г/л
Гидролизат пшеничной крупы	10,3±0,7
Гидролизат ячневой крупы	7,5±0,5
Гидролизат кукурузной крупы	5,4±0,4
Дрожжевой экстракт и триптон	5,5±0,4

Оптимальные концентрации солей $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4 \times H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$, существенно влияющих на выход биомассы и внутриклеточную протеолитическую активность, составили 1, 0,3, 25 мг/л питательной среды, соответственно для всех зерновых. Максимальная протеолитическая активность отмечена через сутки после начала эксперимента.

Таблица 5. Характеристики культивирования *H. salinarum* на выбранных ферментоллизатах зерновых

Фермент	Крупа	Концентрация биомассы, г/л	Концентрация каротиноидов, мг/100 г биомассы	Протеазная активность на 24 час, ед/г биомассы
Протосубтилин ГЗх	Пшеничная	2,7 – 3,1	17	7,7
	Ячневая	2,5 – 2,8	11	12,0
Protex 40E	Кукурузная	2,2 – 2,4	11	–
Стандартная среда		2,8 – 3,0	29	–
При добавлении в среду солей металлов ($ZnSO_4 \times 7H_2O$, $MnSO_4 \times H_2O$, $FeSO_4 \times 7H_2O$)				
Протосубтилин ГЗх	Пшеничная	4,3 – 4,4	23	11,2
	Ячневая	4,1 – 4,2	19	14,2
Protex 40E	Кукурузная	3,2 – 3,3	13	3,0

Непрерывное культивирование *H. salinarum* 353П (номер ВКПМ В-1739) и *H. salinarum* 353П-1 (номер ВКПМ В-12794) в ферментере с мембранным модулем проводили на ферментолизатах пшеничной и ячневой круп. Подачу питательной среды и отбор фильтрата через мембранный модуль включали при накоплении биомассы 3 г/л с одинаковой скоростью, которую увеличивали по мере нарастания биомассы. Оптимальная скорость подачи питательной среды в реактор для устойчивого накопления биомассы найдена экспериментально и описывается эмпирической формулой для протока $D=C_{\text{БМ}} \times 8,3 \times 10^{-3} \text{ ч}^{-1}$, при pO_2 5-10%, pH 7,5-7,8. При концентрации биомассы галобактерий около 20-21 г/л скорость протока



Рис. 2. Комплекс для высокоплотного культивирования галобактерий.

фиксировали на уровне $0,175 \text{ ч}^{-1}$, pO_2 поднимали до 15-20%, биомасса начинала интенсивнее накапливать каротиноиды. За 7 суток культивирования концентрация биомассы достигала 46-48 г/л при содержании каротиноидов от 23 до 29 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П и от 27 до 35 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П-1.

3.2. Высушивание биомассы галобактерий в распылительной сушилке.

Диапазоны параметров (табл. 3) распылительного высушивания подобраны при следующих характеристиках, применяемых к высушенной биомассе: уровень влажности не более 5%, минимальная деградация каротиноидов, максимальное содержание биомассы и уровень жизнеспособности клеток.

Жизнеспособные клетки в готовом препарате биологически активных добавок недопустимы. Однако, галобактерии непатогенны для человека и животных, а их разрушение происходит в желудочно-кишечном тракте, причем содержимое клеток обладает пребиотическими свойствами. В таком случае требование к инаktivации клеток галобактерий нецелесообразно.

Для оценки жизнеспособности применялись ранее не учитываемые биологические характеристики: максимальная удельная скорость роста, оценка лаг-фазы и содержание каротиноидов, определяемые после регидратации высушенной биомассы при культивировании в жидких средах.

Максимально допустимая скорость подачи биомассы для сушки была определена при минимальной скорости сушки газа и сжатого воздуха, так что температура сушки на выходе газа не падала ниже 55 ° С; и минимально приемлемая скорость подачи биомассы для сушки не позволяла температуре выходящего сушильного газа превышать 80 ° С при максимальной скорости сушильного газа.

Высушенные образцы имели влажность 1,7 – 5%, содержание биомассы 51–54%, содержания каротиноидов снизилось на 5 – 29% для образцов, прокультивированных без адсорбента (варианты А), на 3 – 35% для образцов, культивированных с адсорбентом (варианты Б). Начальное содержание каротиноидов в биомассе составляло $29 \pm 2,3$ мг на 100 г для варианта А и $17 \pm 1,3$ мг на 100 г при культивировании с адсорбентом (вариант Б). Удаление метаболитов из среды в процессе культивирования с использованием адсорбентов способствовало увеличению сохранности клеток в течение длительного времени после сушки.

В таблицах 6, 7 приведены образцы, подвергшиеся воздействию стресса в различных режимах распылительной сушки. Образцы 13 и 5 испытывали максимальное стрессирование, 4 и 12 – минимальное.

Таблица 6. Сводная таблица характеристик, высушенных на распылительной сушилке образцов, прокультивированных на среде без адсорбента (вариант А)

N	Время хранения, месяц								
	0			4			12		
	μ_{max} , час ⁻¹	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г продукта	μ_{max} , час ⁻¹	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г продукта	μ_{max} , час ⁻¹	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г продукта
1	0,0081±0,0021	-	12,25±0,93	0,0517±0,0080	-	10,58±1,78	0,0047±0,0007	-	4,68±0,32
2	0,0062±0,0018	-	13,02±1,07	0,0411±0,0067	-	12,38±1,23	0,0048±0,0012	-	4,78±0,37
3	0,0077±0,0016	-	12,64±0,90	0,0515±0,0078	-	10,52±1,56	0,0061±0,0008	-	5,26±1,29
4	0,0057±0,0017	-	12,17±0,85	0,0480±0,0069	-	12,16±0,75	0,0055±0,0008	-	4,94±1,18
5	0,0067±0,0017	-	13,53±1,04	0,0524±0,0072	-	9,68±0,76	0,0036±0,0009	-	4,06±0,91
6	0,0062±0,0019	-	12,70±1,18	0,0377±0,0141	-	10,07±1,84	0,0041±0,0010	+	3,82±0,96
7	0,0040±0,0006	-	13,15±1,47	0,0574±0,0094	-	10,39±2,46	0,0073±0,0012	-	4,15±0,37
8	0,0120±0,0021	-	12,32±1,18	0,0622±0,0096	+	10,71±2,42	0,0039±0,0006	-	3,85±0,37
9	0,0080±0,0011	-	13,92±1,24	0,0496±0,0087	-	10,71±1,35	0,0045±0,0008	-	4,03±0,36
10	0,0047±0,0006	-	12,57±1,24	0,0460±0,0133	-	11,61±2,43	0,0047±0,0011	-	5,22±0,45
11	0,0083±0,0014	-	11,10±1,25	0,0520±0,0153	+	10,97±1,85	0,0074±0,0017	-	5,58±0,40
12	0,0056±0,0010	-	14,75±1,81	0,0385±0,0057	+	12,19±3,03	0,0060±0,0017	+	4,65±0,39
13	0,0084±0,0016	-	12,19±1,02	0,0584±0,0096	-	9,89±0,78	0,0045±0,0013	-	4,12±0,28
14	0,0057±0,0009	-	12,76±1,21	0,0546±0,0086	-	9,94±1,12	0,0037±0,0011	-	4,04±0,86
15	0,0074±0,0011	-	11,74±0,93	0,0560±0,0138	+	10,52±1,64	0,0047±0,0013	-	5,52±0,53
16	0,0052±0,0008	-	13,15±1,80	0,0450±0,0107	-	10,39±1,41	0,0041±0,0010	-	4,11±0,69

Таблица 7. Сводная таблица характеристик, высушенных на распылительной сушилке образцов, прокультивированных на среде с адсорбентом (вариант Б)

N	Время хранения, месяц								
	0			4			12		
	μ_{\max} , час ⁻¹	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г продукта	μ_{\max} , час ⁻¹	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г продукта	μ_{\max} , час ⁻¹	Факт роста	Каротиноиды, мг/100 г продукта
1	0,0057±0,0018	-	6,54±0,44	0,0274±0,0042	+	6,35±0,57	0,0037±0,0012	-	2,37±0,19
2	0,0062±0,0019	-	5,97±0,45	0,0648±0,0120	-	5,52±1,18	0,0035±0,0008	-	2,05±0,13
3	0,0047±0,0013	-	8,66±0,71	0,0328±0,0057	-	6,48±0,78	0,0027±0,0007	+	1,86±0,16
4	0,0043±0,0013	-	8,27±0,81	0,0730±0,0193	-	6,22±1,16	0,0031±0,0005	+	1,03±0,24
5	0,0053±0,0015	-	7,50±0,80	0,0460±0,0125	-	6,61±1,70	0,0032±0,0008	-	3,34±0,83
6	0,0038±0,0010	-	6,61±0,59	0,0797±0,0120	-	6,35±1,51	0,0047±0,0007	-	1,26±0,32
7	0,0064±0,0010	+	7,18±0,54	0,0421±0,0070	+	6,54±1,49	0,0027±0,0007	+	2,76±0,64
8	0,0095±0,0014	+	6,29±0,62	0,0757±0,0112	+	5,97±1,48	0,0044±0,0007	+	1,94±0,44
9	0,0055±0,0010	-	6,74±0,59	0,0430±0,0109	+	6,29±1,29	0,0021±0,0006	-	1,76±0,36
10	0,0053±0,0010	+	6,29±0,80	0,1050±0,0177	+	5,82±1,37	0,0089±0,0013	-	0,98±0,21
11	0,0066±0,0011	+	6,35±0,63	0,0370±0,0097	+	5,45±1,31	0,0023±0,0007	+	1,68±0,42
12	0,0036±0,0006	+	8,88±0,79	0,0747±0,0125	+	6,03±1,42	0,0021±0,0007	+	1,35±0,32
13	0,0049±0,0008	-	8,47±0,55	0,0434±0,0065	-	6,95±0,54	0,0035±0,0010	-	3,86±0,44
14	0,0033±0,0005	-	6,35±0,62	0,0630±0,0147	-	6,16±0,39	0,0042±0,0012	-	1,73±0,29
15	0,0036±0,0006	-	7,83±0,88	0,0360±0,0100	-	6,92±0,64	0,0025±0,0007	-	3,39±0,72
16	0,0040±0,0006	-	6,27±0,54	0,0670±0,0194	-	5,89±0,64	0,0023±0,0007	-	2,12±0,36

При высушивании клетки галобактерий инкапсулируют в солевые кристаллы. При помощи сканирующей электронной микроскопии показано, что средние диаметры частиц при режимах сушки 13 и 5 (табл. 6, 7) составляли 11–14 мкм, при режимах сушки 4 и 12 (табл. 6, 7) – 22–26 мкм (рис. 3). Рыхлые и полые солевые гранулы образовывались при большей температуре сушильного агента на входе, а более плотные и сглаженные – при меньшей. Лиофильно высушенные клетки представлены на рисунке 3 (з-и).

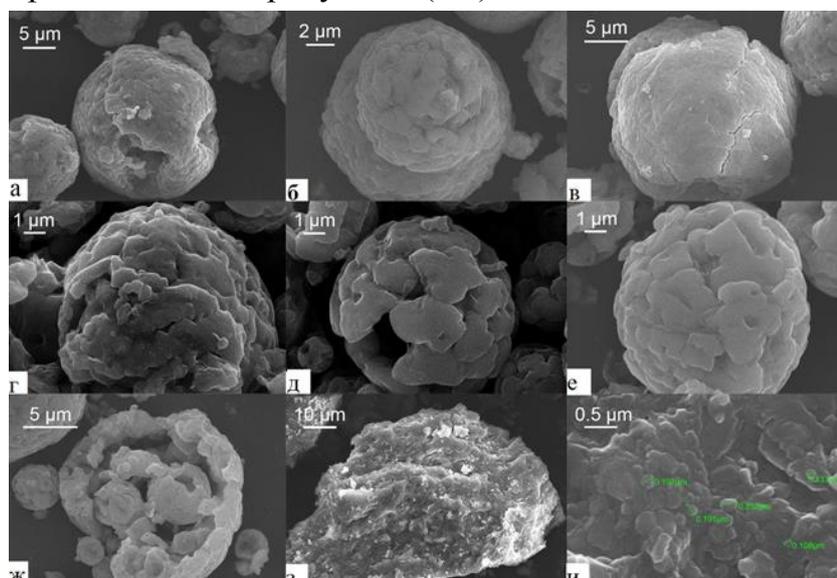


Рис. 3. Фотографии частиц, полученных после высушивания на распылительной сушилке (а-ж) и высушенных методом лиофилизации (з-и), выполненные при помощи СЭМ

Высушенные образцы регидратировали в минеральном растворе питательной среды и культивировали в жидких средах в колбах. Характерные кривые роста распылительно высушенных образцов в жидкой среде приведены на рисунке 4 и имеют ряд особенностей: нарастание оптической плотности и резкое ее падение с

последующим возобновлением роста культуры, что связано с нарастанием изначально сферических клеток, а затем с их трансформацией в палочки. Это уменьшение показано во второй части кривой и было связано с делением палочковидных галобактерий и трансформацией оставшихся сферопластов. В таблицах 6, 7 приведены значения μ_{\max} после снижения оптической плотности.

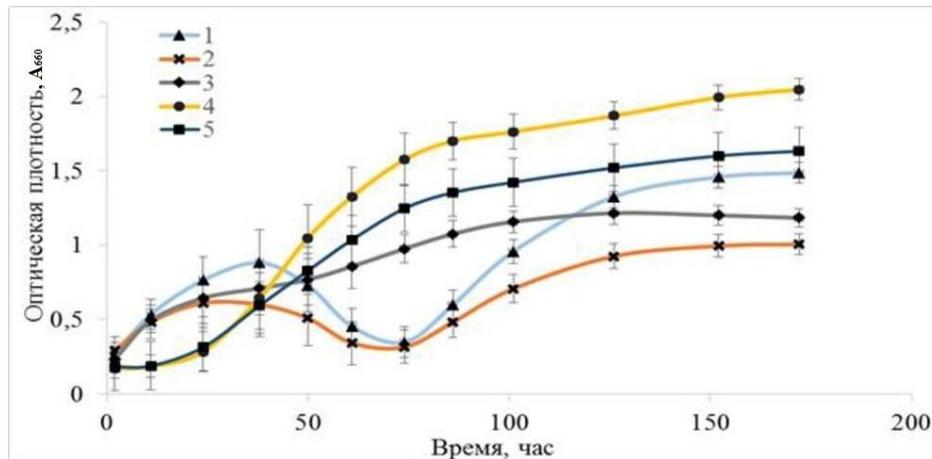
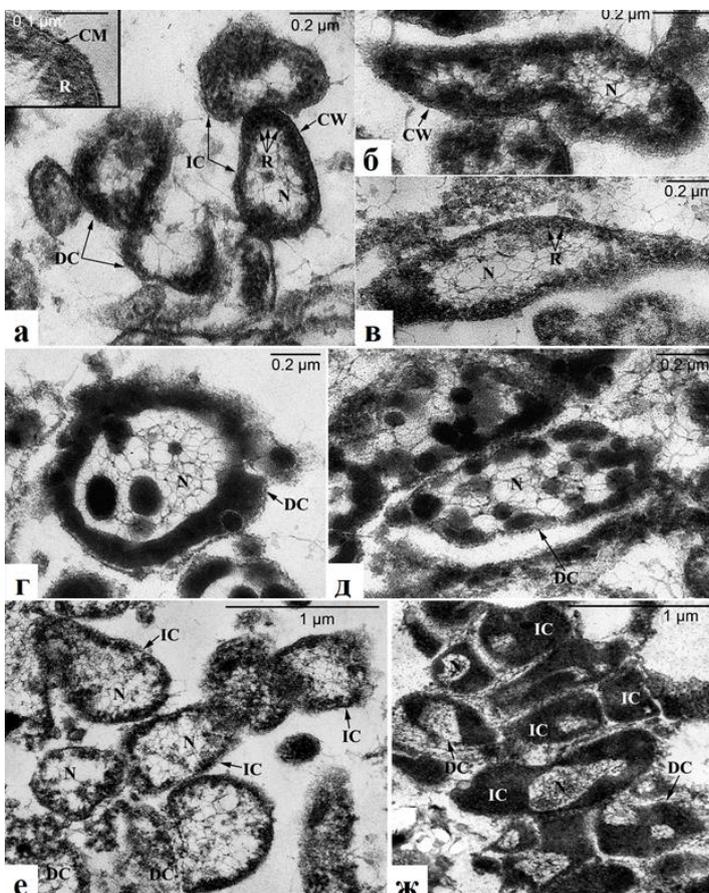


Рис. 4. Кривые роста для образцов: 1 – образцы, высушенные на распылительной сушке, после культивирования на среде с адсорбентом (вариант Б), 2 – образцы, высушенные на распылительной сушке, после культивирования на среде без адсорбента (вариант А), 3 – лиофильно высушенные образцы, 4 – образцы суспензии жизнеспособных галобактерий после культивирования на среде с адсорбентом (вариант Б), 5 – образцы суспензии жизнеспособных галобактерий после культивирования на среде без адсорбента (вариант А).



При анализе ультратонких срезов (рис. 5) показаны повреждения цитоплазматической мембраны, что служит показателем степени летальных повреждений для каждого метода сушки:

Рис. 5. Ультратонкие срезы клеток: а-в) 4А – сразу после распылительной сушки; г-д) 13Б – через год хранения; е) 13А – через год хранения; ж) лиофильно высушенный образец (культивирование с адсорбентом) после года хранения. DC – нарушенные клетки, IC – intactные клетки, N – нуклеоид, CM – цитоплазматическая мембрана, CW – клеточная стенка, R – рибосомы.

- Образец 4А сразу после распылительной сушки – хорошая сохранность клеточных стенок, одиночные или множественные клеточные разрывы;
- Образцы 13А и 13В после 1 года хранения – утонченная оболочка, в основном из-за практически отсутствующей клеточной стенки, локальные единичные или множественные повреждения по всей оболочке;
- Лиофилизированный образец через 1 год хранения – обширная и плотная цитоплазма, клеточные стенки интактных клеток тонкие и неравномерные по толщине, у некоторых клеток в конгломератах обнаружены локальные разрывы мембран; в отличие от вариантов 4А и 13, эти повреждения сопровождались выделением ДНК из клеток (аналогично сдавливанию) в узком (из-за плотной упаковки клеток в конгломератах) межклеточном пространстве.

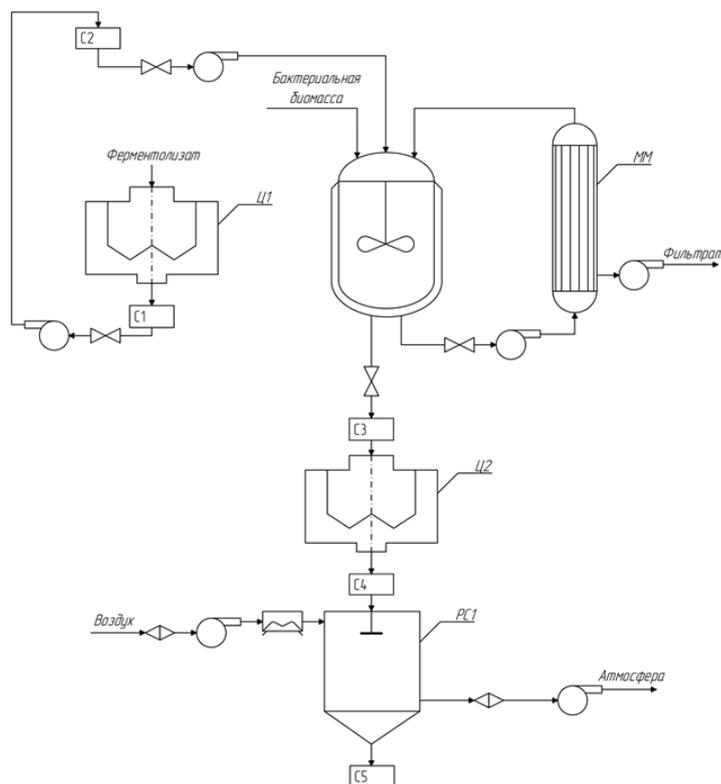
Для всех распылительно высушенных в изученных режимах (табл. 3) образцов галобактерий, хранившихся при минимальном содержании влаги и температуре 4⁰С, отмечено улучшение характеристик реактивации после четырех месяцев хранения и ухудшение характеристик реактивации при последующем хранении. При этом содержание каротиноидов в образцах высушенной биомассы, полученной при культивировании на среде без адсорбента (вариант А), было снижено на 14-32%, в то время как для образцов, культивируемых с адсорбентом (вариант Б) – на 24-40%, минимальная оптическая плотность изменялась до 55–75 ч. Скорость роста увеличилась в десять раз и была выше в образцах Б. Значения основных характеристик после шести месяцев хранения ухудшались на 10-15% по сравнению с предыдущими.

В образцах сроком хранения один год содержание каротиноидов уменьшалось на 64-75% в образцах А и на 58-89% в образцах Б. На порядок были снижены значения μ_{max} , высеваемость на агаризованной среде, а минимальная оптическая плотность варьировалась от 90 до 150 ч культивирования.

Такие данные, с одной стороны, свидетельствуют о процессах репарации повреждений, которые происходят при низкой температуре в кристаллах и малом влагосодержании, с другой – при более длительном хранении возможно отравление клеток метаболитами.

Прооксидантные свойства среды культивирования [Kalenov S.V., 2016] заметно влияли на выработку каротиноидов и в то же время ухудшали показатели реактивации галобактерий после распылительной сушки и хранения. Удаление метаболитов и продуктов окисления из среды при культивировании с добавлением

адсорбента заметно улучшали сохранение клеточной структуры галобактерий при внедрении в кристалл соли и дальнейшую реактивацию.



Оптимальные условия распылительного высушивания биомассы: температура входящего сушильного газа от 120 до 135 °С, расход сушильного газа 30 – 31 м³/ч, расход сжатого воздуха 831 л/ч, скорость подачи биомассы 5 – 5,7 г/мин.

На основе полученных результатов разработана схема получения готового препарата – биомассы галобактерий *H. salinarum* на ферментолізатах зерновых.

Рис. 3. Аппаратная схема получения готового продукта - биомассы галобактерий *H. salinarum* на ферментолізатах зерновых. С – сборник, Ц – центрифуга, ММ – мембранный модуль, РС – установка распылительной сушки.

ВЫВОДЫ

1. Впервые для культивирования *H. salinarum* использованы ферментолізаты зерновых на основе пшеничной и ячневой круп. Для обработки зернового сырья подобран режим тепловой предобработки острым паром (1 ати, 20 минут) и ферментный препарат Протосубтилин ГЗх.

2. На основе ферментолізатов пшеничной и ячневой круп составлены питательные среды для культивирования галобактерий, которые по своим характеристикам превосходят стандартные среды для культивирования галобактерий на комплексных субстратах – источниках аминокислот и ростовых факторов, включающие дорогостоящие триптон, пептон и дрожжевой экстракт. Важной составляющей разработанных питательных сред являются источники микроэлементов, оптимальные концентрации которых подобраны: соли Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , которые влияют на протеолитическую активность галобактерий, степень потребления белка, накопление биомассы и каротиноидов.

3. Разработаны режимы культивирования галобактерий в мембранном биореакторе при использовании питательных сред на ферментолізатах пшеницы и

ячменя. За 7 суток культивирования содержание биомассы достигало 46-48 г/л при содержании каротиноидов 29 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П (ВКПМ В-1739) и до 35 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П-1 (ВКПМ В-12794).

4. С помощью искусственных нейронных сетей определены оптимальные для сохранности каротиноидов режимы распылительной сушки биомассы *H. salinarum* для получения высушенного продукта с остаточной влажностью <5%: температура входного сушильного газа должна находиться в пределах от 120 до 130 °С; расход сушильного газа – в диапазоне от 30 до 31 м³ / ч; расход сжатого воздуха – 831 л/час; скорость подачи суспензии биомассы зависит от условий культивирования и составляет 5,7 г/мин для стандартного варианта, и 5,0 г/мин для культивирования с удалением метаболитов, влияющих на выработку каротиноидов.

5. Изучены характеристики инкапсулированных в соль клеток галобактерий, полученных при распылительной сушке и в процессе длительного хранения, с помощью электронной микроскопии установлен характер повреждений клеток.

6. Установлен факт сохраняющейся активности и восстановления жизнеспособности клеток галобактерий в высушенном состоянии в солевых гранулах при низкой остаточной влажности до 5% и температуре 4 °С. Максимум улучшения характеристик реактивации приходится на четвертый месяц хранения. Для комплексного описания высушенных образцов предложено использовать характеристики глубинного культивирования, отражающие скорость реактивации клеток.

7. Показано отрицательное влияние метаболитов, вырабатываемых при культивировании галобактерий, на показатели реактивации при длительном хранении после высушивания. Удаление метаболитов при культивировании галобактерий, способствует после распылительной сушки более длительному сохранению жизнеспособности части клеток – они лучше сохраняют свою структуру при внедрении в кристалл и в некоторых случаях реактивируются на агаризованной среде после 2-х лет хранения.

8. Штамм *H. salinarum* 353 П-1 (патент № РФ 2662996) и внедрение результатов исследования позволили улучшить показатели на участке опытно-промышленного производства получения биомассы *H. salinarum* с высоким содержанием биологически активных веществ, а также оптимизировать условия высушивания и хранения биомассы.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Мурзина Е. Д.**, Калёнов С. В., Побережный Д. Ю., Гордиенко М. Г., Ильин М. М. Биологические характеристики при оптимизации распылительной сушки галобактерий *Halobacterium salinarum* // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 46. № 6. С. 19–23.
2. **Murzina E. D.**, Grosheva V. D., Savelyeva E. E., Belov A. A., Kalenov S. V. Enzymatic cereal hydrolysates for cultivation and *Halobacterium salinarum* biomass production // 17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2017. Vol. 17 of Advances in Biotechnology. Vienna, Austria, 2017. P. 235–242.
3. Kalenov S. V., Gordienko M. G., **Murzina E. D.**, et al. *Halobacterium salinarum* storage and rehydration after spray drying and optimization of the processes for preservation of carotenoids // Extremophiles. 2018. Vol. 22. №. 3. P. 511–523.

Список научных публикаций в других изданиях:

1. **Мурзина Е. Д.**, Занина О. С., Бутырин С. П. и др. Интегральная характеристика процесса распылительной сушки галобактерий // Успехи в химии и химической технологии. Т. 29. 2015. С. 93–95.
2. Занина О. С., **Мурзина Е. Д.**, Борисов В. Д. и др. Изучение управляющих факторов развития экстремально галофильного микробного сообщества // Биотехнология: состояние и перспективы развития. Т. 1. 2015. С. 342–344.
3. **Мурзина Е. Д.**, Нагаева В. Е., Калёнов С. В. Культивирование галобактерий *Halobacterium salinarum* 353П на синтетических средах // Успехи в химии и химической технологии. Т. 30. РХТУ им. Д. И. Менделеева Москва, 2016. С. 25–27.
4. **Мурзина Е. Д.**, Бутырин С. П., Побережный Д. Ю. и др. Влияние метаболитов на хранение биомассы галобактерий *Halobacterium salinarum*, полученной при распылительной сушке // Совр. проблемы химической технологии биологически активных веществ / Под ред. Г. Авраменко, А. Е. Коваленко, Ю. А. Пенкина, В. В. Смагина. Т. 188. РХТУ им. Д. И. Менделеева Москва, 2016. С. 249–251.
5. **Мурзина Е. Д.**, Побережный Д. Ю., Бутырин С. П. и др. Исследование распылительной сушки галобактерий // Медицинская химия: фундаментальные и прикладные аспекты. XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Т. 4. Уральское отделение Российской академии наук Екатеринбург, 2016. С. 520–520.
6. **Мурзина Е. Д.**, Бутырин С. П., Побережный Д. Ю., Тумаев М. Д. и др. Экспресс-методика анализа C₅₀-каротиноидов галофильных микроорганизмов // Химическая промышленность сегодня. 2017. № 7. С. 10–17.

Патенты и авторские свидетельства:

1. Штамм *Halobacterium salinarum*, используемый для получения бактериальных препаратов: пат. 2662996 Рос. Федерация. № 2017108747; заявл. 16.03.2017; опубл. 31.07.2018, Бюл. № 22. 10 с.