



На правах рукописи

**Калёнов Сергей Владимирович**

**Биотехнология и применение  
микроорганизмов, выделенных из  
гиперсоленых сред**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора технических наук

**Москва – 2021**

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор  
**Складнев Дмитрий Анатольевич**, главный научный сотрудник лаборатории выживаемости микроорганизмов ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
**Коннова Светлана Анатольевна**, заведующая кафедрой биохимии и биофизики ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского»

доктор технических наук, профессор  
**Борисенко Евгений Георгиевич**, профессор кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

доктор технических наук, старший научный сотрудник  
**Похиленко Виктор Данилович**, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 года в 11:00 на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ имени Д. И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <https://diss.muctr.ru/author/1129/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 999.095.03  
кандидат технических наук, доцент

Шакир Ирина  
Васильевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Исследование физиологической активности микроорганизмов в экстремальных состояниях может дать импульс к созданию новых биопрепаратов и совершенствованию технологий получения широкого спектра ценных биологически активных соединений. При ведении процессов культивирования экстремофильных микроорганизмов (в условиях, которые принято считать экстремальными для большинства промышленных культур), способность управлять физиологическими реакциями клеток и возможность целенаправленного биосинтеза представляет важный резерв для развития промышленной биотехнологии.

Функционирование на грани выживаемости, в условиях повышенного осмотического давления при максимальном уровне солености, при высокой температуре и облучении, в условиях оксидативного стресса, на фоне межвидовой конкуренции, а также различной плотности популяции и доступности субстратов ведет к набору физиологических реакций, управление которыми может служить средством для совершенствования процессов управляемого культивирования микроорганизмов.

Поиск новых вариантов биосинтетических ответов клеток микроорганизмов на вышеперечисленные воздействия особенно интересен среди природных или искусственно сформированных лабораторных микробных сообществ, включающих экстремофильные культуры. Изучение многообразных обменных реакций внутри таких экстремофильных сообществ, установление вырабатываемых клетками веществ-регуляторов и продуктов метаболизма является более комплексным подходом, чем исследование традиционных биотехнологических процессов на основе монокультур. Биотехнологический потенциал и возможности особых метаболических путей, которые необходимы для существования сообществ экстремофильных культур, могут обеспечить синтез более широкого спектра ценных, практически значимых биологически активных соединений.

В этой связи особенно интересны экотопы с экстремальными условиями, формирующие уникальные биоценозы микроорганизмов-экстремофилов, прежде всего – галофильные сообщества. Экстремально галофильные микроорганизмы обладают уникальным метаболизмом, который обусловлен необходимостью выживания клеток в водоёмах с максимальным уровнем солености среды. Кроме того, в естественной среде обитания эти микроорганизмы встречаются с интенсивным солнечным облучением, несущим ультрафиолет, температурными аномалиями, резкими изменениями в обеспечении кислородом, окислительным стрессом, нехваткой питательных веществ, высыханием и регидратацией, которые определяют особенности общего и энергетического метаболизма галофилов.

Экстремальные галофилы уже десятки лет используются в ряде биотехнологических процессов. Наиболее исследованным экстремальным галофильным микроорганизмом являются галоархеи *Halobacterium salinarum*, биоактивные компоненты и биомасса которого находят различное практическое применение.

---

### Список используемых сокращений:

БАС – биологически активные соединения; БР – бактериородопсин; БАВ – биологически активные вещества; ИНС – искусственная нейронная сеть; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; АСБ – абсолютно сухая биомасса; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; АФК – активные формы кислорода; ПМ – пурпурные мембраны

Актуальность совершенствования биотехнологии галофильных микроорганизмов обоснована расширением, например, медицинского применения специфических биологически активных веществ, таких как каротиноиды, ферменты, гликопротеины галофилов, галоцины галоархей, полярные фосфолипиды и археосомы галоархей.

Однако, биотехнологический потенциал галофилов не раскрыт достаточно полно, что связано с наличием “белых пятен” в изученности физиологии клеток и применением стандартных (не достаточно адаптированных для галофилов) методов промышленного культивирования. Последнее приводит к неоптимальному функционированию продуцентов и незначительным выходам биосинтеза клетками целевых продуктов, выпуск препаратов на основе галофилов ограничивается малыми партиями.

В любых естественных условиях микроорганизмы существуют в виде достаточно устойчивых микробных сообществ, обладающих системой внутренних обменных реакций и связей. Для развития биотехнологии экстремофильных микроорганизмов особенно интересно знать и важно использовать полезные свойства микробных сообществ экстремальных экосистем. Изучение метаболизма сопутствующих и находящихся в тесном взаимодействии с экстремальными галофилами микроорганизмов, а также расширение знаний о принципах функционирования экстремофильных сообществ, несомненно, может помочь в разработке биопрепаратов для применения в новых, ранее *не предполагавшихся* областях. Так, мало изучена роль, казалось бы, контаминирующих гиперсоленые среды бактерий рода *Bacillus* и родственных им, которые не обладают высокой галотолерантностью. Среди этих бацилл можно найти и продуцентов протеаз и виды, обладающие высокой уреазной активностью и биокальцинирующей способностью, которая востребована при строительстве и восстановлении изделий из бетона. Примером перспективного использования высокогалотолерантных микроорганизмов из галофильных сообществ можно считать культуры, которые обладают свойствами деструкторов трудно разлагаемых токсичных соединений (пестицидов, нефти и т.п.) и активно работают в широком диапазоне солености среды.

Публикации последнего времени позволяют говорить о нарастающем интересе со стороны косметических и фармацевтических фирм к галоархеям и галофильным бактериям. Переключение такого внимания с одного из наиболее изученных из синтезируемых галоархеями продуктов – фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина на исследования, связанные с общим пулом галобактериальных и галоархейных метаболитов/компонентов, позволяет судить о заинтересованности крупнейших игроков на рынке косметики и фармацевтики в препаратах на основе галофилов. При этом следует отметить, что технологии производства этих препаратов весьма далеки от оптимальности.

Таким образом, исследовательская часть работы состояла в изучении особенностей чистых культур галофильных микроорганизмов и галофильных микробных сообществ с целью использования уникальных биосинтетических способностей этих природных экстремофилов для реализации в биотехнологических процессах, нацеленных на различные варианты практического применения.

**Цель работы** состояла в разработке промышленной малоотходной технологии культивирования экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum*, включающей высокоавтоматизированное регулирование биосинтеза целевых продуктов и оптимизацию сохранения получаемой биомассы, а также в использовании потенциала экстремально галофильных сообществ для реализации природоподобной технологии биокальцинирования.

**Задачи**, решавшиеся в ходе исследования:

– Комплексный анализ сообществ экстремальных галофилов, отдельных микроорганизмов во взаимосвязи с физико-химическими особенностями среды их обитания;

– Определение пределов устойчивости отдельных микроорганизмов и сообществ экстремальных галофилов, изучение стратегий адаптации галофилов в составе сообществ при изменении параметров окружающей среды и состава микробного сообщества (в том числе в критических физико-химических условиях, приводящих к кардинальному изменению состава сообщества);

– Изучение особенностей метаболизма экстремальных галофилов в изменяемых физико-химических условиях: выяснение механизмов защиты микроорганизмов при высушивании/регидратации, повышении/понижении температуры, при различных значениях pH, облучении (различной мощности и спектра) т.д.;

– Изучение механизмов генетической регуляции клеточного и фотозависимого энергетического метаболизма галофилов и влияние их на выработку практически значимых БАС. Обобщение результатов исследований механизмов, лежащих в основе регуляции синтеза каротиноидов и бактериородопсина у производственных культур экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum*;

– Анализ перспектив практического применения экстремально галофильных микроорганизмов и подходов к их культивированию;

– Разработка оптимального состава питательных сред для культивирования производственных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*;

– Оптимизация режимов культивирования и разработка высокоплотностного культивирования производственных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*;

– Создание высокоавтоматизированного комплекса и разработка адаптивного программного обеспечения для культивирования производственных штаммов *Hbt. salinarum*;

– Оптимизация режимов распылительной сушки биомассы галоархей *Hbt. salinarum* для увеличения срока хранения как самой биомассы, так и для сохранения в ней каротиноидов;

– Анализ и технико-экономическая оценка различных вариантов производства биомассы *Hbt. salinarum* и бактериородопсина, разработка высокоэффективной технологической схемы промышленного производства;

– Изучение возможности для создания биопрепарата, основанного на принципе биогенного карбонатогенеза в присутствии микроорганизмов из сообществ гиперсоленых сред, для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона.

### **Научная новизна работы**

1. При оптимизации синтетической питательной среды для культивирования галоархей *Hbt. salinarum*, было показано стрессирующее действие продуктов окисления/фотоокисления ароматических кислот, что влияет на уровень накопления биомассы, а также на активность биосинтеза каротиноидов и БР.

2. Показано, что антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущей культуры находятся в тесной взаимосвязи и определяют биосинтетическую активность штаммов-продуцентов при высокоплотностном культивировании. На основании исследования этих связей впервые предложен алгоритм управления режимами высокоплотностного культивирования *Hbt. salinarum*, обеспечивающий заданную направленность биосинтетических активностей клеток этих галоархей.

3. Для культур экстремальных галоархей показана возможность высокоплотностного культивирования с удалением из ростовой среды или предотвращением образования ингибиторов биосинтеза целевых БАС. Для разных штаммов *Hbt. salinarum* показана возможность синтеза бактериородопсина или каротиноидов в высокоплотностном режиме.

4. Впервые для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* использованы ферментоллизаты зерновых как источники аминокислотного питания и ростовых факторов.

5. Оптимизирован процесс распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum*, исследовано длительное хранение высушенной биомассы, изучен характер сопутствующих повреждений клеток экстремально галофильных архей.

6. Доказано, что при нестерильном культивировании экстремально галофильных архей и высокогалотолерантных бактерий возможна контаминация и быстрое замещение исходных культур микроорганизмов-продуцентов. Впервые показана возможность развития негалотолерантных бактерий рода *Bacillus* совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями в условиях экстремально высокой солености среды. Показана возможность индукции галовирусов непосредственно в ходе культивирования экстремально галофильных архей.

7. Из микробных сообществ гиперсоленых сред выделены в чистом виде бактериальные культуры, обладающие высокой уреазной активностью и способностью к биокальцинированию.

### **Практическая значимость работы**

1. Разработаны новые варианты синтетических сред для культивирования промышленных штаммов галоархей *Hbt. salinarum*, предложен состав комплексной питательной среды для экстремальных галофильных продуцентов каротиноидов и бактериородопсина.

2. Получены новые высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum*: несколько штаммов-продуцентов фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент С<sub>50</sub>-каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению вирусами. Новые культуры депонированы в официальных Коллекциях микроорганизмов (Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НБЦ ВКПМ и коллекции уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM).

3. Подобраны оптимальные условия, обеспечивающие высокую эффективность процесса культивирования галоархей *Hbt. salinarum*, включающие способ подготовки посевного материала, внесение антиоксидантов, режимы и спектральные характеристики освещения культур. Оптимальные условия разработаны для непрерывного и высокоплотностного режимов культивирования штаммов-продуцентов каротиноидов и бактериородопсина промышленного уровня.

4. Создан высокоавтоматизированный комплекс для культивирования галофильных микроорганизмов, разработан опытно-промышленный регламент эксплуатации этого комплекса и программное обеспечение “BioDrome 3.0” для управления биосинтетическими процессами, в которое интегрирована экспресс-методика определения содержания бактериородопсина. Управление комплексом обеспечивает поддержание оптимизированных режимов культивирования и разработанных вариантов автоматической регуляции биосинтеза серии целевых БАС, синтезируемых галофильными микроорганизмами.

5. Разработаны новые составы питательных сред для культивирования промышленных штаммов галоархей *Hbt. salinarum* на основе ферментоллизатов зерновых, полностью обеспечивающие потребности клеток в питании и ростовых факторах для высокоэффективного биосинтеза каротиноидов.

6. Определены режимы распылительной сушки биомассы галоархей *Hbt. salinarum* обеспечивающие оптимальные условия сохранения целостности и самих клеток, и накопленных в них каротиноидов. Оптимизирован режим для получения высушенной биомассы галоархей с остаточной влажностью <5%.

7. При проведении модельных культивирований экстремальных галофилов в нестерильных условиях определены подходы, снижающие вероятность контаминации и её отрицательные эффекты: подавление роста и лизис целевых культур при развитии посторонней микрофлоры и вирусного заражения.

8. Разработан опытно-промышленный регламент производства биомассы экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum* и фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина.

9. Предложено использовать продукты лизиса галоархей *Hbt. salinarum* для создания новых медицинских препаратов комплексного действия. Мембран-ассоциированные протеазы галоархей долговременно стабильны при физиологической температуре, а каротиноиды галоархей являются прекрасными протекторами от активных форм кислорода для ферментов, ДНК и других биологически активных соединений. Стабилизированный (иммобилизованный) лизат клеток галоархей *Hbt. salinarum* может использоваться в ветеринарии и косметологии для лечения и профилактики различных заболеваний, в том числе и кожных.

10. Разработан лабораторный технологический регламент производства иммобилизованной формы биопрепарата, обладающего высокой биокальцинирующей активностью и устойчивостью к щелочной среде для использования в качестве технической добавки, улучшающей функциональные и защитные характеристики бетона. Основой биопрепарата являются чистые культуры бактерий *Lysinibacillus macroides*, выделенные из микробного сообщества гиперсоленого озера. Разработанный регламент обеспечивает биотехнологическое получение биопрепарата и его длительное хранение.

11. Автоматизированный комплекс для культивирования микроорганизмов и разработанное программное обеспечение “BioDrome 3.0” и его элементы используется в научных исследованиях, а также в учебном процессе в РХТУ им. Д.И. Менделеева на кафедре биотехнологии и кафедре процессов и аппаратов химической технологии. Ранние версии ПО “BioDrome” использовались в научных исследованиях на стендах ГУП НПО “Астрофизика”, ВНИИ Молочной промышленности. Разработаны новые способы культивирования микроорганизмов, защищенные патентами РФ.

#### **Связь работы с научными программами**

Исследования выполнены в 2001-2020 годах в рамках и при поддержке следующих научных программ, грантов, НИР, контрактов: грант РФФИ 16-19-10469 “Разработка технологии получения импортозамещающих пищевых ингредиентов и белковых кормовых продуктов, обогащенных функциональными компонентами, на основе возобновляемого растительного сырья” (2016-2020 гг.); госзадание Минобрнауки 4.5404.2011 “Разработка высокоэффективных методов биосинтеза и биологической очистки на основе контролируемого окислительного стресса как нового подхода к управляемому культивированию микроорганизмов” (2012-2013 гг.); грант “Темпус” 2010 – 3358/001-001 “Реформа высшего образования по биотехнологии: разработка и усовершенствование стандартов и учебных планов по подготовке бакалавров и магистров” (2010-2014 гг.); НИР в рамках ФЦП ГК № 02.740.11.0784 “Биоинженерия и биологическая основа новых высокоэффективных методов культивирования микроорганизмов и их применение в микробиологическом синтезе, при переработке отходов и биологической очистке” (2010-2012 гг.); НИР в рамках АВЦП 2.1.1/3817 “Физиолого-биохимические и генетические основы управления микробным синтезом в условиях контролируемого стресса” (2009-2010 гг.); НИР в рамках АВЦП РНП 2.1.1.6.177 “Изучение коммуникационных взаимодействий в сообществе микроорганизмов при их структурной организации” (2006 г.); АВП (направление 3907) “Разработка технологий высокоинтенсивного и ресурсосберегающего биокатализа и биосинтеза для получения продуктов кормового, пищевого и технического

назначения” (2005 г.); НИР 529/15.3-01-04 “Оптимизация и разработка методик проведения процесса культивирования штаммов галообактерий с использованием лазеров и светодиодов” (2004 г.); НИР 506/15.3-6-02ГБ “Разработка измерительных систем лазерного биореактора и их отработка в экспериментах” (2002 г.); НИР Минобразования РФ 2.6.2.(00.0)221.009 “Создание лабораторного биореактора и локальной системы программного обеспечения для комплекса практических занятий удаленного доступа для подготовки инженеров по специальности «Биотехнология»” (2001-2002 гг.).

**На защиту выносятся следующие основные положения:**

1. Разработаны композиции питательных сред для культивирования экстремальных галофилов, учитывающие химическую/фотохимическую трансформацию компонентов среды и метаболитов, синтезируемых в процессе культивирования.

2. Предложены высокоавтоматизированные способы и аппаратурное оформление для промышленного культивирования экстремальных галофилов в непрерывных и высокоплотностных режимах, нивелирующие образование ингибиторов биосинтеза целевых продуктов.

3. Разработано универсальное программное обеспечение (для управления биотехнологическими процессами, включая высокоплотностное культивирование экстремальных галофилов промышленного уровня), в которое интегрированы стратегии регуляции биосинтеза целевых БАС, синтезируемых галофилами.

4. Для снижения стоимости производства биомассы и различных БАС синтезируемых экстремальными галофилами, предложена замена традиционных полноценных ростовых сред на ферментоллизаты зерна как источники аминокислотного питания и ростовых факторов.

5. Оптимизированы режимы распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum*, исследованы процессы хранения и регидратации клеток.

6. Разработана технология высокоплотностного культивирования галоархей *Hbt. salinarum* для производства биомассы, бактериородопсина и каротиноидов галоархей.

7. Разработана иммобилизованная форма биопрепарата для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона на основе бактерий *Lysinibacillus macroides*, выделенных из гиперсоленого озера.

**Апробация результатов работы**

Основные результаты и положения диссертационной работы были представлены и доложены на следующих российских и международных научно-технических конференциях и конгрессах: Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2005, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015 гг.); Международная конференция «Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LabVIEW и технологии National Instruments» (Москва, 2003, 2004 гг.); Международный Форум «Высокие технологии XXI века» (Москва, 2004, 2006, 2012 гг.); European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004, Oostende, Belgium); International Scientific GeoConference SGEM (Albena, Vienna, 2017, 2018, 2019, 2020); Международная школа-конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2006 г.); Международная конференция молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ» (Москва, 2002, 2015, 2016, 2020 гг.); X Московский международный салон инноваций и инвестиций (Москва, 2010); Международная конференция «Minds in Touch – IX Edition» (Неаполь, 2010); Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ» (Москва, 2016); XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016); XVIII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2016); XVII Международная научная конференция «Математические методы в технике и технологиях – ММТТ-17»



(Кострома, 2004 г.); VI Межвузовская учебно-методическая конференция «Многоуровневая подготовка и качество образования» (Москва, 2004).

### **Публикации по теме диссертации**

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 42 работах, из них 19 в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК Минобрнауки РФ, в том числе 13 публикаций в журналах, индексируемых в международных информационно-аналитических системах научного цитирования (Web of Science и Scopus), получены 3 патента на изобретение РФ, 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ; подготовлены 2 монографии и 2 учебных пособия.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из 3-х глав, включая введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты экспериментальных исследований и их обсуждение, заключение, выводы, библиографический список, включающий 1309 наименований и 6 приложений. Текст диссертации изложен на 588 страницах, иллюстрирован 67 рисунками и 22 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цель и задачи, показаны научная новизна и практическая значимость.

**В главе 1 «Обзор литературы»** произведен анализ имеющихся знаний о галофильных микроорганизмах, их экологии, биологии и биотехнологическом потенциале. В данной главе приведена общая характеристика экстремофильных и полиэкстремофильных микроорганизмов с акцентом на галофильные бактерии и археи; описаны различные особенности гиперсоленых сред обитания, в частности природа стрессорного воздействия таких сред на биоту; дано описание таксономического разнообразия галофильных архей, бактерий, эукариот и вирусов; рассмотрены геохимические и экологические особенности классических примеров гиперсоленых ценозов: солнечных солевых, Большого Соленого Озера, Мертвого моря, озер Вади ан-Натрун и глубоководных гиперсоленых анаэробных бассейнов Красного и Средиземного морей. Произведен анализ ряда физиологических, молекулярно-биологических и биохимических особенностей галофильных микроорганизмов, в частности морфологии и специфики строения клеток галофильных бактерий и архей, природы уникальных БАВ, адаптивных систем и механизмов, особенностей питания, метаболизма и др. Описан биотехнологический потенциал галофильных бактерий и архей в процессах производства ферментированной пищи, как активного компонента в составе биобетона, а также их потенциал и перспективы как продуцентов различных экстремозимов, бактериородопсина, полисахаридов и биопластиков; произведен анализ имеющихся данных о подходах к культивированию и оптимизации ростовых сред и условий культивирования галофильных микроорганизмов для промышленного получения биомассы, каротиноидов, бактериородопсина, галоэнзимов и биополимеров; рассмотрены проблемы и примеры культивирования галофилов в опытно-промышленных и промышленных масштабах; описаны примеры и особенности процесса сохранения биомассы микроорганизмов, в том числе галофильных.

**В главе 2 «Материалы и методы исследования»** описаны объекты исследования и методы, примененные в работе.

В исследовании использовали штаммы галоархей, депонированные в ВКПМ (Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов): штамм дикого типа, продуцент каротиноидов *Hbt. salinarum* 353П (ВКПМ В-1739), продуцент каротиноидов *Hbt.*

*salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794); продуценты бактериородопсина: *Hbt. salinarum* ET-1001, *Hbt. salinarum* D96N и штамм *Hbt. salinarum* КСК-03307 (ВКПМ В-10286), полученный из ET-1001 модифицированным методом индуцированного мутагенеза.

При исследовании карбонатогенеза использовали микроорганизмы из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева: *Bacillus subtilis* К, *Bacillus subtilis* М, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, а также микроорганизмы, выделенные методом накопительных культур на среде с мочевиной из эко- и техногенных систем и идентифицированные анализом последовательности генов 16S рРНК.

Для культивирования *Hbt. salinarum* и *Halomonas utahensis* использовали разработанные комплексные среды на основе триптона и дрожжевого экстракта. Также, для культивирования *Hbt. salinarum* разработали и оптимизировали синтетические среды на основе аминокислот.

Культивирование уробактерий осуществляли на классических и модифицированных средах LB, Кристенсена и Дика (Dick et al., 2006). Активность роста уробактерий определяли по оптической плотности суспензии на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Япония) при длине волны 540 нм.

#### Глубинное культивирование галоархей и галобактерий в колбах

Культивирование в конических 100 и 250 мл колбах, накрытых колпачками из фольги для предотвращения чрезмерного испарения, проводили в периодических условиях на орбитальном шейкере G10 (New Brunswick Sci, USA) при 150 об./мин, освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 и HAGEN T8 Marine Glo 20Вт (500 Лк на уровне колб, интенсивность освещения изменяли в специфических экспериментах), температуре 38,5 °С, также применяли светодиоды и светодиодные матрицы разных длин волн различных производителей. В ряде случаев для культивирования использовали адсорбенты: активированный уголь АГ-3 (АО “Сорбент”) или Hypersol-Macronet MN500 (Purolite, США).

#### Глубинное культивирование галоархей в биореакторе

Эксперименты в стеклянных лабораторных биореакторах Фермус-3 (НИЦ “Биоавтоматика”, Нижний Новгород, Россия) с рабочими объемами 7,5 л (общий объем 10 л), 3,5 л (общий объем 5 л), Minifors (Infors, Швейцария) с рабочим объемом 3 л (общий объем 5 л) и BioFlo-110 (New Brunswick Sci, USA) с рабочим объемом 0,9 л (общий объем 1,3 л) проводили при 38,5 °С с автоматическим регулированием pH, pO<sub>2</sub>, температуры при освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640, HAGEN T8 Marine Glo 20Вт и светодиодными матрицами 465 нм и белого света через стекло биореактора, мощность облучения контролировали люксметром-УФ-радиометром ТКА-01/3 (ООО НТП “ТКА”, Россия). Для управления процессом культивирования использовали программное обеспечение “BioDrome 3.0”. Культивирование с рециклом культуральной жидкости с клетками через адсорбент проводили с использованием адсорбционной колонны. Высокоплотностное культивирование штаммов-продуцентов каротиноидов в мембранном биореакторе проводили с использованием половолоконного модуля Novospring NFY-4021S.

Клеточный рост оценивали по изменению оптической плотности при  $\lambda$  660 нм (спектрофотометр UV-2600 Shimadzu, Япония) с последующим пересчетом на сухой вес по калибровочной кривой (для палочковидных галоархей).

Прямое определение содержания БР осуществляли по методике, разработанной Shand и Betlach (1991). Непосредственное выделение БР в составе пурпурных мембран производили согласно методике Oesterhelt и Stoeckenius (1974). Для выяснения динамики накопления БР разработали экспресс-методику, основанную на цветовом анализе суспензии. Для этого суспензию галоархей непрерывно прокачивали через кювету определенной толщины и сканировали с помощью CCD (Charge Coupled Device) матрицы. В

модифицированной экспресс-методике применяли зонд обратного рассеяния R200-7-VIS-NIR (Ocean Optics, США).

Анализ каротиноидов в биомассе галоархей проводили согласно методике, приведенной Dummer et al. (2011) с использованием ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent, США) и аналитической колонки для обращеннофазной хроматографии Диасфер-110-C18 (4,6×250 мм, диаметр частиц 5 мкм) (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия). Фазово-контрастную микроскопию проводили с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония), оснащенного камерой ProgRes SpeedXT (Jenoptic, Германия).

Исследование роста галоархей на гидролизатах зерновых производили с использованием кукурузной, пшеничной и ячневой круп, которые измельчали, разводили определенным объемом воды и выдерживали 10 – 40 минут при 0,7 – 1,5 ати в автоклаве. После предварительной температурной обработки образцы гидролизovali ферментами Protex 40E (Genencor, USA) и Протосубтилин Г3х (Сиббиофарм, Россия) в течение 1-2 часов. Полученные гидролизаты центрифугировали, супернатант профильтровывали и использовали в качестве субстрата для выращивания галоархей. Протеолитическую активность ферментов, применяемых для гидролиза круп, определяли с помощью модифицированной методики Kunitz (1946). Определение аминокислотного состава гидролизатов осуществляли по методике Никишин et al. (2017).

Для исследования и оптимизации процессов высушивания и долгосрочного хранения галоархеи сушили распылительно и лиофилизировали. Биомассу получали культивированием *Hbt. salinarum* в двух вариантах: без адсорбента (варианты А) и с адсорбентом (варианты В). Выращенные глубинные культуры галоархей нормировали по оптической плотности, после чего центрифугировали. Пасту биомассы разводили в супернатанте и высушивали. Распылительную сушку биосуспензии осуществляли на установке Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, Flawil, Switzerland). При исследовании процесса сушки использовали следующие диапазоны рабочих параметров: температура сушильного агента (воздуха) на входе в аппарат ( $T_{da}$ ) – от 120 до 150 °С; расход сушильного агента ( $F_{da}$ ) – от 30 до 34 м<sup>3</sup>/ч; расход сжатого воздуха ( $F_{pa}$ ) (давление 5 бар) – от 667 до 1052 л/ч; расход биомассы, подаваемой на сушку ( $F_b$ ) – от 3,45 до 5,7 г/мин. Варианты режимов распылительной сушки, использовавшиеся для более подробных исследований и оптимизации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Режимы распылительной сушки для оптимизации с помощью ИНС.

Режим	$T_{da}$ , °С	$F_{da}$ , м <sup>3</sup> /ч	$F_{pa}$ , л/ч	$F_b$ , г/мин.
1	150	34	1052	5,7
2	120	30	1052	5,7
3	150	30	667	5,7
4	120	34	667	5,7
5	150	30	1052	3,45
6	120	34	1052	3,45
7	150	34	667	3,45
8	120	30	667	3,45
9	150	30	1052	5,7
10	120	34	1052	5,7
11	150	34	667	5,7
12	120	30	667	5,7
13	150	34	1052	3,45
14	120	30	1052	3,45
15	150	30	667	3,45
16	120	90	667	3,45

Лиофилизацию образцов осуществляли на установке CoolSafe 55-4 (ScanVac, Дания). Хранение высушенных образцов осуществляли при температуре 4 °С в полностью заполненных герметичных баночках, экранированных от света. В процессе хранения отбирали пробы непосредственно после высушивания, спустя 4, 6 и 12 месяцев для определения микробиологических и биохимических характеристик.

Ультратонкие срезы высушенных образцов исследовали на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100CX2 (JEOL, Japan) при ускоряющем напряжении 80 кВ на базе ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН. Микроструктуру образцов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии на микроскопе JSM-6510LV (JEOL, Япония). Средний гидродинамический радиус и распределение частиц по размерам определяли методом фотон-корреляционной спектроскопии на анализаторе Photocor Compact-Z (Photocor, Россия). Выбор оптимальных параметров процесса распылительной сушки биомассы галоархей и продолжительности хранения высушенных образцов определяли при помощи разработанной нейросетевой модели.

Галовирусы выделяли из образцов, отобранных в гиперсоленых ценозах и из лабораторных и полупромышленных процессов культивирования галоархей. Исследование оптимальных условий инфицирования и условий индукции вирусов проводили для разных рН, температуры, фазы роста. Инфицирование производили в течение 24 часов непосредственно при глубинном культивировании в колбах, после чего образцы инфицированной культуры в серии разведений питательной средой без цитрата натрия высеивали на твердую среду или в полужидкий агар по методу Грация (Адамс, 1961). Электронную микроскопию вирусных частиц осуществляли на просвечивающем электронном микроскопе JEM-100CX2 (JEOL, Japan) при ускоряющем напряжении 80 кВ на базе ЦКП “Коллекция UNIQEM” ФИЦ Биотехнологии РАН.

Для анализа образцов культуральной жидкости и экстрактов с адсорбентов использовали жидкостной хроматограф Agilent 1100 (Agilent, США) с диодной матрицей. Экстракцию из адсорбентов производили смесью гексан/изопропанол (1:1). При анализе использовали колонку Kromasil 100 DMB (EKA Chemicals, Швеция), элюент: гексан/изопропанол, расход: 1мл/мин, температура термостата: 20 °С, УФ детектирование на длинах волн 225, 254 и 270 нм. Анализ культуральной жидкости проводили с использованием колонки Диасфер-110-С18 (4,6×250 мм, диаметр частиц 5 мкм) (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия). Элюент: 0,5% фосфорная кислота, расход: 1мл/мин, температура термостата: 20 °С, УФ детектирование на длинах волн 225, 254 и 270 нм.

Для получения образцов цементного камня формовали образцы на основе портландцемента (ЦЕМ I 42,5Н ГОСТ 31108–2003 производства “Подольскцемент”) при В/Ц (водоцементное соотношение) = 0,31. Твердение образцов проходило в воздушно-влажных условиях (22±2 °С и 100 % относительной влажности), испытания проводили на 7, 21 и 28 сутки. Испытание на прочность проводили на машине ELE Auto со скоростью нагружения 0,15 МПа/с. Открытую пористость цементного камня определяли гравиметрическим методом с использованием керосина в качестве насыщающей жидкости. Коэффициент капиллярного водопоглощения оценивали стандартным методом как тангенс угла наклона на линейном участке зависимости  $\Delta M = f(\tau)^{1/2}$ .

**В главе 3 «Результаты и обсуждение»** приведены и проанализированы основные экспериментальные данные.

### **Выбор и оптимизация питательных сред для промышленного использования при культивировании экстремально галофильных микроорганизмов**

Экстремально галофильные микроорганизмы выработали эффективные системы регуляции и адаптации для выживания в чрезвычайно изменчивых условиях своей среды

обитания. Отбору устойчивых субпопуляций экстремальных галофилов способствует высокая частота спонтанных мутаций, а также функционирование специфических физиолого-биохимических систем галофилов, которые могут дать преимущество в сложившемся сообществе микроорганизмов и при определенных физико-химических параметрах.

Склонность к спонтанным мутациям, которым способствует неоптимальный состав питательной среды и стрессирование микроорганизмов, создает проблемы для устойчивого культивирования специализированных штаммов экстремальных галофилов, особенно в вариантах непрерывного и высокоплотностного культивирования. Для экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum* – продуцентов бактериородопсина, которые являются признанными модельными и практически значимыми микроорганизмами, чувствительность к изменению условий и составу питательных сред проявляется очень ярко. В данной работе на примере наиболее изученных культур галофильных архей предлагаются технологические подходы, применимые и для других групп экстремально галофильных микроорганизмов.

Сравнение состава синтетических и комплексных сред, а также природы метаболитов и возможных продуктов трансформации в процессе культивирования крайне важно для оптимизации состава практически значимых комплексных питательных сред. Оптимизация полностью синтетических сред под конкретные штаммы-продуценты, выяснение минимальных требований по питанию и устранение избыточных, а, иногда, мешающих компонентов необходимо для разработки процесса культивирования промышленного масштаба.

#### **Синтетические питательные среды для *Hbt. salinarum*, особенности субстратной специфичности разных штаммов**

В основных работах, посвященных исследованию и разработкам синтетических сред для *Hbt. salinarum* отражены общие требования по питанию без указания специфики выращиваемых штаммов. В настоящее время для культивирования и поддержания культур экстремальных галофилов предпочитают комплексные среды, и обратный переход к синтетическим может быть затруднен. Использование достаточно богатой синтетической питательной среды с 18 аминокислотами при расसेве *Hbt. salinarum* 353П (ВКПМ В-1739), ET-1001, D96N, КСК-03307 (ВКПМ В-10286) на агаризованную среду не приводило к существенному росту колоний или к росту оптической плотности в глубинной культуре при пересеве с комплексной среды. Последовательные пересевы быстрорастущих колоний в системе градиента концентраций питательных сред позволили добиться значимого роста на агаризованной синтетической среде, а потом и в глубинной культуре для исследуемых штаммов за исключением КСК-03307.

В процессе оптимизации вариантов питательных сред удалось исключить и заменить ряд компонентов, а также с помощью методов математического планирования оптимизировать концентрации оставшихся (Таблица 2).

Среди аминокислот таблицы 2 наибольшие изменения по сравнению с базовой средой в абсолютных концентрациях коснулись аргинина и валина, а также глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые положительно влияют на синтез каротиноидов и бактериородопсина. Особого внимания заслуживают изменения в концентрациях цистеина и метионина – мощных антиоксидантов, которые вносят значимый вклад в накопление, в первую очередь, бактериородопсина. Ароматические аминокислоты – фенилаланин и тирозин необходимы для роста, но при длительном культивировании могут генерировать продукты фотоокисления, их оптимум для синтеза каротиноидов и бактериородопсина лежит ниже значений базовой среды.

Следует отметить, что клетки D96N показывают схожие с ET-1001 отклики на производимые изменения в среде. Синтез бактериородопсина культуры D96N снижен относительно ET-1001 на 10-15%.

Таблица 2. Оптимизированные среды для накопления биомассы (Б/м), каротиноидов (Кар.), бактериородопсина (БР) разных штаммов *Hbt. salinarum*.

№	Компоненты сред, г/л	В исходной среде, г/л	Компоненты оптимизированных сред для <i>Hbt. salinarum</i> , г/л			
			353П		ЕТ-1001	
			Б/м	Кар.	Б/м	БР
1	DL-аланин	0,43	0,33	0,37	0,27	0,35
2	L-аргинин	0,40	0,91	1,21	1,05	1,27
3	DL-аспарагиновая кислота	0,45	–	0,34	–	0,43
4	L-цистеин	0,05	0,07	0,14	0,10	0,15
5	L-глутаминовая кислота	1,3	1,08	2,80	1,20	2,91
6	L-глицин	0,06	–	–	–	–
7	DL-гистидин	0,30	0,30	0,44	0,30	0,53
8	DL-изолейцин	0,44	0,36	0,11	0,40	0,17
9	L-лейцин	0,8	0,66	0,39	0,53	0,31
10	L-лизин	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
11	DL-метионин	0,37	0,37	0,56	0,37	0,71
12	DL-фенилаланин	0,26	0,26	0,14	0,26	0,11
13	L-пролин	0,05	–	–	–	–
14	DL-серин	0,61	–	–	–	–
15	DL-треонин	0,50	–	–	–	–
16	L-тирозин	0,20	0,20	0,16	0,20	0,15
17	DL-триптофан	0,05	–	–	–	–
18	DL-валин	1,0	1,61	2,28	1,75	2,47
19	АМФ	0,1	–	–	–	–
20	УМФ	0,1	–	–	–	–
21	Рибонуклеиновая кислота	–	0,35	0,35	0,35	0,35
22	KNO <sub>3</sub>	0,1	–	–	–	–
23	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05	0,15	0,15	0,15	0,15
24	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05	0,15	0,15	0,15	0,15
25	Глицерин	1 мл/л	1 мл/л	1 мл/л	1 мл/л	3 мл/л
26	Биотин	1×10 <sup>-4</sup>	*	*	*	*
27	Фолиевая кислота	1,5×10 <sup>-4</sup>	*	*	*	*
28	Витамин B <sub>12</sub>	2×10 <sup>-5</sup>	*	*	*	*

В наименовании столбцов указаны переменные отклика, оптимизация проводилась по накоплению: Б/м – биомассы, Кар. – каротиноидов, БР – бактериородопсина; \* – компоненты не являются необходимыми, концентрации микроэлементов не оптимизировались.

В настоящем исследовании было показано, что даже штамм дикого типа *Hbt. salinarum* 353П оказался чувствителен к концентрации триптофана 50 мг/л в базовой среде. Еще большей чувствительностью к триптофану обладал штамм ЕТ-1001. Во многих случаях с использованием в среде фотоокисленного триптофана галоархеи не росли совершенно или накапливали минимум биомассы – 5-10% от возможного уровня. Тирозин и фенилаланин менее чувствительны к фотоокислению, или же их фотопродукты оказались менее токсичны по отношению к галоархеям. Продукты фотоокисления тирозина приводили более к индукции каротиноидов, некоторому ингибированию роста и существенному ингибированию синтеза бактериородопсина.

Существенный вклад в нарушение сохранности среды вносит ее стерилизация паром – продукты химического/фотохимического окисления тирозина (маркеры

оксидативного воздействия) явно проявляются в культуральной жидкости после предварительной стерилизации среды и последующего культивирования.

Результаты культивирования в колбах с использованием оптимизированных сред и базовой без триптофана, подвергнутых предварительно стерилизующей фильтрации, представлены в таблице 3.

При незначительных отличиях в накоплении биомассы на свету и в темноте, за 7 суток при освещении на оптимизированных средах накапливается до 23 мг/100 г АСБ каротиноидов у штамма 353П и до 35 мг/л бактериородопсина у штамма ET-1001 при малой выработке каротиноидов.

Таблица 3. Влияние освещения на выработку каротиноидов, бактериородопсина и рост биомассы при культивировании на оптимизированных синтетических средах.

Вариант процесса	<i>Hbt. salinarum</i> 353П		<i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	
	Биомасса, г/л	Каротиноиды, мг/100 г АСБ	Биомасса, г/л	Бактериородопсин, мг/л
Базовая среда, освещение	2,1-2,3	16-17	1,05-1,2	8-11
Оптимизированная среда, в темноте	3,3-3,4	12-13	2,8-2,9	15-18
Оптимизированная среда, освещение	3,0-3,1	22-23	2,7-2,8	32-35

Считая каротиноиды маркерами окислительного стресса, можно с уверенностью говорить о нахождении золотой середины для штамма 353П между накоплением биомассы, не подверженной стрессу чрезмерно, и индукцией каротиноидов. Кроме этого, у штамма 353П накапливается до 15 мг/л бактериородопсина.

Преимуществом разработанной синтетической среды можно считать отсутствие посторонних примесей, контролируемый состав, что важно для выделения целевых продуктов и, особенно, бактериородопсина. Недостатком синтетических сред, в основе своей содержащих аминокислоты, является стоимость высокоочищенных аминокислот, т.к. аминокислоты кормового качества для культивирования *Hbt. salinarum* не подходят. Некоторые штаммы (например, КСК-03307) обладают настолько специфическими потребностями в питании, что подобрать компоненты среды для них затруднительно.

#### **Комплексные питательные среды, особенности их компонентов и условий культивирования, влияющие на ростовые характеристики штаммов *Hbt. salinarum*, синтез бактериородопсина и каротиноидов**

В немногочисленных статьях, посвященных культивированию *Hbt. salinarum*, основное внимание уделяется оптимизации состава среды культивирования с помощью методов математического планирования с целью повышения выхода целевых продуктов (главным образом, специфических ферментов и бактериородопсина). Найденные таким образом композиции сред содержат глицерин, комплексные источники аминокислот (триптон, казеиновые кислоты, пептон, желатин), необходимые для роста галоархей, и ростовых факторов (мясной экстракт, дрожжевой экстракт) в концентрациях, согласующихся с потребностями различных штаммов. Галоархеи нуждаются в ионах микроэлементов:  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  и др., как кофакторах некоторых их специфических ферментных систем. Микроэлементы вносятся в среду в виде солей, однако основную потребность в микроэлементах обеспечивают, конечно, источники ростовых факторов. Иногда в среду культивирования вносят дополнительные компоненты: крахмал, бентонит, кукурузную муку вероятно, с целью связывания токсичных примесей, например, желчных солей в бакто-пептоне. Неудовлетворительный рост некоторых штаммов *Hbt. salinarum* на

синтетических средах, особенности стерилизации и высокая стоимость качественных компонентов питательных сред – источников аминокислот и витаминов, обуславливают маловероятность применения синтетических композиций в производственных масштабах.

В серии экспериментов по предварительному подбору питательных компонентов комплексных питательных сред, условий аэрации и освещения для культивирования сверхпродуцента бактериородопсина КСК-03307 (ВКПМ В-10286) и штамма дикого типа – 353П (ВКПМ В-1739), в основном производящем каротиноиды.

Галоархеи имеют высокую чувствительность к составу и качеству комплексной питательной среды, особенно органических компонентов – пептона или триптона, технологии производства которых существенно варьируются. Неоптимальный аминокислотный состав и деградация некоторых компонентов, как было показано для синтетических сред, критически сказывается на показателях роста галоархей.

Эксперименты с дрожжевыми экстрактами, пептонами и триптонами разных производителей позволили выбрать подходящие артикулы коммерческих препаратов компонентов ростовых сред и их оказалось не так много среди исследуемых вариантов. Для синтеза БР штаммом КСК-03307 оптимальными оказались композиции, содержащие 5 г/л триптона (артикул подобран для синтеза БР), 2 г/л дрожжевого экстракта и 4 мл/л глицерина. При культивировании в колбах удавалось накопить до 3,04 г/л биомассы, 75 мг/л БР при максимальной удельной скорости роста  $0,054 \text{ ч}^{-1}$ . В экспериментах с некоторыми триптонами/пептонами накопление биомассы можно было довести до 3,7 г/л при максимальной удельной скорости роста до  $0,1 \text{ ч}^{-1}$  при падении синтеза БР до 44 мг/л и усилении синтеза каротиноидов. При использовании пептонов некоторых производителей у штамма КСК-03307 рост мог полностью подавляться.

Штамм 353П – продуцент каротиноидов менее чувствителен к качеству компонентов питательной среды, чем КСК-03307, его удельная скорость роста могла достигать  $0,1 \text{ ч}^{-1}$ , накопление биомассы, каротиноидов и БР – 3,6 г/л, 25-33 мг/100 г АСБ и 7 мг/л соответственно при использовании композиции, которая включала 5 г/л триптона (артикул подобран для синтеза БР), 2 г/л дрожжевого экстракта и 1 мл/л глицерина.

Уровень стрессирования клеток при культивировании на различных композициях хорошо прослеживался по спектрам лизатов биомассы, отобранной в процессе культивирования. Пики каротиноидов, как маркеров стресса, проявлялись очень быстро на неоптимальных для синтеза БР композициях.

Уровни аэрации, освещение и его спектр существенно влияли на показатели культивирования и стрессирование клеток, но критическим параметром при периодическом культивировании в колбах являлось качество питательной среды, которое емко можно определить, как устойчивость к “старению” ее компонентов. Это определение описывает всю сумму процессов, которые в частном случае исследованы в синтетической среде на примере ароматических аминокислот. Стерилизация питательной среды паром, пребывание среды при освещении и аэрации длительное время приводит к ухудшению показателей культивирования (накопление биомассы, выработка БР), особенно у чувствительных к стрессированию штаммов, что подтверждается в модельных опытах, в которых стерильную среду выдерживали в колбах на качалке без засева до шести-семи дней при аэрации и освещении, после чего вносили инокулят штамма КСК-03307. Такое “старение”, связанное в том числе и с антиоксидантной емкостью, может быть обусловлено протеканием процессов химического, фотохимического окисления непосредственно компонентов среды или трансформацией метаболитов при длительном культивировании с образованием свободных радикалов и перекисных соединений в качестве. Накопление токсичных продуктов в питательной среде в ходе культивирования подтверждается также в опытах с отработанный культуральной жидкостью (ОКЖ),



отделенной от клеток. Внесение даже малой доли ОКЖ в свежую питательную среду приводит к ухудшению показателей культивирования: ухудшается синтез БР, индуцируются каротиноиды. Разница в подавлении роста между фотоокисленной средой и ОКЖ в том, что с внесением значимых количеств ОКЖ увеличивается продолжительность лаг-фазы, за которой может следовать взрывной рост, сопровождаемый усиленным синтезом каротиноидов. В ряде микробиологических производств предпринимались попытки заместить часть среды ОКЖ для уменьшения количества стоков. К сожалению, наши данные указывают на то, что для производства и БР и каротиноидсодержащей биомассы галоархей такой подход нецелесообразен.

Негативное воздействие продуктов химического, фотохимического окисления компонентов питательной среды, метаболитов и клеточных компонентов можно снизить или устранить с помощью следующих подходов:

#### 1. Подготовка посевного материала с целью уменьшения степени подавления роста галоархей и синтеза БР продуктами, содержащимися в посевном материале

Т.к. клетки галоархей, выращиваемые в качестве посевного материала, подвергаются воздействию продуктов химического, фотохимического окисления с возможным повреждением структур самих клеток было предложено использовать адсорбенты для очистки питательной среды в процессе культивирования. Выбранные адсорбенты (активированный уголь АГ-3 и адсорбент Hupersol-Macronet MN500) подходят для эффективной сорбции высокомолекулярных органических веществ с положительным зарядом и липофильными свойствами, их преимуществом является способность к многократной регенерации, возможность стерилизации совместно с питательной средой и устойчивость во время культивирования.

Культивирование галоархей с внесением адсорбентов повышало выход биомассы до  $5,15 \pm 0,3$  г/л, выход БР – до  $125 \pm 5$  мг/л и  $\mu_{\max}$  до  $0,092$  ч<sup>-1</sup> для штамма КСК-03307. Полученный таким образом посевной материал использовался для экспериментов в биореакторе, а при хранении с адсорбентом сохранял жизнеспособность длительное время при комнатной температуре, освещении и при высыхании – внедрении клеток в солевой кристалл.

#### 2. Культивирование в режимах разбавления: доливном, непрерывном режимах

В доливном режиме в биореактор со свежеприготовленной питательной средой вносили инокулят (штамм КСК-03307), подготовленный с применением адсорбента. После суток культивирования в реактор добавили такой же объем свежеприготовленной простерилизованной питательной среды. Далее среду доливали такими же порциями каждые сутки. В этом режиме содержание кислорода в жидкости поддерживалось на уровне 5–10% от насыщения. Доливной режим приводит лишь к относительно небольшому повышению накопления биомассы и БР. Максимальный уровень накопления БР наблюдается лишь ограниченное время на третьи сутки после 2-го долива и составляет 90 мг/л. По сравнению с вариантом культивирования в периодических условиях при том же режиме аэрации галоархеи накапливают больше биомассы, с большим экономическим коэффициентом выхода от субстрата.

Для реализации хемостата биомассу (КСК-03307) сначала накапливали до 2–2,5 г/л в периодике, после чего включали проток питательной среды через биореактор перистальтическим насосом, степень разбавления постепенно доводили до  $D=0,025$  ч<sup>-1</sup>, содержание растворенного кислорода поддерживали на уровне 5% от равновесного, параметры фиксировали в установившемся состоянии. Процесс проводили в течение 3-х недель при колебаниях в уровне биомассы в пределах 3,5–4 г/л, бактериородопсина – 70–90 мг/л. При культивировании использовались светодиодные прожекторы со светодиодной матрицей голубого света ( $\lambda$  465 нм), вводимая мощность освещения 140 мВт/л.

Проведение хемостата с *Hbt. salinarum* 353П – продуцентом каротиноидов начиналось с накопления в периодике 3 г/л биомассы и включения протока, который довели до  $D=0,035 \text{ ч}^{-1}$ , при содержании растворенного кислорода 15-20% и вводимой мощности освещения 210 мВт/л прожекторами со светодиодными матрицами голубого ( $\lambda$  465 нм) и белого света. Режим освещения был подобран экспериментально и способствовал синтезу 23-29 мг/100 г АСБ каротиноидов и 7-10 мг/л БР при уровне биомассы 4,2-4,6 г/л.

### 3. Извлечение ингибиторов биосинтеза сорбентом в процессе роста

Эксперименты с доливом видоизменили прокачиванием ферментационной среды, отбираемой из биореактора, через колонку с адсорбентом на 3-и сутки культивирования с последующим её возвратом в реактор. Такой процесс с рециклом культуральной жидкости с клетками галоархей (штамм КСК-03307) через адсорбент осуществляли с внесением концентрированных субстратных подпиток.

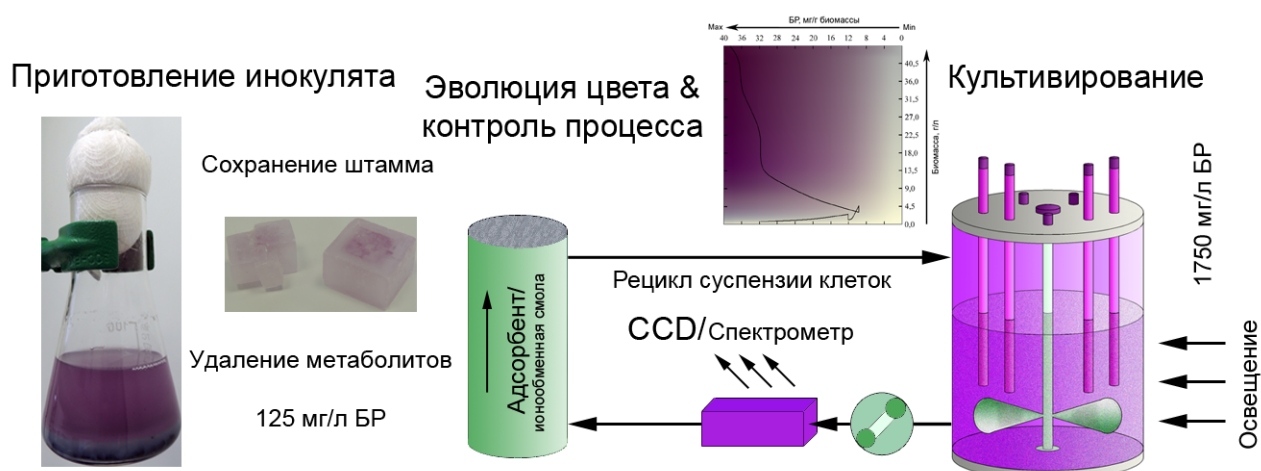


Рисунок 1. Основные подходы к высокоплотному культивированию *Hbt. salinarum* с высоким выходом бактериородопсина.

Для наблюдения за ростом галоархей и синтезом целевого продукта – бактериородопсина в режиме ферментации с прокачкой культуральной жидкости через адсорбент использовался экспресс-метод анализа содержания БР, позволяющий сравнивать показатели текущего процесса культивирования с эталонным вариантом. Экспресс-методика, разработанная нами ранее и основанная на цветовом анализе суспензии, позволила не только определять ориентировочное содержание БР в ходе культивирования, но и своевременно принимать решения для управления процессом и заменять отработанный адсорбент. В дальнейшем экспресс-методика была модифицирована – спектральные характеристики суспензии, регистрировались напрямую с помощью зонда обратного рассеяния.

Разработанный подход позволил снизить количество отходов и существенно повысить выход биомассы галоархей с контролируемым составом: 45 г/л за 8 суток при содержании БР 1750 мг/л (Рисунок 1).

Попытки культивирования других галофильных микроорганизмов, таких как *Halomonas utahensis*, *Halorubrum litoreum*, *Salicola marasensis* и *Haloferax alexandrinus* и др. с применением адсорбентов также позволили накопить высокую плотность клеток, что свидетельствует об универсальности подхода.

### 4. Оптимизация условий освещения (стимулирование роста, выработки БР при уменьшении фотохимического воздействия на среду)

С целью изучения возможности оптимизации облучения галоархей как варианта уменьшения скорости образования ингибиторов биосинтеза и стимуляции роста

проводились *тестовые опыты в колбах без адсорбентов* с использованием светодиодов, излучающих на разных длинах волн: красного ( $\lambda$  642 нм), желто-зеленого ( $\lambda$  568 нм), светло-зеленого ( $\lambda$  529), зеленого ( $\lambda$  513 нм), голубого ( $\lambda$  465 нм) света. Дополнительно использовались немонахроматические светодиоды белого света.

Большой прирост биомассы в конце активного роста и на участке замедленного роста при лимитировании кислородом по сравнению с другими отмечен при освещении светло-зелеными ( $\lambda$  529) и желто-зелеными ( $\lambda$  568 нм) светодиодами, что можно связать с нарабатываемым в этот период БР. Эксперименты со светодиодной матрицей голубого света ( $\lambda$  465 нм) показали наилучшие результаты среди вышеуказанного набора светодиодов, а также использованных в работе люминесцентных ламп. При освещении ферментационной среды светодиодной матрицей с  $\lambda$  465 нм выход биомассы в периодическом режиме культивирования повышался на 10%, а БР – на 22% по сравнению с контрольными опытами при освещении лампами дневного света PHILIPS TL-D 18W/33-640 с интенсивностью облучения 70 мВт/л. В этом варианте в начале культивирования уменьшалась лаг-фаза, быстрее наступала фаза активного роста.

Опыты с комбинацией диодов голубого и желто-зеленого света, которые проводились с нарастанием доли одного и падением доли другого участка спектра показали, что соотношение 50/50 при суммарной вводимой мощности 70 мВт/л позволяет сократить время периодического культивирования на 10-15%. Аналогичные результаты получались при комбинации по вводимой мощности 70/30 диодов голубого ( $\lambda$  465 нм) и белого света. Интенсивность падающего света при облучения светодиодами варьировалась далее в рамках от 70 мВт/л до 140 мВт/л и в этом диапазоне не приводила к заметным изменениям в выходе биомассы галоархей и БР. Повышение вводимой мощности более 140 мВт/л усиливало синтез каротиноидов и не рекомендуется для штамма КСК-03307 – продуцента БР. При культивировании в колбах с адсорбентом при оптимальном режиме освещения для этого штамма удавалось получить до 140 мг/л БР.

Оптimumом для выработки каротиноидов у штамма 353П стала вводимая мощность облучения 200-210 мВт/л и соотношение 50/50 диодов голубого ( $\lambda$  465 нм) и белого света. Дальнейшее увеличение вводимой мощности освещения в обычном периодическом процессе без использования адсорбента приводит к чрезмерному повреждению каротиноидов и быстрой их деградации в процессе хранения биомассы. Спектральные характеристики и повышенная интенсивность облучения белыми светодиодами способствуют более синтезу каротиноидов. В оптимальном для синтезе БР режиме штамм 353П может накапливать до 10 мг/л БР.

Хороший результат для синтеза БР клетками также показали специальные люминесцентные лампы HAGEN T8 Marine Glo (узкий спектральный диапазон, синий свет) в сочетании с лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 в соотношении 70/30 при суммарной вводимой мощности 70 мВт/л. Эти лампы удобно использовать при освещении поверхностей с колбами при подготовке инокулята. Светодиоды удобно использовать в составе прожекторов – матриц с отражателями для введения светового потока в биореактор.

#### 5. Применение антиоксидантов для снижения окислительных повреждений ростовой среды

Внесение антиоксидантов было призвано уберечь уязвимые компоненты среды от химического/фотохимического воздействия при длительном культивировании галоархей. Среди исследуемых антиоксидантов наиболее значимыми оказались цистеин, токоферол и аскорбиновая кислота, для которых оптимальные концентрации в периодическом процессе составили 200, 45 и 150 мг/л соответственно. Совместное действие нескольких исследованных антиоксидантов (+15-20% в выработке БР) не превышает эффект одного цистеина, роль которого в выработке БР показана уже при оптимизации синтетической

среды, однако эффект совместной антиоксидантной защиты становится заметен при повышении мощности облучения люминесцентными лампами выше 140 мВт/л (выход за рамки оптимума) и выражается в меньшем проявлении пиков каротиноидов и сохранении синтеза БР. Внесение антиоксидантов в среду стабилизирует синтез БР при длительных и высокоплотностных процессах в биореакторе и увеличивает срок службы адсорбента.

#### б. Высокоплотностное культивирование штаммов-продуцентов каротиноидов в мембранном биореакторе

Для получения высокоплотностной культуры галоархей с высоким содержанием каротиноидов проводилось культивирование с мембранным модулем. В качестве модельных культур использовали штаммы *Hbt. salinarum* 353П (ВКПМ В-1739) и *Hbt. salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794). На первой стадии в ферментер вносился инокулят, подготовленный в колбах (10% об.) и культивирование проводилось до накопления около 3 г/л биомассы при освещении диодами голубого и белого света в соотношении 50/50 и вводимой мощности около 70 мВт/л. Затем включалась подача питательной среды в биореактор и отбор фильтрата через мембранный модуль 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 этом концентрация растворенного кислорода поддерживалась на уровне 5-10%, рН саморегулировался и поддерживался при рекомендованном разбавлении в диапазоне 7,5-7,8. При концентрации биомассы галоархей около 20-21 г/л концентрацию растворенного кислорода поднимали до 15-20%, вводимую мощность освещения увеличивали до 300 мВт/л и через некоторое время биомасса начинала интенсивнее накапливать каротиноиды. Мощность освещения повышали далее на 60 мВт/л на каждые 5 г/л накопленной биомассы, и в конце культивирования она составляла около 600-630 мВт/л. За 7 суток культивирования содержание биомассы достигало 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. На этом этапе можно было часть протока, который шел исключительно через мембранный модуль направлять на слив биомассы с  $D = 0,033-0,035 \text{ ч}^{-1}$  и накапливать ее в резервуаре для последующей переработки. Как показала практика нестерильных непрерывных процессов и культивирования с мембранным модулем *Hbt. salinarum* 353П и 353П-1 возможно замещение целевых культур посторонней микрофлорой и поражение вирусами.

#### **Разработка универсального высокоавтоматизированного комплекса для культивирования микроорганизмов (с учётом особенностей экстремальных галофилов) с программным обеспечением “BioDrome 3.0”**

Культивирование галоархей, высокочувствительных к изменению ростовых условий, потребовало создания универсального гибко настраиваемого комплекса с наглядным программным обеспечением, обладающим широкими адаптивными возможностями. Такая система, созданная на базе визуального языка программирования LabVIEW, используя заложенные в ней алгоритмы, позволяет хорошо масштабировать получение микробной биомассы и целевых продуктов из лабораторного в производственный вариант исполнения, обладает возможностью быстрой модернизации, удаленным доступом для отслеживания и регулирования характеристик процессов культивирования через интернет и ведения длительных непрерывных процессов культивирования.

Возможности высокоавтоматизированного комплекса с настраиваемым программным обеспечением “BioDrome 3.0”, включающим алгоритмы управления культивирования *Hbt. salinarum* и полностью написанным на базе LabVIEW, позволяют: отслеживать ход ферментационного процесса, регистрируя такие параметры, как  $T^{\circ}$ , рН,  $pO_2$ , еН, оптическая плотность суспензии клеток культивируемого продуцента;

регулировать pH,  $pO_2$ ,  $T^\circ$ , управлять подачей питательной среды, расходом подаваемого воздуха, приводом электродвигателя ферментера, фильтровать помехи; калибровать датчики с поправочными зависимостями (например, pH,  $pO_2$  от температуры); снимать данные как в программном режиме, так и в режиме прямого доступа к памяти; работать в настраиваемых режимах: периодическом, периодическом с подпиткой субстратом, с обратной связью по показаниям датчиков, непрерывных режимах, включая культивирование с мембранным модулем или внешним контуром с адсорбционной колонкой.

Вариант компоновки высокоавтоматизированного комплекса с мембранным модулем приведен на рисунке 2.

Непрерывная работа в течение нескольких лет подтвердила правильность выбранной концепции для создания высокоавтоматизированного комплекса культивирования галоархей, а испытанные подходы и разработанное программное обеспечение были внедрены на производственном участке при полупромышленном уровне производства.

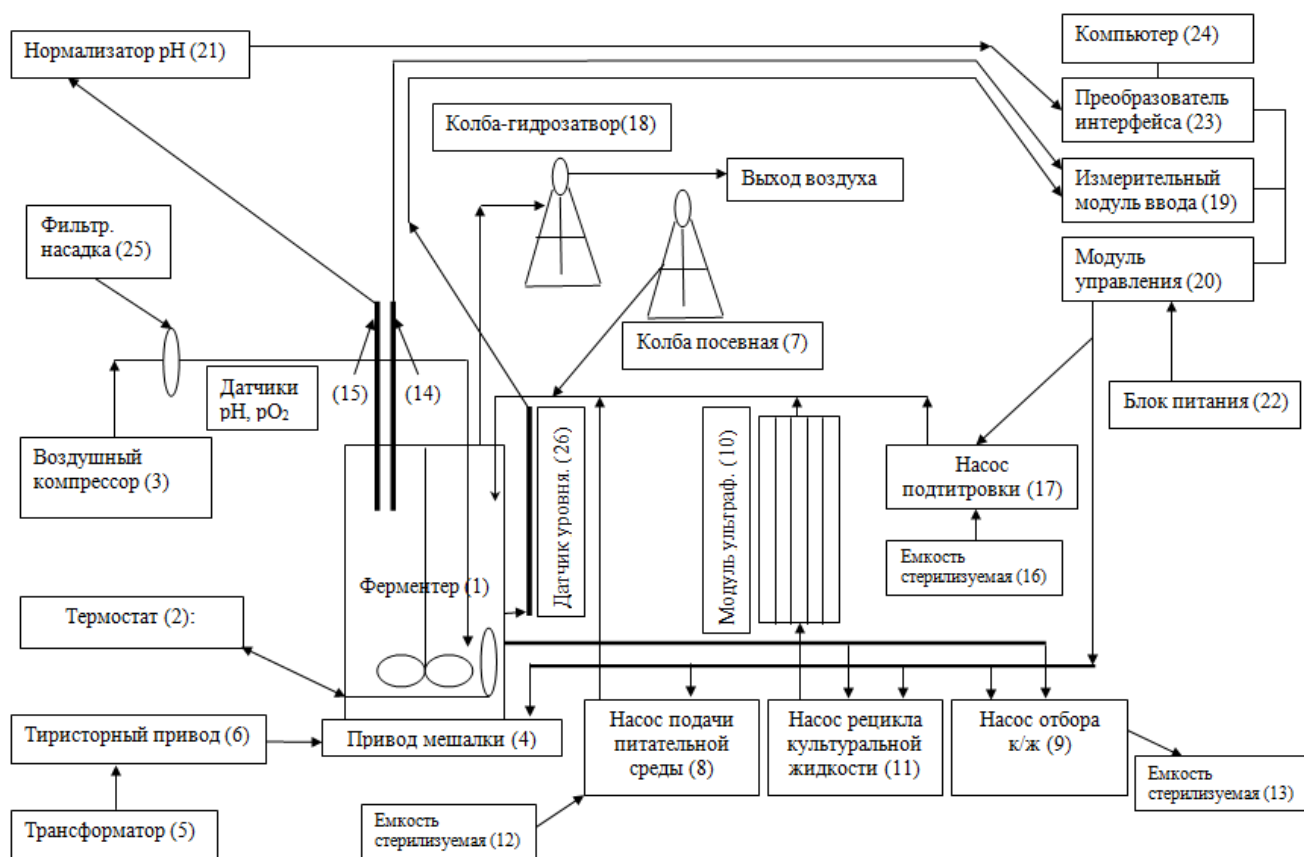


Рисунок 2. Схема высокоавтоматизированного комплекса для высокоплотного культивирования микроорганизмов.

### **Ферментативные гидролизаты зерновых для культивирования и производства биомассы *Hbt. salinarum***

Для культивирования *Hbt. salinarum* используют дорогостоящие триптон, пептон, дрожжевой экстракт, изготавливаемые из высококачественного сырья, что существенно влияет на себестоимость получаемой биомассы. Основным источником углерода у *Hbt. salinarum* являются аминокислоты, углеводы могут лишь стимулировать рост, выработку каротиноидов. Питательная среда для галоархей должна содержать также ростовые факторы и микроэлементы для функционирования специфических ферментных систем.

Для удешевления компонентов питательной среды и использования биомассы галоархей в качестве пищевых и кормовых добавок рассмотрена возможность

использования ферментолитов растительного сырья. Комплексными источниками питания среди протестированных зерновых были выбраны пшеничная, кукурузная и ячневая крупы. В данной работе были подобраны режимы тепловой предобработки круп, протестирован ряд ферментных препаратов и оптимизированы режимы ферментолита. Ферментолиты, полученные при использовании препаратов Протосубтилина ГЗх и Protex 40Е с добавлением глицерина, использовались без дополнительной очистки как источники органических компонентов в питательной среде для культивирования *Hbt. salinarum* 353П в течение 7 суток (Таблица 4). Полученные композиции содержали также углеводы различной степени полимеризации, которые могут выполнять важную функцию по связыванию ингибиторов/метаболитов, вырабатываемых в процессе культивирования. Собственная протеолитическая активность галоархей при культивировании (ее максимум приходился на 24 час процесса) оказалась важным фактором для наиболее полного потребления белка и зависела от наличия в среде ионов  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , оптимальные концентрации которых были подобраны.

Таблица 4. Результаты культивирования *Hbt. salinarum* 353П в колбах с использованием различных ферментолитов зерновых.

<b>Зерновые, ферменты, добавки</b>	<b>АСБ, г/л</b>	<b>Каротиноиды, мг/100 г АСБ</b>	<b>Протеазная активность по казеину на 24 час, PU/г АСБ</b>
Пшеница, Протосубтилин ГЗх (2% w/w)	2,7-3,1	17	7,7
Кукуруза, Протосубтилин ГЗх (2% w/w)	1,9-2,1	12	7,1
Ячмень, Протосубтилин ГЗх (1% w/w)	2,5-2,8	11	12
Пшеница, Протосубтилин ГЗх (2% w/w) + соли металлов	4,3-4,4	23	11,2
Кукуруза, Протосубтилин ГЗх (2% w/w) + соли металлов	2,3	13	15
Ячмень, Протосубтилин ГЗх (1% w/w) + соли металлов	4,1-4,2	19	14,2
Пшеница, Protex 40Е (0,1% w/w)	2,1	2	8
Кукуруза, Protex 40Е (0,1% w/w)	2,2-2,4	11	–
Ячмень, Protex 40Е (0,1% w/w)	0,3-0,5	2	–
Пшеница, Protex 40Е (0,1% w/w) + соли металлов	2,3	3	10,5
Кукуруза, Protex 40Е (0,1% w/w) + соли металлов	3,2	13	3
Ячмень, Protex 40Е (0,1% w/w) + соли металлов	0,5-0,7	2	12,3

При использовании тепловой обработки и ферментного препарата Протосубтилин ГЗх получены перспективные энзиматические гидролизаты на основе пшеницы и ячменя. На этих гидролизатах как источниках аминокислот и ростовых факторов *Hbt. salinarum* 353П накапливает биомассу и каротиноиды практически также, как и на традиционных комплексных субстратах. Штамм КСК-03307 на самом лучшем для него ячменном гидролизате способен накапливать до 2,5 г/л биомассы и 30 мг/л БР. Показана роль микроэлементов в собственной протеолитической активности галоархей, которая способствует более полному усвоению белка зерновых и высокому выходу биомассы.

Культивирование в ферментере с мембранным модулем на энзиматических гидролизатах пшеницы и ячменя с добавками микроэлементов проходит с характеристиками, аналогичными культивированию на среде с триптоном и дрожжевым экстрактом. Отмечено меньшее ингибирование роста галоархей, чем на традиционных комплексных субстратах, однако, и в этом случае существует предел прироста биомассы, который составляет 46-48 г/л.

### **Хранение биомассы *Hbt. salinarum*, регидратация после высушивания и оптимизация сохранения внутриклеточных каротиноидов**

Массовое производство препаратов на основе галоархей, например, биологически активных добавок для человека и животных требует разработки эффективной, экономически целесообразной процедуры высушивания биомассы с целью длительного сохранения компонентов клетки.

Хорошо изученные варианты высушивания пробиотических культур, термолабильных веществ могут быть полезны для проведения подобных процессов высушивания и с галоархеями. Среди методов высушивания распылительная сушка выделяется экономической эффективностью, быстротой и воспроизводимостью результатов. Распылительная сушка успешно применяется даже для высушивания ферментов, каротиноидов и чувствительных к перегреву культур благодаря малому времени контакта высушиваемого материала и нагретого сушильного агента, высокой скорости испарения влаги.

В данном исследовании с использованием искусственных нейронных сетей оптимизировались практически значимые режимы распылительной сушки галоархей и исследовались характеристики высушенной биомассы в процессе длительного хранения. Выбор диапазона параметров распылительной сушки галобактерий зависел от характеристик, требуемых для получаемого на выходе продукта. Среди этих характеристик высушенной биомассы следует выделить: уровень влажности не более 5%, минимальную деградацию каротиноидов, максимальное содержание клеток, максимальное сохранение жизнеспособности клеток.

Оптимизация параметров распылительной сушки проводилась с использованием искусственных нейронных сетей в режимах распылительной сушки, приведенных в таблице 1, которые обеспечивали минимальное разрушение каротиноидов и приемлемую влажность образцов среди предварительно исследованных режимов. Изменение содержания каротиноидов в процессе хранения и влияние метода культивирования также учитывалось в нейросетевой модели.

В серии процессов распылительной сушки получены образцы с влажностью от 1,7 до 5%, содержанием биомассы от 52% до 54%, снижение содержания каротиноидов составило от 5 до 29% для образцов прокультивированных без адсорбента (варианты А) и от 3 до 35% для образцов прокультивированных с адсорбентом (варианты В). Исходное содержание каротиноидов в биомассе  $29 \pm 2,3$  мг/100 г АСБ для культивирования без адсорбента (вариант А) и  $17 \pm 1,3$  мг/100 г АСБ для культивирования с адсорбентом (вариант В).

В выбранных для оптимизации режимах распылительной сушки получают сферические гранулы с инкапсулированными в них галоархеями (Рисунок 3). Рыхлые и полые гранулы преобладают при большей температуре сушильного агента на входе, а более плотные и сглаженные – при меньшей.

Расход сжатого воздуха и скорость подачи биомассы оказывает значимое влияние на размер формируемой капли и, как следствие, на количество подводимой тепловой энергии для удаления влаги из капли. Размер капли минимален при максимальном расходе сжатого воздуха, подаваемого на форсунке, и минимальной скорости подачи биомассы.

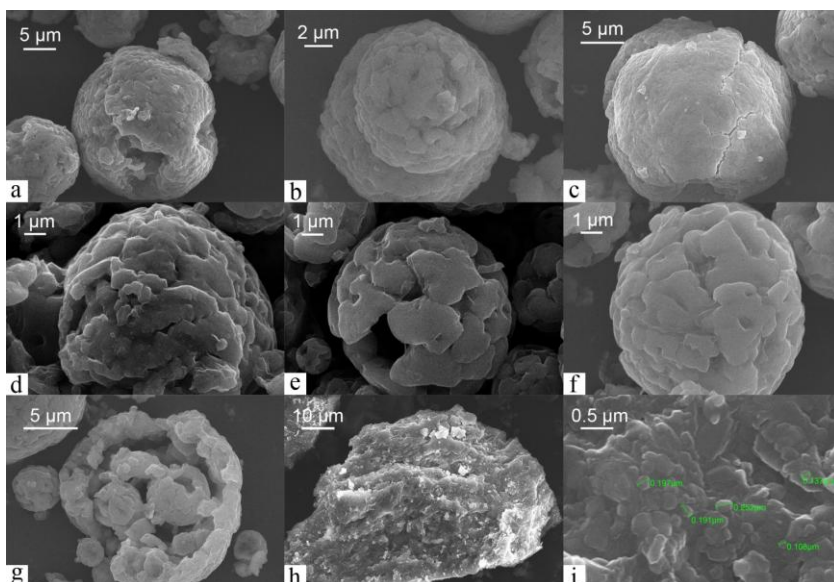


Рисунок 3. СЭМ частиц, полученных при распылительной сушке (a-g) и лиофильно высушенного, перемолотого образца (h, i).

При формировании мелких капель увеличивается площадь контакта жидкой фазы и сушильного агента, при этом скорость сушки и интенсивность ее протекания возрастают, что может привести к перегреву формируемой частицы и значительному тепловому шоку бактерий. Риск перегрева капель малого размера возрастает при повышении температуры сушильного агента на входе в камеру и при увеличении его расхода. Образцы режимов сушки 13 и 5 подвергались наибольшему стрессированию, 4 и 12 – наименьшему среди вариантов таблицы 1. Остальные варианты испытывали промежуточные воздействия температуры и баростресса. Средние диаметры частиц в режимах 13 и 5 были 11-14 мкм. Частицы со средним диаметром 22-26 мкм были получены в режимах 4 и 12 (Рисунок 4).

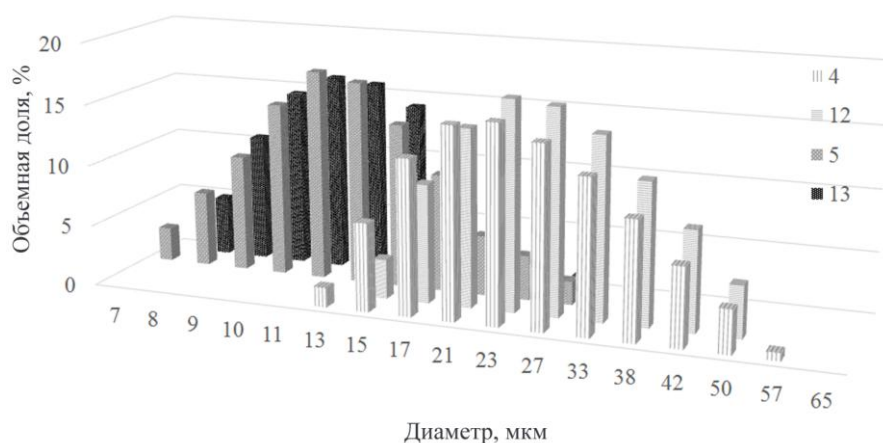


Рисунок 4. Распределение по размерам частиц вариантов 4, 12, 5, 13, полученных при распылительной сушке.

Полученные образцы регидратировали в минеральной основе и культивировали на агаризованной и в жидкой средах. Даже в одной серии высевов на агаризованную среду образцов, подвергшихся температурному воздействию при распылительной сушке не удалось подсчитать точно количество выросших колоний, т.к. результаты отличались иногда на несколько порядков или рост колоний отсутствовал. Использование LIVE/DEAD BacLight Kit также не давало корректных, сходящихся результатов, возможно, из-за большого количества мешающих фрагментов – остатков разрушенных после регидратации клеток.

Характерные кривые роста образцов распылительно высушенных в жидкой среде приведены на рисунке 5 и имеют ряд особенностей: нарастание оптической плотности и



резкое ее падение с последующим возобновлением роста. Это отличает их от лиофильно высушенных образцов.

Микроскопирование в процессе культивирования показало, что изначально делятся клетки сферической формы, которые через некоторое время преобразуются в палочки. Падение оптической плотности связано именно с этим процессом.

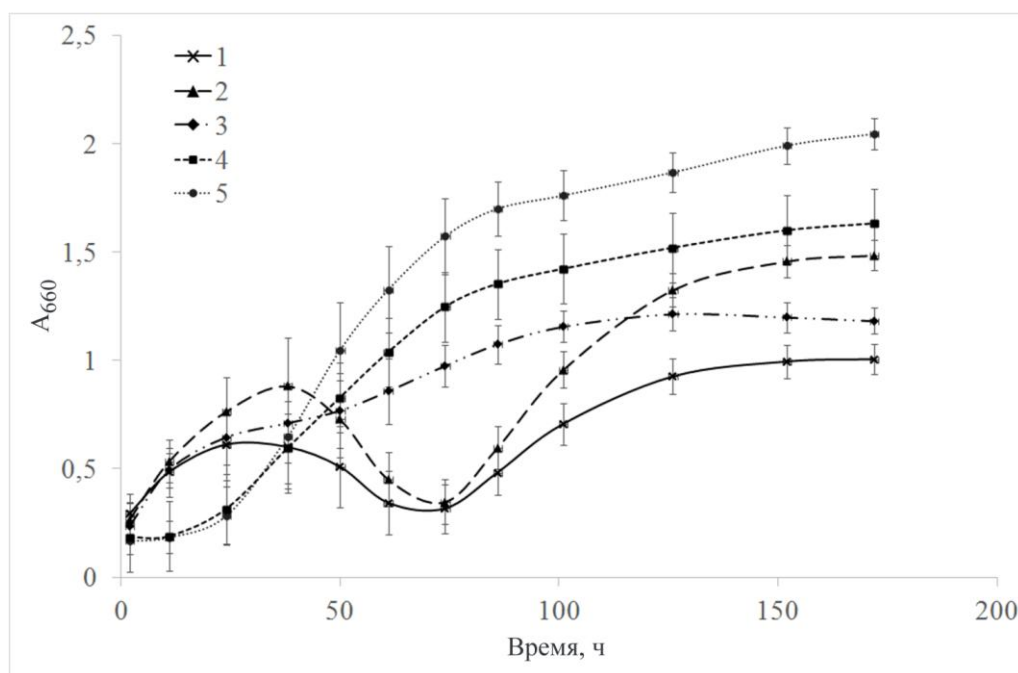


Рисунок 5. Типичные кривые роста для различных образцов: 1 и 2 – распылительно высушенные после культивирования в вариантах А и В соответственно; 3 – лиофильно высушенный; 4 и 5 – свежий посевной материал – суспензии жизнеспособных галоархей после культивирования в вариантах А и В соответственно.

Интактность, целостность цитоплазматической мембраны для клетки является определяющим фактором ее жизнеспособности. Такие механические повреждения, как локальный разрыв цитоплазматической мембраны приводят к гибели микробной клетки. Электронная микроскопия тонких срезов клеток, подвергшихся тому или иному физическому воздействию, сопряженному с интенсивным высушиванием микробной биомассы, позволяет визуально детектировать такие летальные повреждения оболочки и оценить их масштаб для каждого конкретного варианта высушивания.

В жестких режимах распылительной сушки редкие интактные клетки имели истонченную оболочку, главным образом вследствие практически отсутствующей клеточной стенки. На ультратонких срезах редких интактных клеток отчетливо видна не поврежденная по всему периметру клетки цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка практически не выявлялась. Нуклеоид располагался в центральной части клеток и занимал значительный объем внутриклеточного пространства. Рибосомальный контент находился главным образом на периферии клетки.

*Характер повреждений клеток:* клетки большей частью разорваны иногда пополам, иногда – на несколько частей, что сопровождалось выбросом содержимого клеток в межклеточное пространство. Значительная часть клеток имела локальные единичные или множественные повреждения всей оболочки. Внутрицитоплазматическое содержимое таких клеток представлено плотным гомогенным слоем на периферии цитоплазмы и/или единичными сферическими, схожими по плотности образованиями в зоне нуклеоида. Таким образом, рибосомальный контент практически спрессован в однородную массу, по видимому, в результате воздействия высокого давления направленного изнутри клетки.

### Хранение высушенных образцов биомассы галоархей

В процессе хранения в течение 1 года образцы почти не набирали влагу – увеличение содержания влаги в них составило до 0,5%, что несущественно.

Сразу после распылительной сушки образцы плохо реактивировались. Через 4 месяца хранения при 4 °С содержание каротиноидов упало в образцах А на 14-32%, в образцах В – на 24-40%. В целом, реактивация образцов В происходила лучше, а на агаризованной среде высевалось больше А и В образцов. В образцах сроком хранения 1 год содержание каротиноидов упало на 64-75% в образцах А и на 58-89% в образцах В. На порядок упала высеваемость на агаризованной среде.

Для всех распылительно высушенных в изученных режимах (Таблица 1) образцов галоархей, сохранявшихся при 4 °С, отмечено улучшение характеристик реактивации после 4 месяцев хранения и ухудшение этих характеристик при последующем хранении. Такие данные, с одной стороны, свидетельствуют о процессах репарации повреждений, происходящих при низкой температуре в кристаллах и малом влагосодержании. С другой стороны, при более длительном хранении возможно отравление клеток метаболитами.

Проксидантные свойства среды культивирования заметно влияют на выработку каротиноидов и в то же время ухудшают показатели реактивации галоархей после распылительной сушки и хранения. Галоархеи в распылительно высушенных образцах “В” (культивирование с применением адсорбента, устранением метаболитов и продуктов окисления самой среды) лучше сохраняют свою структуру при внедрении в кристалл и реактивируются. Можно предположить, что даже при первоначальном устранении метаболитов поврежденные и окислившиеся компоненты клеток после распылительной сушки уже в кристалле негативно влияют на жизнеспособные клетки. Большая концентрация клеток в нашем случае и минимальная, но присутствующая влажность способствуют контакту метаболитов с клетками.

Фактором сохранения жизнеспособности может являться пигментация клеток. С одной стороны, каротиноиды устраняют АФК в процессе культивирования, но продукты деградации каротиноидов и липидов сами обладают прооксидантными свойствами, и могут являться одними из метаболитов, негативно влияющими на клетки в кристалле.

Наилучшими характеристиками по реактивации в жидкой среде на 4 месяц хранения обладали образцы “В” (с удалением метаболитов,  $T_{da}=120$  °С), среди которых клетки из 4В, 12В высевались на агаризованную среду после 2-х лет хранения при 4 °С, хотя время реактивации могло составлять до нескольких месяцев.

Анализ поверхностей отклика, полученных с помощью ИНС моделирования позволил определить следующие условия ведения процесса сушки для двух случаев как оптимальные:

1. При сушке биомассы, полученной при культивировании без адсорбента (варианты “А”): температура сушильного агента на входе в камеру – 120÷130 °С, расход сушильного агента – 30÷31 м<sup>3</sup>/ч; расход подаваемого на форсунку сжатого воздуха – 831 л/ч, скорость подачи биосуспензии – 5,7 г/мин.

2. При сушке биомассы, полученной при культивировании с применением адсорбента (варианты “В”): температура сушильного агента на входе в камеру – 120÷135 °С, расход сушильного агента – 30÷31 м<sup>3</sup>/ч; расход подаваемого на форсунку сжатого воздуха – 831 л/ч, скорость подачи биосуспензии – 5 г/мин.

Лиофильная сушка обладает, конечно, менее повреждающим действием, чем распылительная. После года хранения у лиофильно высушенных образцов содержание каротиноидов было как у распылительно высушенных после 4-х месяцев хранения. Проход через форсунку, распыление суспензии и, соответственно, атомизация частиц, баростресс,

высокая температура создают тот набор стрессоров, который угнетает клетки и разрушает БАВ в распылительно высушенных образцах при хранении.

### **Технико-экономические показатели производства бактериородопсина и биомассы *Hbt. salinarum* при различных вариантах исполнения**

Блок-схема производства БР, в целом отражающая основные технологические операции представлена на рисунке 6.

Результаты примерных экономических расчетов, зависят от многих факторов: текущей стоимости сырья и оборудования, норм амортизационных, страховых и налоговых отчислений и, во многом, от текущей экономической конъюнктуры, а также от методики расчета. Тем, не менее, приведенные цифры в статьях калькуляции могут служить руководством при выборе схемы производства и дальнейшей оптимизации расходов в структуре себестоимости.

Следует отметить, что даже расчет базовых вариантов (1 и 2) производства основывается на данных для высокопроизводительного штамма КСК-03307 и исходит из имеющегося опыта и схем работы с другими штаммами в условиях реального производства, а значит, себестоимость продукта для других схем реализации производства и штаммов может быть существенно повышена. Наиболее оптимизированные варианты 4, 5 и 6 для производства БР и биомассы (штамм 353П-1) предусматривают применение адсорбентов и мембранных методов для очистки среды культивирования от ингибиторов роста, возврат использованной в процессе культуральной жидкости на стадию солеприготовления и регенерацию мембран и адсорбента. В вариантах учтена также трудоемкость выделения БР.

**Вариант 1.** Объем выпуска БР в год – 2 кг (штамм КСК-03307), реализация базового периодического процесса без использования адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 7 суток, общий объем биореактора 1 м<sup>3</sup>.

**Вариант 2.** Объем выпуска БР в год – 20 кг (штамм КСК-03307), реализация базового периодического процесса без использования адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 7 суток, общий объем биореактора 10 м<sup>3</sup>.

**Вариант 3.** Объем выпуска БР в год – 20 кг (штамм КСК-03307), реализация базового периодического процесса с оптимизацией посевного материала, без использования адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 7 суток, общий объем биореактора 6 м<sup>3</sup>.

**Вариант 4.** Объем выпуска БР в год – 20 кг (штамм КСК-03307), реализация процесса с оптимизацией посевного материала, с использованием мембранных модулей, адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 8 суток, общее время процесса может достигать до 20 суток. В производственных линиях предусмотрены два биореактора с общим объемом 0,4 м<sup>3</sup>.

**Вариант 5.** Объем выпуска БР в год – 200 кг (штамм КСК-03307), реализация процесса с оптимизацией посевного материала, с использованием мембранных модулей, адсорбента для очистки культуральной жидкости и проточных центрифуг для отделения биомассы. Время основного культивирования 8 суток, общее время процесса может достигать до 20 суток, общий объем биореактора 4 м<sup>3</sup>.

**Вариант 6.** Объем выпуска биомассы по АСБ в год – 1000 кг (штамм 353П-1), реализация процесса с использованием мембранных модулей, адсорбента для очистки культуральной жидкости, проточных центрифуг для отделения биомассы и распылительной сушилки. Время основного культивирования 7 суток, общее время процесса может достигать до 20-25 суток. В производственных линиях предусмотрены четыре биореактора с общим объемом 0,8 м<sup>3</sup>.

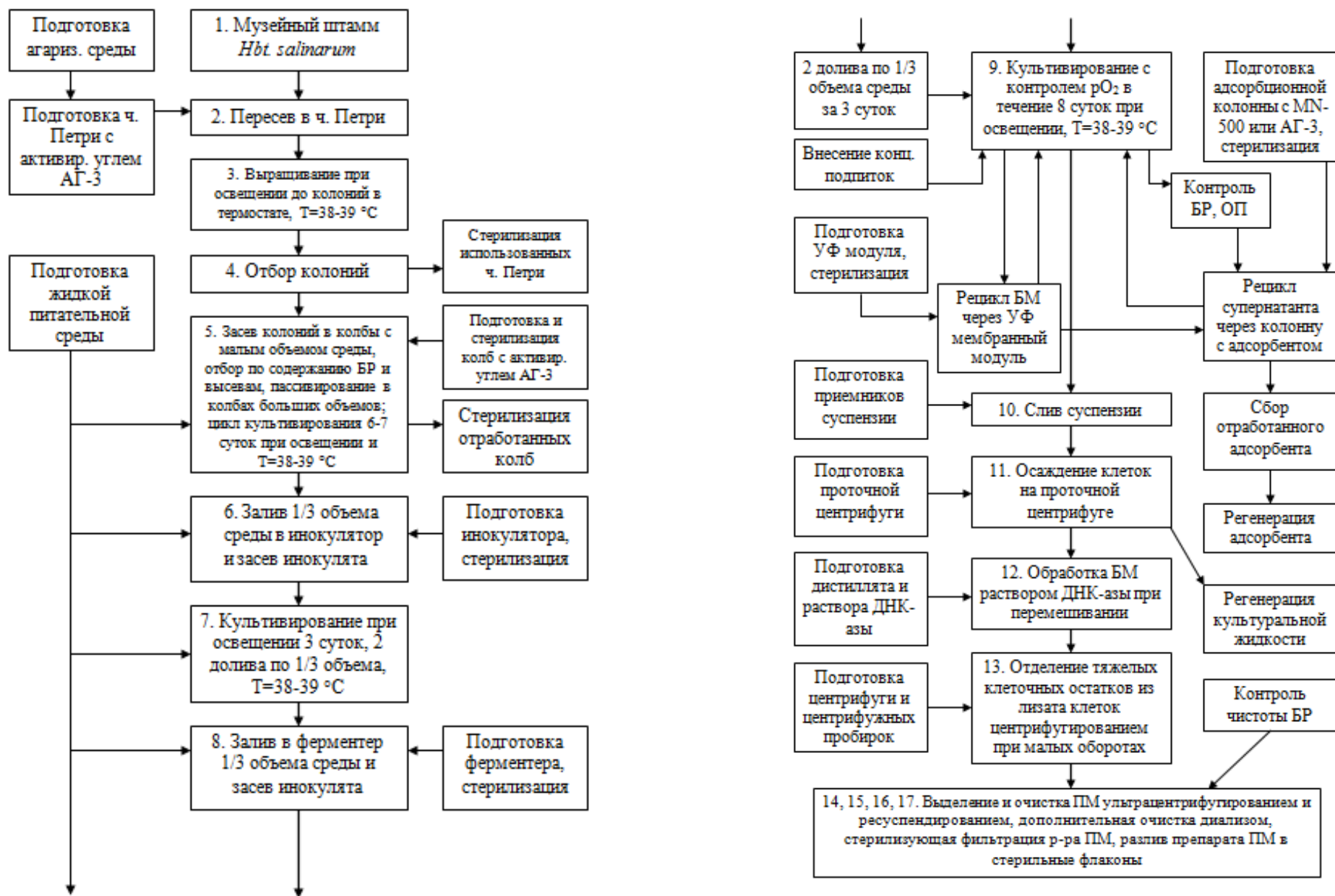


Рисунок 6. Блок-схема производства бактериородопсина.

Таблица 5. Структура затрат в себестоимости БР и биомассы *Hbt. salinarum*.

Статьи калькуляции	Себестоимость в вариантах, USD/г					
	1	2	3	4	5	6
Сырье и материалы	23,52	23,52	14,17	8,12	8,12	0,302
Энергия на технологические цели	3,51	7,48	4,29	0,83	0,64	0,058
Зарплата персонала (включая страховые и налоговые отчисления)	77,29	14,95	13,42	11,9	1,88	0,206
Расходы на освоение производства, содержание оборудования	22,08	28,45	25,84	20,73	1,67	0,359
Общезаводские и прочие производственные расходы	24,09	5,71	5,03	4,02	0,71	0,070
Внепроизводственные расходы	3,01	1,60	1,26	0,91	0,26	0,020
Полная себестоимость, USD/г	153,5	81,71	64,01	46,51	13,28	1,015

С увеличением объема выпуска себестоимость БР снижается по всем статьям калькуляции. При мощности выпуска 20 кг/год и оптимизации производственного процесса себестоимость возможно снизить в 1,75 раза (варианты 2-4). Увеличение мощности производства в 10 раз – до 200 кг БР в составе ПМ в год приводит к уменьшению себестоимости по разработанному варианту еще в 3,5 раза. По сравнению с первым, базовым вариантом производства, снижение себестоимости при росте выпуска от 2 кг/год до 200 кг/год по разработанному варианту составляет 11,6 раз. Разработанный вариант производства можно признать малоотходным и энергосберегающим, т.к. минимизированы жидкие стоки, затраты на базовый солевой раствор из-за рецикла очищенной культуральной жидкости и использования светодиодов.

В вариантах выпуска БР 1-4 большую долю в себестоимости составляет зарплата персонала, причем в базовых вариантах эта доля выше из-за трудоемкости операций по выделению БР, но даже в оптимизированных вариантах необходимо сохранение квалифицированного персонала с достойной оплатой для работы и обслуживания качественного и, зачастую, дорогостоящего оборудования. Во многом из-за этого невозможно сократить статью расходов на освоение производства и содержание оборудования.

Для производства БР используется качественное сырье, которое составляет существенную статью расходов. Стоимость сырья можно сократить практически в два раза, т.к. для расчетов взяты планово-заготовительные цены NaCl, триптона и дрожжевого экстракта высшей ценовой категории, которые использовались еще в лабораторном процессе. Испытания сырья других производителей продолжаются и позволили к настоящему времени отобрать варианты с приемлемой стоимостью.

По данным каталога Sigma-Aldrich стоимость 1 мг БР дикого типа в составе ПМ составляет от 600 до 800 USD (Sigma-Aldrich, USA, CAS Number: 53026-44-1), рекомбинантный бактериоопсин (полученный при выращивании тех или иных культур с клонированными вариантами структурного гена *bop*) стоит значительно дороже. Проведенная технико-экономическая оценка показывает, что даже с учетом закономерностей ценообразования себестоимость БР на уровне 1-4 центов США за 1 мг свидетельствует о рассмотренных вариантах высококорентабельного производства.

Для штамма-продуцента каротиноидов 353П-1 в таблице 5 рассмотрен вариант 6 производства биомассы, в котором при использовании в качестве субстрата энзиматического гидролизата пшеничной крупы статью калькуляции по сырью возможно снизить почти в 6 раз с 0,302 USD/г до 0,051 USD/г.

При больших объемах производства БР также заслуживает внимания комплексная переработка отходов после его выделения. Кроме очевидной возможности использования

лизата клеток в качестве дополнения или частичной замены субстрата из него можно выделять набор липидов, специфические ферменты, ДНК, РНК.

### Контаминация культур галофилов посторонней микрофлорой и возможность их нестерильного культивирования

Реализация крупномасштабных промышленных процессов с минимальными требованиями к стерильности является, казалось бы, возможным преимуществом применения экстремально галофильных продуцентов с экономической точки зрения. Однако, наша практика длительного непрерывного и высокоплотного культивирования экстремальных галофилов в лабораторных и промышленных условиях выявила возможность и особенности контаминации: интенсивного развития посторонней микрофлоры, а также вирусного заражения. Источниками контаминации в этих случаях обычно являлись используемые нестерильные соли и воздух.

Таблица 6. Влияние контаминирующих бактерий на *Hbt. salinarum* ET-1001 и *Halomonas utahensis* SK7 при пересевах (соотношения приведены для предстационарной стадии).

Микроорганизмы	Номер посева и количество клеток ( $\times 10^7$ ) в 1 мл культуральной жидкости		
	1	2	3
<i>Hbt. salinarum</i> ET-1001 (контроль)	174,1 $\pm$ 21,3	183,1 $\pm$ 28,7	185,1 $\pm$ 20,4
<i>Halomonas utahensis</i> SK7 (контроль)	332,1 $\pm$ 43,1	345,3 $\pm$ 52,3	341,1 $\pm$ 56,2
<i>Bacillus subtilis</i> 1/ <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	62,7 $\pm$ 11,9/ 15,5 $\pm$ 1,2	32,3 $\pm$ 4,2/ 8,7 $\pm$ 2,0	27,3 $\pm$ 7,8/ 5,7 $\pm$ 1,3
<i>Bacillus subtilis</i> 1/ <i>Halomonas utahensis</i> SK7	152,5 $\pm$ 16,7/ 111,5 $\pm$ 16,9	112,5 $\pm$ 35,7/ 134,1 $\pm$ 16,1	92,1 $\pm$ 16,4/ 122,3 $\pm$ 9,8
<i>Bacillus subtilis</i> 2/ <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	0,215 $\pm$ 0,045/ 134,1 $\pm$ 32,1	0,117 $\pm$ 0,009/ 152,6 $\pm$ 21,1	0,113 $\pm$ 0,035/ 153,3 $\pm$ 11,7
<i>Bacillus subtilis</i> 2/ <i>Halomonas utahensis</i> SK7	0,122 $\pm$ 0,022/ 287,8 $\pm$ 23,5	0,212 $\pm$ 0,069/ 278,1 $\pm$ 37,1	0,255 $\pm$ 0,044/ 292,9 $\pm$ 33,5
<i>Bacillus badius</i> / <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	0,157 $\pm$ 0,034/ 121,1 $\pm$ 18,2	0,132 $\pm$ 0,015/ 115,1 $\pm$ 25,4	0,113 $\pm$ 0,032/ 134,1 $\pm$ 17,1
<i>Bacillus badius</i> / <i>Halomonas utahensis</i> SK7	4,81 $\pm$ 1,20/ 314,5 $\pm$ 41,3	6,31 $\pm$ 1,93/ 300,5 $\pm$ 23,7	5,52 $\pm$ 0,68/ 290,8 $\pm$ 36,8
<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	17,1 $\pm$ 3,2/ 33,1 $\pm$ 5,3	4,2 $\pm$ 0,7/ 9,2 $\pm$ 1,6	2,1 $\pm$ 0,6/ 7,5 $\pm$ 2,3
<i>Bacillus licheniformis</i> / <i>Halomonas utahensis</i> SK7	55,5 $\pm$ 5,8/ 142,5 $\pm$ 35,7	50,1 $\pm$ 16,1/ 111,3 $\pm$ 10,0	62,3 $\pm$ 14,4/ 152,5 $\pm$ 35,2
<i>Lysinibacillus macroides</i> / <i>Hbt. salinarum</i> ET-1001	134,1 $\pm$ 26,2/ 182,3 $\pm$ 32,2	67,1 $\pm$ 11,5/ 187,1 $\pm$ 37,2	97,1 $\pm$ 24,4/ 182,8 $\pm$ 39,7
<i>Lysinibacillus macroides</i> / <i>Halomonas utahensis</i> SK7	95,8 $\pm$ 25,9/ 345,6 $\pm$ 61,1	105,3 $\pm$ 22,1/ 327,8 $\pm$ 37,9	121,0 $\pm$ 14,9/ 362,6 $\pm$ 72,8

В настоящей работе в нестерильных экспериментах при различных режимах культивирования с экстремально галофильной археей *Hbt. salinarum* и высокогалотолерантной бактерией *Halomonas utahensis* выделена и охарактеризована контаминирующая микрофлора, которая в некоторых случаях замещала исходную культуру. В модельных экспериментах по совместному культивированию с выделенными и наиболее часто встречающимися контаминирующими бактериями р. *Bacillus* и

родственными им показано их влияние на целевые культуры (Таблица 6.). Их максимальные концентрации были отмечены на предстационарной стадии.

Бактерии *Halomonas utahensis* менее чувствительны к присутствию бацилл, чем *Hbt. salinarum* ET-1001. Среди рассмотренных контаминирующих бактерий, концентрация которых в начале эксперимента составляла  $10^5$  клеток/мл, *Bacillus licheniformis* полностью подавляет синтез БР уже в первом пассаже, активирует синтез каротиноидов и все более подавляет рост биомассы при пересевах. Важно, что выделенные бациллы, не являясь высокогалотолерантными микроорганизмами, росли только совместно с экстремально галофильными археями или высокогалотолерантными бактериями, не проявляя роста в монокультуре на питательной среде, содержащей 250 г/л NaCl.

В длительных непрерывных экспериментах охарактеризована также контаминирующая микрофлора, представители которой относились к родам *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Marinobacter*, *Natronococcus*. Неизменно присутствовали в значимом количестве несколько видов бактерий рода *Bacillus* или родственные им *Lysinobacillus*, *Alkalibacillus* и др. (иногда до  $10^8$ - $10^9$  кл/мл).

#### Вирусное заражение при культивировании *Hbt. salinarum*

Случаи быстрого лизиса целевых культур *Hbt. salinarum* наблюдались и в периодических, и в непрерывных процессах культивирования. Характер наблюдаемого быстрого лизиса мы связывали с вирусным заражением культур. Особенно отчетливо явление быстрого лизиса культур *Hbt. salinarum* проявлялось при высокоплотном культивировании в мембранном биореакторе с протоком питательной среды. В неоптимальных условиях, например, при снижении протока среды в 2-3 раза по сравнению с оптимумом и при большой концентрации клеток происходила индукция вирусов, вероятно, из-за стрессирования клеток накапливаемыми метаболитами или повышения pH.

Вирус, являвшийся наиболее частой причиной лизиса, был выделен при проведении высокоплотного процесса культивирования, проведена первичная оценка вирусной активности, определены условия, при которых инфицирование в глубинной культуре протекает с наибольшей эффективностью, подобраны оптимальные условия для активации механизма индукции умеренного вируса в глубинной культуре. Процесс индукции эффективно происходит при температуре 45 °С, высокой плотности популяции клеток и щелочных значениях pH 8,4-8,5. Получены изображения вирусов, выделенных из негативных колоний (Рисунок 7).

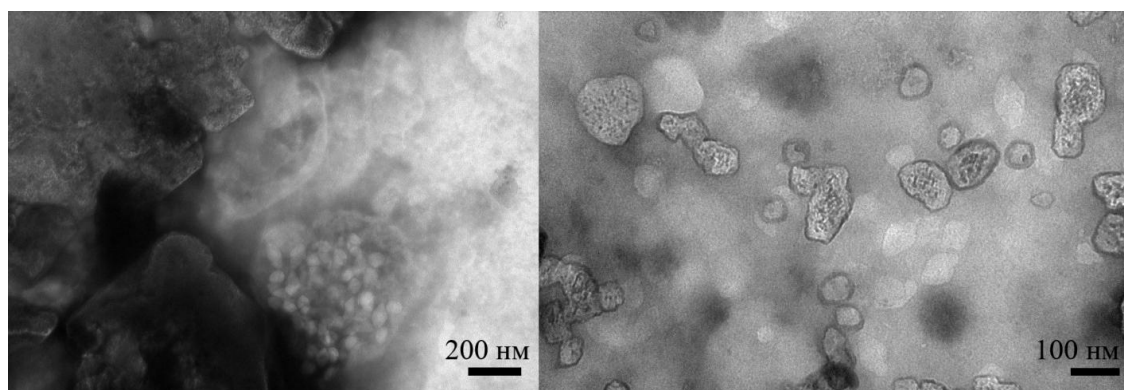


Рисунок 7. Вирусные частицы в лизатах клеток галоархей.

Таким образом, нестерильные соли, воздух являются источниками микроорганизмов (не обязательно галотолерантных или экстремально галофильных), которые размножаются при совместном культивировании с экстремальными галофилами. Культивирование галоархей с внесением специально подобранного под целевую культуру антибиотика может решить часть проблем, связанных с бактериальным заражением, хотя и не во всех

случаях. Приемлемым решением проблемы нестерильного культивирования экстремально галофильных микроорганизмов является обработка оборудования дезинфицирующими растворами, применение стерилизующей мембранной фильтрации питательной среды, фильтрация воздуха при культивировании и обеспечение условной чистоты помещения.

### **Карбонатогенез бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, для улучшения свойств и защиты бетона и биопрепарат на их основе**

Малоизученной экологической нишей для выделения бактерий, обладающих уреазной активностью и способностью к биоосаждению кальция, являются гиперсоленые среды, из которых ранее выделяли бактерии рода *Bacillus*, не способные размножиться при повышенном содержании солей, что исследователи объясняли контаминацией, например, из привнесенного водными источниками и птицами материала, а также выживаемостью спор в условиях высокой солености. Ранее было обнаружено, что некоторые бактерии рода *Bacillus*, выделенные из гиперсоленых сред и не размножающиеся в монокультуре при высоких концентрациях NaCl (> 15%), при совместном культивировании в сообществе экстремальных галофилов активно растут при концентрации NaCl 25% и выше. Их устойчивость к высоким значениям pH, выживаемость в условиях осмотического шока, перепадов температуры может способствовать отбору чрезвычайно устойчивых форм, перспективных для разработки биокальцинирующих препаратов.

При сравнительном скрининге уробактерии, выделенные из разных экосистем, характеризовались по уреазной активности, активности роста и по биокальцинирующей способности на среде Кристенсена. По всем характеристикам лучшими из исследованных оказались *Lysinibacillus macroides* и *Bacillus licheniformis*, выделенные из гиперсоленых сред (Рисунок 8).

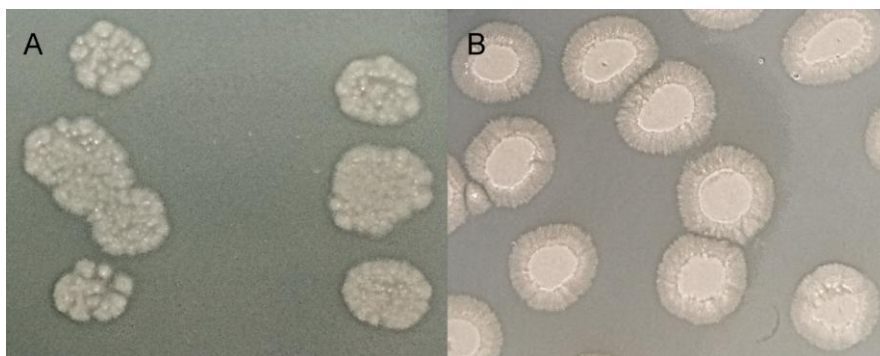


Рисунок 8. Кальцинирование колоний *Lysinibacillus macroides* (A) и *Bacillus licheniformis* (B) на среде Кристенсена с CaCl<sub>2</sub>.

В серии последующих экспериментов использовались *L. macroides*, которые обладали высочайшей уреазной активностью и способностью к осаждению карбоната кальция. Внесение этих бактерий в цементную смесь на основе среды Дика с глюкозой приводит к существенному упрочнению цементного камня при изгибе и при сжатии по сравнению с контрольными вариантами.

### Исследование функциональной активности иммобилизованных на диатомите клеток уробактерий

Одним из преимуществ иммобилизации является повышение устойчивости клеток и спор к действию неблагоприятных внешних факторов, таких как неоптимальная температура, pH, ингибирование продуктами метаболизма. Адсорбция бактерий *L. macroides* на минеральном носителе, диатомите, с последующей сушкой при умеренных температурах позволила получить иммобилизованную, содержащую споры форму. Частичное покрытие спор оболочкой дополнительно предохраняет их от воздействия окружающей среды, что важно для сохранности препарата. Иммобилизованные на диатомите *L. macroides* после двух



месяцев хранения лучше других исследованных культур сохраняли функциональную активность. Полученный иммобилизованный препарат вводили в состав цемента в виде сухого порошка в количестве 3% (по массе). В качестве затворителя при приготовлении цементного раствора использовалась среда Дика с глюкозой. Для сравнения формовали образцы цемента с добавлением исходного адсорбента, диатомита, в том же количестве.

Если при исследовании прочности на изгиб наблюдали незначительное улучшение, то при исследовании прочности цементного камня на сжатие (Рисунок 9) к 28 суткам наблюдали повышение прочности образцов с иммобилизованной формой культуры *L. macroides* на 85,2% по сравнению с контролем.

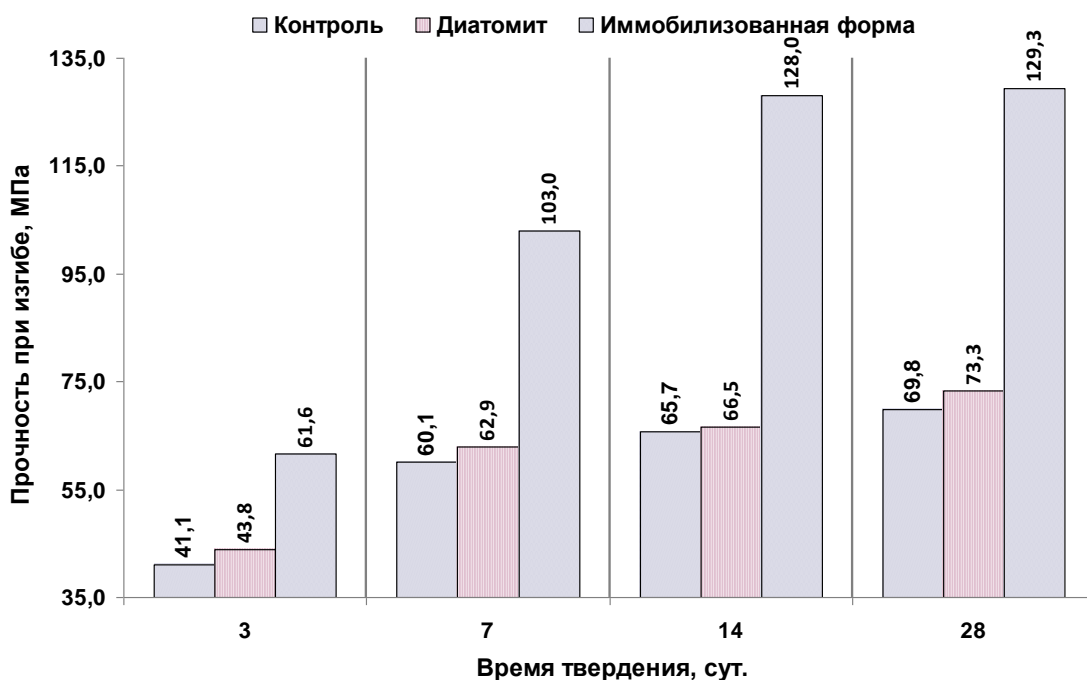


Рисунок 9. Влияние иммобилизованной формы *Lysinibacillus macroides* на прочность цементного камня при сжатии.

Исследование структурных характеристик цементного камня показано, что использование микробиологической добавки приводит к осаждению  $\text{CaCO}_3$  в поровом пространстве образцов, уплотняя структуру и снижая пористость цемента, а также к 28 суткам уменьшает капиллярное водопоглощение цементного камня в 1,6 раза.

Применение иммобилизованной формы позволит снизить скорость разрушения изделия в результате индуцированного бактериями “залечивания” микротрещин на начальном этапе возникновения, а также благодаря снижению числа открытых капиллярных пор повысить стойкость цементного камня к агрессивным средам.

#### “Залечивание” трещин в бетоне с применением препаратов уробактерий

Эффективность использования уробактерий для залечивания трещин в бетоне анализировали путем погружения образцов цементного камня в питательную среду Дика с 7,5 г/л  $\text{CaCl}_2$  и суспензией вегетативных клеток и спор (с остатками инактивированных клеток) бактерий *L. macroides*. Состояние трещин контролировали через 7, 21 и 28 суток (Рисунок 10).

В среде с вегетативными клетками заметно заполнение трещин на 21 и 28 сутки образовавшимся карбонатом кальция, а также образование белого налета на поверхности образцов. Трещины в цементных образцах, погруженных в среду с суспензией спорующей культуры бактерий и спор, обладающих высокой проникающей способностью, визуально исчезли.

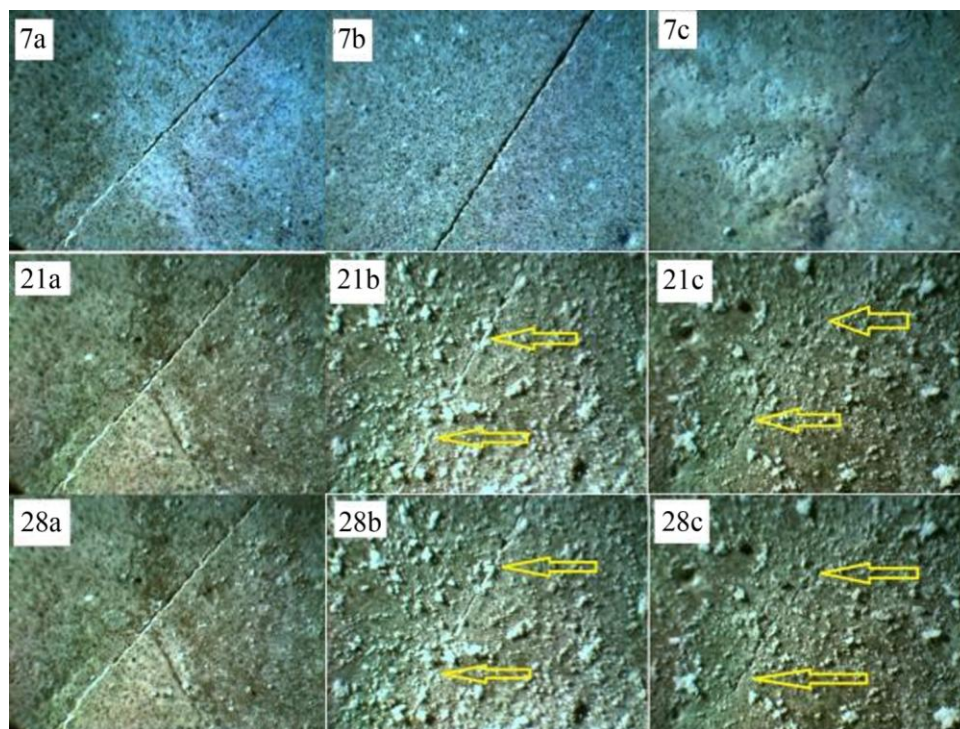


Рисунок 10. Заполнение трещин в цементном камне карбонатом кальция: *a* – контроль, *b* – вегетативные клетки, *c* – взвесь спор и остатки инактивированных клеток. Цифрами указано время процесса: 7, 21 и 28 суток.

Биотехнологический потенциал уробактерий, выделенных из гиперсоленых сред и обладающих способностью к биоосаждению кальция, может быть использован для получения биопрепаратов и применения в воспроизводимой природоподобной технологии индуцированного микроорганизмами осаждения кальция.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые варианты синтетических питательных сред для экстремофильных галоархей продуцентов каротиноидов и бактериородопсина (*Hbt. salinarum* 353П и *Hbt. salinarum* ET-1001), в которых по сравнению с базовым вариантом исключен ряд аминокислот, а АМФ и УМФ заменены препаратом рибонуклеиновой кислоты дрожжей *Torula utilis*. При оптимизации синтетической питательной среды для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* было показано стрессирующее действие продуктов окисления/фотоокисления ароматических кислот, что влияет как на уровень накопления биомассы, так и на уровень биосинтеза каротиноидов и бактериородопсина. Преимущество синтетической питательной среды, разработанной для продуцента бактериородопсина, состоит в отсутствие посторонних примесей липидной и белковой природы, которые усложняют выделение этого белка.

2. Показано, что антиоксидантные свойства, химическая/фотохимическая трансформация компонентов питательной среды и метаболитов клеток *Hbt. salinarum*, а также режимы освещения растущей культуры находятся в тесной взаимосвязи и определяют биосинтетическую активность штаммов-продуцентов при любом режиме культивирования галоархей, в том числе высокоплотностном. На основании исследования этих связей впервые предложен адаптивный алгоритм управления режимами высокоплотностного культивирования галоархей *Hbt. salinarum* и направленности биосинтетических активностей клеток этих продуцентов.

3. Получены новые высокопродуктивные штаммы галоархей *Hbt. salinarum*: несколько штаммов-продуцентов фоточувствительного трансмембранного белка

бактериородопсина, отличающиеся сниженным уровнем спонтанных мутаций; штамм-продуцент С<sub>50</sub>-каротиноидов, обладающий повышенной устойчивостью к поражению вирусами. Новые культуры депонированы в официальных Коллекциях микроорганизмов (Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НБЦ ВКПМ и коллекции уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения (UNIQEM).

4. Предложены следующие технологические подходы для повышения эффективности процессов культивирования экстремальных галофильных продуцентов: метод подготовки посевного материала с внесением адсорбента (MN500 или инкапсулированный активированный уголь АГ-3), уменьшающий вероятность спонтанных мутаций штамма-продуцента, увеличивающий жизнеспособность клеток и срок хранения посевного материала (инокулята); применение антиоксидантов (цистеина, токоферола, аскорбиновой кислоты) при культивировании для снижения окислительных повреждений среды, а также спектральные характеристики и режимы освещения, оптимальные для культивирования продуцентов бактериородопсина и каротиноидов.

5. Разработаны высокоавтоматизированные режимы непрерывного и высокоплотного культивирования галоархей *Hbt. salinarum* для штаммов-продуцентов каротиноидов и бактериородопсина. Для штамма *Hbt. salinarum* КСК-03307 в процессе с доливом питательной среды, субстратными подпитками и рециклом культуральной жидкости через адсорбент, за 8 суток накапливалось до 45 г/л биомассы при суммарном содержании БР 1,750 г/л. При данном режиме культивирования в лизате биомассы практически отсутствуют каротиноиды, что позволяет существенно облегчить выделение бактериородопсина. Для штамма *Hbt. salinarum* 353 П-1 в мембранном реакторе за 7 суток культивирования содержание биомассы достигало 48 г/л при содержании каротиноидов до 35 мг/ 100 г биомассы.

6. Создан высокоавтоматизированный комплекс для культивирования галофильных микроорганизмов, разработан опытно-промышленный регламент эксплуатации этого комплекса и программное обеспечение “BioDrome 3.0” для управления биосинтетическими процессами, в которое интегрирована экспресс-методика определения содержания бактериородопсина. Управление комплексом обеспечивает поддержание оптимизированных режимов культивирования и разработанных вариантов автоматической регуляции биосинтеза серии целевых БАС, синтезируемых галофильными микроорганизмами.

7. На основе ферментолізатов пшеничной и ячневой круп составлены питательные среды для культивирования галоархей *Hbt. salinarum* 353П, которые по своим характеристикам превосходят стандартные среды для культивирования галоархей 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 галоархей, степень потребления белка, накопление биомассы и каротиноидов.

8. С помощью искусственных нейронных сетей определены оптимальные режимы распылительной сушки биомассы *Hbt. salinarum* для получения высушенного продукта с остаточной влажностью <5%. Показано, что температура входного сушильного газа должна находиться в пределах от 120 до 130 °С; расход сушильного газа – в диапазоне от 30 до 31 м<sup>3</sup>/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.

9. Изучены характеристики инкапсулированных в соль клеток галоархей, полученных при распылительной сушке. С помощью электронной микроскопии установлен характер повреждений клеток в процессе длительного хранения высушенного продукта.

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

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

12. В нестерильных экспериментах с экстремально галофильными археями *Hbt. salinarum* и высокогалотолерантными бактериями *Halomonas utahensis* выделена и охарактеризована контаминирующая микрофлора, которая в некоторых случаях замещала исходную культуру. Установлено влияние различных факторов на развитие контаминирующих микроорганизмов, представители которых относились к родам *Natronococcus*, *Alkalibacillus*, *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Lysinibacillus* и *Bacillus*. Последние два вида бактерий, не являясь высокогалотолерантными, были способны размножаться в модельных опытах и в той или иной степени подавлять рост *Hbt. salinarum* или *Halomonas utahensis* при совместном культивировании. На основе проведенных исследований предложены подходы, снижающие отрицательные эффекты контаминации при нестерильном культивировании экстремальных галофилов. Отмечены случаи спонтанной индукции вирусов из лизогенных клеток галоархей и в целом негативное влияние вирусов на процессы высокоплотного культивирования.

13. Произведена технико-экономическая оценка производства биомассы *Hbt. salinarum* и бактериородопсина при различных вариантах культивирования продуцентов. Разработан опытно-промышленный регламент производства биомассы экстремально галофильных архей *Hbt. salinarum* и фоточувствительного трансмембранного белка бактериородопсина.

14. Разработан лабораторный технологический регламент производства иммобилизованной формы биопрепарата, обладающего высокой биокальцинирующей активностью и устойчивостью к щелочной среде для использования в качестве технической добавки, улучшающей функциональные и защитные характеристики бетона. Основой биопрепарата являются чистые культуры бактерий *Lysinibacillus macroides*, выделенные из микробного сообщества гиперсоленого озера. Разработанный регламент обеспечивает биотехнологическое получение биопрепарата и его длительное хранение.

### Основные публикации по теме диссертации:

#### Издания, входящие в перечень ВАК:

1. **Kalenov S. V.**, Belov A. A., Lyapkin E. I., Sachavskii A. A., Panfilov V. I. Problems of non-sterile cultivation of extremely halophilic microorganisms // 20th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2020. V. 20 of Advances in Biotechnology. STEF92 Technology Ltd Vienna, Austria, 2020. P. 105–112. (Scopus)

2. **Калёнов С. В.**, Градова Н. Б., Сивков С. П., Агалакова Е. В., Белов А. А., Суясов Н. А., Хохлачев Н. С., Панфилов В. И. Препарат на основе бактерий, выделенных из гиперсоленых сред, для улучшения функциональных и защитных характеристик бетона // Биотехнология. 2020. Т. 36, № 4. С. 21–28. (Scopus)

3. Vaniushenkova A. A., Ivanova S. N., **Kalenov S. V.**, Markvichev N. S., Belov A. A. The hydrolytic destruction of modified cellulosic materials in conditions simulating a purulent wound // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2020. V. 10. № 6. P. 7265–7277. (Scopus, Web of Science)
4. **Kalenov S. V.**, Vaniushenkova A. A., Dosadina E. E., Panfilov V. I., Belov A. A. The chitosan stabilization of the proteases and constituent of the *H. salinarum* cell lysate during drying and long-term storage // 19th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2019. V. 19 of Advances in Biotechnology. STEF92 Technology Ltd Sofia, Bulgaria, 2019. P. 205–212. (Scopus)
5. Ванюшенкова А. А., Досадина Э. Э., Ханафина А. А., Иванова С. Н., **Каленов С. В.**, Марквичев Н. С., Белов А. А. Влияние высушивания и сроков хранения на свойства хитозановых композитов // *Бутлеровские сообщения*. 2019. Т. 57, № 2. С. 130–143.
6. Volokitin I.A., Belov A.A., Sorokin V.V., Skladnev D.A., **Kalenov S.V.** *Halobacterium salinarum* viruses and optimization of viral induction // 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018. V. 18 of Advances in Biotechnology. STEF92 Technology Ltd Vienna, Austria, 2018. P. 179–18. (Scopus)
7. Maslov I., Bogorodskiy A., Mishin A., Okhrimenko I., Gushchin I., **Kalenov S.**, Dencher Norbert A., Fahlke C., Büldt G., Gordeliy V., Gensch T., Borshchevskiy V. Efficient non-cytotoxic fluorescent staining of halophiles // *Scientific reports*. 2018. V. 8, № 1. P. 1–12. (Scopus, Web of Science)
8. **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. V. 22. № 3. P. 511–523. (Scopus, Web of Science)
9. 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. V. 17 of Advances in Biotechnology. Vienna, Austria, 2017. P. 235–242. (Scopus)
10. Волокитин И. А., **Калёнов С. В.** Обнаружение и выделение вирусов *Halobacterium salinarum* из сообщества экстремальных галофилов // *Бутлеровские сообщения*. 2017. Т. 50. № 5. С. 81–87.
11. Белов А. А., Досадина Э. Э., Савельева Е. Е., Ханафина А. А., Ванюшенкова А. А., Бркич Л. Л., Марквичев Н. С., **Каленов С. В.** Хитозансодержащие композиты протеиназ // *Химическая промышленность сегодня*. 2017. № 7. С. 32–42.
12. Мурзина Е. Д., Бутырин С. П., Побережный Д. Ю., Тумаев М. Д., Белов А. А., Суясов Н. А., Кузнецов А. Е., **Калёнов С. В.** Экспресс-методика анализа С50-каротиноидов галофильных микроорганизмов // *Химическая промышленность сегодня*. 2017. № 7. С. 10–17.
13. **Kalenov S. V.**, Vaurina M. M., Skladnev D. A., Kuznetsov A. Y. High-effective cultivation of *Halobacterium salinarum* providing with bacteriorhodopsin production under controlled stress // *Journal of Biotechnology*. 2016. V. 233. P. 211–218. (Scopus, Web of Science)
14. 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.
15. Борисов В. Д., **Калёнов С. В.** Влияние компонентов питательной среды на развитие экстремально галофильного микробного сообщества // *Бутлеровские сообщения*. 2016. Т. 46. № 6. С. 32–36.
16. Дмитриев Е. А., Трушин А. М., Цветнов А. В., **Калёнов С. В.** Массоперенос при пленочном течении на полупроницаемых поверхностях в микрофльтрационно-десорбционных аппаратах // *Теоретические основы химической технологии*. 2007. Т. 41, № 5. С. 483–490. (Scopus)
17. **Калёнов С. В.**, Кузнецов А. Е. Ресурсосберегающая технология получения бактериородопсина на основе галобактерий // *Химическая промышленность сегодня*. 2007. № 3. С. 23–32.
18. Kouznetsov A. Y., **Kalyonov S. V.**, Soldatov V. I., Seregin A. M., Strakhovskaya M. G., Skladnev D. A. Light as an ambient control factor in the systems of microbiological cultivation and biodestruction // European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004), Oostende (Belgium), April 25–28. Oostende (Belgium), 2004. P. 515–518. (Web of Science)

19. Kouznetsov A. Y., **Kalyonov S. V.** Simultaneous hybrid processes as a way to improve characteristics of cultivation of microorganisms and biodestruction of pollutants // European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004), Oostende (Belgium), April 25-28. Oostende (Belgium), 2004. P. 727–730. (Web of Science)

#### **Монографии:**

1. Глава в книге Belov A.A., Vanyushenkova A.A., Dosadina E. E., Khanafina A. A., **Kalenov S.V.** Development and study of materials for the treatment of wounds and burns based on biodegradable polysaccharide carriers containing proteinases. Ch. 2.3.6.3. Extremely halophilic archaea as promising sources of biologically active substances and potential therapeutic agents // Micro- and nanotechnologies in biomedical engineering (multi volume) Ed. by Alexandru Mihai Grumezescu. Elsevier. 2021. V. 12: Biomaterials (in press).

2. Панфилов В. И., Белодед А. В., **Каленов С. В.**, Грошева В. Д., Кареткин Б. А., Шакир И. В., Кузнецов А. Е., Складнев Д. А. Потенциал бифидобактерий, молочнокислых бактерий и галоархей для биотехнологического получения метаболитов, БАВ, пищевых ингредиентов и кормовых продуктов из растительного сырья. М.: ДеЛи плюс, 2019. 138 с.

#### **Патенты, свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ:**

1. Программа управления биотехнологическими процессами BioDrome3.0: свидетельство 2020613681 Рос. Федерация. № 2020612772; заявл. 03.03.2020; опубл. 19.03.2020, Бюл. № 3.

2. 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.

3. Способ получения биомассы галобактерий: пат. 2323251 Рос. Федерация. № 2006118728; заявл. 30.05.2006; опубл. 27.04.2008, Бюл. № 12. 6 с.

4. Способ получения биомассы галобактерий: пат. 2323226 Рос. Федерация. № 2006118729; заявл. 30.05.2006; опубл. 27.04.2008, Бюл. № 12. 6 с.

#### **Учебные пособия:**

1. **Калёнов С. В.**, Панфилов В. И., Кузнецов А. Е. Дистанционная подготовка биотехнологов: элементы виртуальной образовательной среды. М.: ДМК Пресс, 2014. 94 с.

2. Красноштанова А. А., Кузнецов А. Е., Баурина М. М., **Калёнов С. В.**, Панфилов В. И. Проектирование биотехнологических производств. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2019. 230 с.

#### **Статьи в прочих изданиях:**

1. Волокитин И. А., Баурина М. М., **Калёнов С. В.** Археобактериальные фаги, регулирующие развитие экстремально галофильных микробных сообществ // Успехи в химии и химической технологии. 2016. Т. 30. № 9(178). С. 21-22.

2. Борисов В. Д., **Калёнов С. В.** Изучение биохимических характеристик бактерии *Salicola marasensis*, выделенной из озера Шотт-Эль-Джерид, для выявления трофических связей в составе сообщества // Успехи в химии и химической технологии. 2016. Т. 30. № 9(178). С. 19-20.

3. Мурзина Е. Д., Нагаева В. Е., **Калёнов С. В.** Культивирование галобактерий *Halobacterium salinarum* 353П на синтетических средах // Успехи в химии и химической технологии. 2016. Т. 30. № 9(178). С. 25–27.

4. Кошкарева К. А., **Калёнов С. В.** Характеристика основного компонента экстремального галофильного сообщества из кристаллов соли озера Аликес – перспективного продуцента каротиноидов // Успехи в химии и химической технологии. 2016. Т. 30. № 9(178). С. 23-24.

5. Борисов В. Д., **Калёнов С. В.** Изучение ассоциированных с микроводорослью *Dunaliella salina* культур экстремально галофильного сообщества озера шотт-Эль-Джерид // Успехи в химии и химической технологии. 2015. Т. 29. № 8(167). С. 74-76.

6. Мурзина Е. Д., Занина О. С., Бутырин С. П., Побережный Д. Ю., Атрощик Е. А., Нагаева В. Е., Трищенко А. В., Гордиенко М. Г., Кузнецов А. Е., **Калёнов С. В.** Интегральная характеристика процесса распылительной сушки галобактерий // Успехи в химии и химической технологии. 2015. Т. 29. № 8(167). С. 93-95.

7. Kouznetsov A. Ye, **Kalyonov S. V.** Simultaneous Hybrid Processes as a Way to Improve Characteristics of Cultivation of Microorganisms and Biodestruction of Pollutants // in Research in

Hybrid Materials / Editors: Simon J. Brunner and Julian W. Egge, New York: Nova Science Publishers Inc., 2008. P. 239-244.

8. Kouznetsov A. Ye., **Kalyonov S. V.** Simultaneous hybrid processes as a way to improve characteristics of cultivation of microorganisms and biodestruction of pollutants // in *New Research on the Environment and Biotechnology*, New York: Nova Science Publishers Inc., 2006. P. 99–104.

9. **Калёнов С. В.**, Неручев Ф. А., Карпов А. В., Кузнецов А. Е. Проведение совмещенных ферментационных и фотохимических процессов в гибридном лабораторном биореакторе // *Успехи в химии и химической технологии*. 2002. Т. 16. № 5. С. 84-86.

#### **Тезисы конференций:**

1. Сакаян Д. И., **Калёнов С. В.** Экстремально галофильный изолят из кристаллов соли озера Аликес // *Биохимическая физика*. 2018. С. 135-138.

2. Мурзина Е. Д., Бутырин С. П., Побережный Д. Ю., Нагаева В. Е., Гордиенко М. Г., Ильин М. М., **Каленов С. В.** Влияние метаболитов на хранение биомассы галобактерий *Halobacterium salinarum*, полученной при распылительной сушке // *Совр. проблемы химической технологии биологически активных веществ*. Т. 188. 2016. С. 249–251.

3. Мурзина Е. Д., Побережный Д. Ю., Бутырин С. П., Нагаева В. Е., Гордиенко М. Г., Баурина М. М., **Каленов С. В.** 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.

4. Занина О. С., Мурзина Е. Д., Борисов В. Д., Кошкарева К. А., Бутырин С. П., Побережный Д. Ю., Атрощик Е. А., Нагаева В. Е., Кузнецов А. Е., **Калёнов С. В.** Изучение управляющих факторов развития экстремально галофильного микробного сообщества // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. Т. 1. 2015. С. 342–344.

5. Досадина Э. Э., **Калёнов С. В.**, Белов А. А. Стабилизация хитозаном и лизатом клеток *Halobacterium* sp. протеиназ из гепатопанкреаса краба, иммобилизованных на целлюлозных носителях // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. 2015. Т. 1. С. 213-214.

6. Можаяев А.А., **Калёнов С.В.**, Кузнецов А.Е. Разработка экономичной и эффективной технологии культивирования галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. 2011. Т. 1. С. 352-353.

7. Гордиенко М. Г., Войновский А. А., Кузнецов А. Е., **Калёнов С. В.**, Сергеева А. С. Исследование распылительной сушки биомассы галобактерий // *Инновационные материалы и технологии в химической и фармацевтической отраслях промышленности (X Московский международный салон инноваций и инвестиций)*, Москва. 2010. С. 86-88.

8. **Калёнов С. В.**, Кузнецов А. Е., Складнев Д. А., Морева Е. А. Малозатратная технология культивирования галобактерий с высоким выходом бактериородопсина // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. 2009. Т. 1. С. 407-408.

9. **Каленов С. В.**, Кузнецов А. Е., Складнев Д. А. Аспекты культивирования галобактерий, связанные с увеличением выхода бактериородопсина // *Тезисы междунар. школы-конференции, посвящ. 100-летию со дня рожд. С.И. Алиханяна: Генетика микроорганизмов и биотехнология*, Москва-Пушино. 2006. С. 122-123.

10. Трушин А.М., Кабанов О.В., **Калёнов С.В.** Моделирование и оптимизация рециркуляционных адсорбционных процессов в неподвижном слое активированных углей // 2-ая Международная конференция “Образование и устойчивое развитие”, Москва. 2004. С. 165-165.

11. Серегин А. М., Солдатов В. И., Складнев Д. А., Кузнецов А. Е., **Калёнов С. В.** Использование лазерного излучения при культивировании галобактерий // *Высокие технологии XXI века: Материалы конференции V Международного Форума*, Москва. 2004. С. 335-338.

12. **Калёнов С. В.**, Кузнецов А. Е. Лабораторный биореактор с системой удаленного доступа для сбора данных и контроля ферментационных процессов на базе LabVIEW фирмы “National Instruments” // *Сб. трудов Международной конференции «Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LabVIEW и технологии National Instruments»*, Москва. 2003. С. 138-141.

13. **Каленов С. В.**, Кузнецов А.Е., Косивцов Ю. Ю. Лабораторный биореактор с системой удаленного доступа для сбора данных и контроля ферментационного процесса // *Биотехнология: состояние и перспективы развития*. 2002. С. 208-209.