

На правах рукописи

УСТИНСКАЯ ЯНА ВИТАЛЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ СИНТЕЗА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
ФОТОТРОФНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ**

1.5.6. «Биотехнология»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва 2024

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет».

Научный руководитель: **Дворецкий Дмитрий Станиславович,**
доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет»

Официальные оппоненты: **Сироткин Александр Семенович,**
доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Промышленной биотехнологии» ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Политаева Наталья Анатольевна,
доктор технических наук, профессор, профессор Высшей школы гидротехнического и энергетического строительства ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Защита состоится «16» апреля 2024 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 99.0.027.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», по адресу: 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9, в конференц-зале (ауд. 443).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» и на сайте <http://diss.mustr.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
99.0.027.03, к.т.н., доцент



И. В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы:

В соответствии с «Прогнозом научно-технологического развития России» до 2030 года одним из приоритетных направлений научных исследований промышленной биотехнологии является получение биологически активных клеточных метаболитов. Перспективными продуцентами для синтеза биологически активных соединений являются фототрофные микроорганизмы (микроводоросли и цианобактерии), имеющие высокую скорость роста, гибкий метаболизм и способные быстро адаптироваться к изменяющимся условиям культивирования.

За последние два десятилетия активно проводятся исследования, описывающие антибактериальный эффект биологически активных соединений микроводорослей и цианобактерий (антибактериальные пептиды и вещества липидной природы), которые могут применяться в качестве антибактериальных агентов в области охраны здоровья животных, аквакультур, защиты сельскохозяйственных культур и дезинфекции воды. Одним из наиболее интересных продуктов, получаемых из микроводорослей, является водный экстракт, содержащий белки, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, водорастворимые витамины, стероидные соединения, стимулирующие протекание различных метаболических процессов клеток.

Однако активное развитие производств антибактериальных и стимулирующих веществ тормозится недостаточной изученностью подходов к реализации процессов основных стадий получения данных продуктов, что подтверждает актуальность таких исследований.

Настоящие исследования проводились на кафедре «Технологии и оборудование пищевых и химических производств» ФГБОУ ВО ТГТУ при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-4348.2022.4), гранта в области науки из федерального бюджета для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2235.2020.8).

Цель работы: Разработка технологических основ синтеза биологически активных метаболитов микроводорослями *Chlorella sorokiniana* и цианобактериями *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Исследование влияния технологических параметров культивирования на количество метаболитов (неполярных веществ

липидной природы и водорастворимых белков) микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404.

2. Определение возможности повышения интенсивности и степени извлечения внутриклеточных водорастворимых белков из биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

3. Изучение антибактериального действия метаболитов микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 на грамположительные бактерии.

4. Исследование потенциала белкового экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, определение концентрации экстракта в составе питательной среды, стимулирующей рост клеток дрожжей.

5. Разработка принципиальной технологической схемы получения веществ антибактериального и стимулирующего действия на основе микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Научная новизна. Идентифицирован механизм комплексного действия различных методов дезинтеграции (ферментом лизоцимом, ультразвуком и сверхвысокочастотным излучением (СВЧ-излучением)) клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на выход внутриклеточных водорастворимых белков.

Установлена закономерность влияния белого света на антибактериальное действие неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций из штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404.

Получены экспериментальные данные о значениях минимальных ингибирующих концентраций (МИК) неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций на грамположительные бактерии.

Определено, что водорастворимая белковая фракция микроводорослей *Chlorella sorokiniana* может быть использована в качестве компонента питательной среды для культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Теоретическая и практическая значимость.

Определены технологические режимы культивирования микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, позволяющие накопить биомассу клеток с повышенным содержанием неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков.

Установлено, что метод комплексного последовательного использования ультразвука и фермента для дезинтеграции биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* позволяет увеличить выход внутриклеточных водорастворимых белков в 14,7 раз по сравнению с контролем.

Разработанная принципиальная технологическая схема может быть использована для организации производства веществ антибактериального (в качестве антибактериальных агентов против грамположительных бактерий) и стимулирующего действия (в качестве фактора роста при культивировании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) на основе микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Научные положения, выносимые на защиту:

- подходы к культивированию микроводорослей *Chlorella sorokiniana* и цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, позволяющие накопить биомассу клеток с повышенным содержанием неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков;

- подходы к организации эффективных режимов дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, с точки зрения максимального выхода внутриклеточных водорастворимых белков;

- результаты теоретических и экспериментальных исследований антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404, а также стимулирующих свойств водорастворимой белковой фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на рост эукариотических клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Методология и методы исследования. Культивирование микроорганизмов осуществляли с применением стандартных методов, применяемых в биотехнологии и микробиологии. Результаты эксперимента получены в трех повторностях. В работе использованы современные методы физико-химического анализа: спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, газовая хроматография. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Matlab и Microsoft Excel. Статистический анализ проводился с использованием SPSS (статистический пакет для социальных наук) версии 20.0.

Степень достоверности. Достоверность и обоснованность основных положений и выводов диссертации подтверждаются: 1) корректным использованием методологии научного исследования; 2) согласованностью теоретических результатов и экспериментальных

данных, полученных с использованием современных методов измерения и сертифицированных приборов, с известными литературными данными.

Апробация результатов. Основные результаты работы представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе на 14-th International Conference on Chemical and Process Engineering (Болонья, 2019), 15-th International Conference on Chemical and Process Engineering. (Милан, 2021), Проблемы и инновационные решения в химической технологии ПИРХТ (Воронеж, 2019, 2022), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» (Москва, 2023), XVIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2023).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 - Биотехнология по п. 2 (в части: технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов...), п. 3, 5.

Публикации результатов работы. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 1 работа в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ, 7 печатных работ, входящих в международную реферативную базу данных Scopus и международную реферативную базу WoS, 2 свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Личный вклад автора состоял в сборе и анализе литературных данных, планировании работ и получении экспериментальных результатов, участии в обработке и анализе полученных данных, написании и оформлении публикаций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы, включающего 219 источников. Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста, иллюстрирована 35 рисунками, 52 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулирована цель работы, обоснована ее актуальность, определены основные направления исследования.

В первой главе проанализировано и обобщено состояние исследований в области использования фототрофных агентов как перспективного сырьевого источника для получения веществ антибактериального и стимулирующего действия. Отдельно

рассмотрены перспективные методы культивирования и дезинтеграции микроводорослей и цианобактерий. Представлен обзор оборудования для культивирования фототрофных агентов, рассмотрены технические и конструкционные особенности различных видов фотобиореакторов.

На основании проведенного анализа сформулированы задачи диссертационной работы.

Во второй главе приведено описание основных методик и материалов, используемых для проведения экспериментальных исследований диссертационной работы.

В третьей главе представлены результаты экспериментов и их обсуждение.

При изучении влияния условий культивирования на качественный и количественный состав метаболитов цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 и микроводорослей *Chlorella sorokiniana* установлено, что условия культивирования (уровень фотосинтетически активной радиации (ФАР) и температура) оказывают значительное влияние на содержание неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков в биомассе клеток обоих штаммов (табл. 1).

Таблица 1 – Условия культивирования штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404

Режим	ФАР, мкмоль фотонов/(м ² ·с)	Температура, °С
1	33 ± 0,1	20 ± 0,1
2	100 ± 0,1	20 ± 0,1
3	33 ± 0,1	36 ± 0,1
4	100 ± 0,1	36 ± 0,1

Наибольшие концентрации биомассы клеток *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 наблюдались на 7 сутки культивирования в условиях режима 4 (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м²·с); температура = 36 ± 0,1 °С).

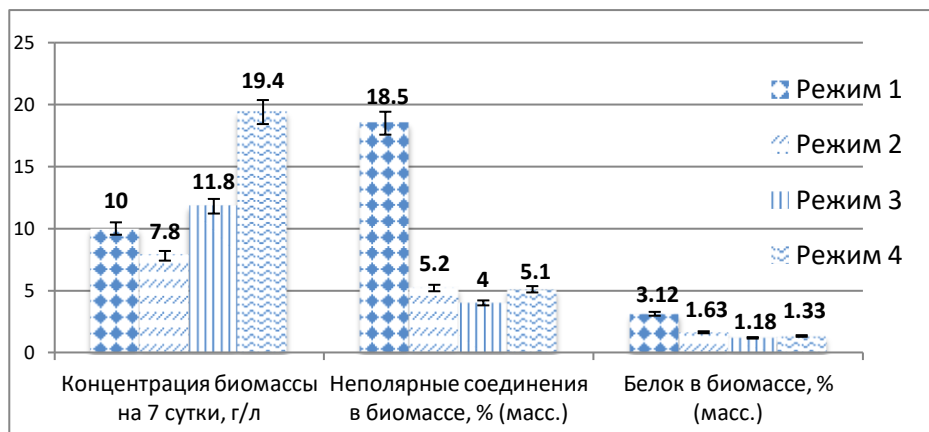


Рисунок 1 – Концентрации биомассы, неполярных соединений липидной природы и внутриклеточного белка цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404

Наиболее значительное накопление неполярных соединений липидной природы в биомассе клеток *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404 наблюдалось в условиях культивирования режима 1 (ФАР = $33 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/($m^2 \cdot c$); температура $20 \pm 0,1$ °C), что связано, по-видимому, с тем, что данные условия культивирования являются стрессовыми для штаммов и вызывают значительную перестройку метаболизма (рис. 1, 2).

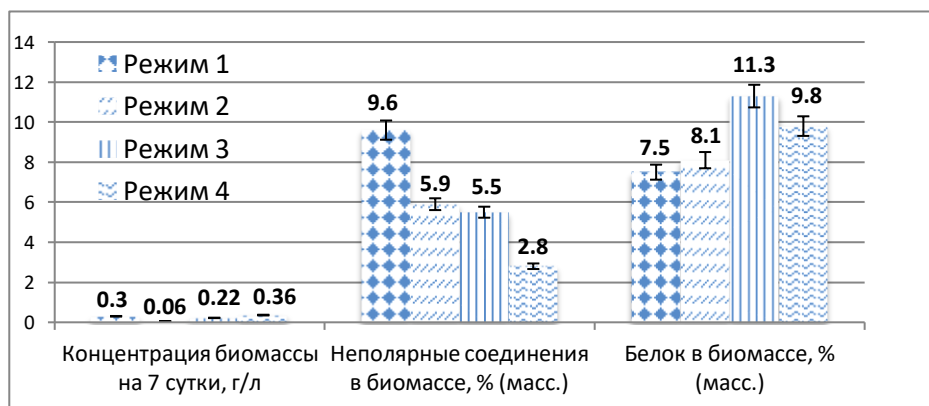


Рисунок 2 – Концентрации биомассы, неполярных соединений липидной природы и внутриклеточного белка микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Для исследования возможности повышения интенсивности и степени извлечения внутриклеточных водорастворимых белков из биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* приводились экспериментальные исследования сравнительного анализа различных методов дезинтеграции клеток микроводорослей (фермент лизоцим, СВЧ-излучение и ультразвук), позволяющих извлечь наибольшее количество водорастворимого внутриклеточного белка с минимальными энергетическими затратами. Отрицательным контролем была биомасса микроводорослей без предварительной дезинтеграции.

Установлено, что при дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* ферментом лизоцимом, наблюдается выход водорастворимого внутриклеточного белка не менее 3 % (масс.); при дезинтеграции клеток микроводорослей с помощью СВЧ-излучения – не менее 3,3 % (масс.); при дезинтеграции клеток микроводорослей ультразвуком – не менее 1,3 % (масс.). На следующем этапе исследовалось влияние комплексной дезинтеграции биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* на выход внутриклеточного водорастворимого белка (табл. 2). Определено, что метод комплексного последовательного использования ультразвука и фермента лизоцима для дезинтеграции биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* позволяет увеличить выход внутриклеточных водорастворимых белков в 14,7 раз по сравнению с контрольным образцом.

Таблица 2 – Условия проведения эксперимента по комплексной дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Стадия 1	τ_1 , мин	Стадия 2	τ_2 , мин	τ , мин	$\bar{S} \pm 1,9$ мкм ²	Мощность, кДж	Белки, % (масс.)
Ультразвук	5,0	Фермент	240,0	245,0	42,5	40,9	20,6
СВЧ	0,5	Фермент	240,0	240,5	33,8	53,7	11,3
Фермент	0,0	Ультразвук	5,0	245,0	33,8	40,4	9,5
Фермент	0,0	СВЧ	0,5	240,5	28,3	53,7	9,5
Ультразвук	5,0	СВЧ	0,5	5,5	29,0	87,4	3,5
СВЧ	0,5	Ультразвук	5,0	5,5	38,0	87,4	4,6
Фермент	240,0	СВЧ	0,5	240,5	40,7	53,7	4,4
Фермент	240,0	Ультразвук	5,0	245,0	50,2	40,4	5,6
Отрицательный контроль					38,5	-	1,4

\bar{S} – средняя площадь клеточной поверхности, τ – время обработки.

На следующем этапе проводились исследования антибактериальных свойств неполярных соединений, извлеченных из культуральной жидкости и биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Таблица 3 – Зоны ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации неполярных веществ липидной природы из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Количество, мкг	Зоны ингибирования неполярных веществ липидной природы из биомассы <i>Chlorella sorokiniana</i> *, мм			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
Свет (ФАР=100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))				
1000	7,3 ± 1,53	8,2 ± 1,0 ^a	-	12,0 ± 0,1 ^a
500	-	6,97 ± 0,06 ^b	-	9,0 ± 0,1 ^b
МИК, мкг/мл	≈ 1000	198 (R ² =1)	-	125 (R ² =1)

*-значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n=3); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Установлено, что ингибирующее действие на рост грамположительных бактерий при освещении белым светом оказывает неполярный экстракт из биомассы, получаемой в условиях режимов 1, 2 и 4. МИК неполярной липидной фракции в условиях режима 4 ≈ 125 мкг/мл (R² = 1). В данном исследовании в отсутствие освещения ингибирующий эффект не наблюдался (табл. 3).

Таблица 4 – Состав неполярных веществ липидной природы из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Вещество	Концентрация, мг/мл
Триацилглицериды	47,5
Жирные кислоты	35
О-диалкилмоноглицериды	25
Эфиры стероидов или эфиры восков или триалкиловые эфиры глицерина	30
Каротиноиды	0,005
Хлорофилл	0,001

При определении качественного и количественного состава неполярных веществ липидной природы, извлеченных из клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, культивируемых в условиях режима 4, было установлено, что общая концентрация веществ,

идентифицированных методом тонкослойной хроматографии, в смеси составляла приблизительно 138 мг/мл (табл. 4).

Далее проводилось исследование антибактериальных свойств отдельных фракций неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

Таблица 5 – Антибактериальная активность триацилглицеридов и жирных кислот микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Вещество	Кол-во вещ-ва в лунке, мкг	Зоны ингибирования, мм*
Триацилглицериды	1000 ± 33	13,7 ± 0,6 ^a
	800 ± 27	12,7 ± 0,6 ^a
	600 ± 20	12 ± 0 ^a
	400 ± 13	11 ± 1 ^b
МИК, мкг/мл		176,2 (R ² =0,96)
Жирные кислоты	1000 ± 34	11,7 ± 0,6 ^a
	800 ± 27	11 ± 1 ^a
	600 ± 20	9 ± 0 ^b
МИК, мкг/мл		445 (R ² =0,98)

*-значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n=3); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Выявлено, что из всех веществ липидной природы, входящих в состав неполярного экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, антибактериальным действием обладают триацилглицериды и жирные кислоты при уровне ФАР $100 \pm 0,1$ мкмоль фотонов/(м²·с). МИК ≈ 176,2-445 мкг/мл (табл. 5).

При исследовании антибактериальных свойств полученных водорастворимых пептидных фракций из культуральной жидкости и из биомассы клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* выявлено, что пептидные фракции из биомассы, полученной в условиях режима 4, обладают антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как при освещении белым светом, так и в темноте (табл. 6). Таким образом, данный режим является наиболее перспективным для получения пептидных фракций, имеющих величины МИК ≈ 125 и 170 мкг/мл (R² = 0,89) соответственно. Определено, что освещение влияет на величину МИК.

Таблица 6 – Антибактериальные свойства водорастворимых пептидных фракций, извлеченных из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*

Количество, мкг	Зоны ингибирования пептидных экстрактов из биомассы микроводорослей <i>Chlorella sorokiniana</i> , мм*			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота			
800 ± 27	-	-	-	12,7 ± 0,5 ^a
700 ± 24	-	-	-	11,5 ± 0,5 ^{ab}
600 ± 20	-	-	-	11,2 ± 0,2 ^b
500 ± 17	-	-	-	11,0 ± 0,4 ^b
400 ± 13	-	-	-	9,0 ± 0,7 ^c
МИК, мкг/мл	-	-	-	170 (R ² =0,89)
	Свет (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))			
800 ± 27	-	-	-	12,7 ± 0,4 ^a
700 ± 24	-	-	-	11,4 ± 0,5 ^b
600 ± 20	-	-	-	11,1 ± 0,4 ^b
500 ± 17	-	-	-	10,8 ± 0,4 ^b
400 ± 13	-	-	-	8,2 ± 0,6 ^c
МИК, мкг/мл	-	-	-	125 (R ² =0,9)

*-значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n=3); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Далее проводились исследования антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы из культуральной жидкости цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 (табл. 7).

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что неполярные вещества липидной природы из культуральной жидкости *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 обладают значительными антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м²·с)), так и в темноте.

Условия культивирования штамма значительно влияют на эффективность воздействия экстракта в отношении грамположительных бактерий, наиболее перспективны режимы культивирования 1 и 2, позволяющие получить неполярные вещества липидной природы, имеющие величины МИК 54-90 мкг/мл и 27-41 мкг/мл соответственно. При этом установлено, что освещение влияет на величину МИК.

Таблица 7 – Зоны ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации неполярных веществ липидной природы из культуральной жидкости цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404*

Количество, мкг	Зоны ингибирования неполярных веществ липидной природы из культуральной жидкости <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS B-404*, мм			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	Темнота			
1000 ± 33	12,67 ± 0,67 ^a	13,33 ± 0,67 ^a	19,53 ± 1,78 ^a	17,87 ± 1,45 ^a
500 ± 17	8,77 ± 0,01 ^b	11,03 ± 0,84 ^a	11,67 ± 0,67 ^b	7,17 ± 0,16 ^b
100 ± 3	6,63 ± 0,01 ^c	7,43 ± 0,10 ^b	-	-
50 ± 2	-	6,83 ± 0,45 ^c	-	-
МИК, мкг/мл	90 (R ² =0,9)	41 (R ² =0,95)	330 (R ² =1)	462 (R ² =1)
Свет (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м ² ·с))				
1000 ± 33	28,67 ± 2,45 ^a	23,67 ± 0,67 ^a	21,37 ± 0,79 ^a	15,43 ± 0,05 ^a
800 ± 27	24,67 ± 2,45 ^{ab}	22,67 ± 0,67 ^a	19,90 ± 0,51 ^a	13,57 ± 0,89 ^{ab}
600 ± 20	22,67 ± 2,41 ^b	19,33 ± 2,67 ^{ab}	19,07 ± 0,98 ^a	11,60 ± 0,21 ^{ab}
400 ± 13	15,00 ± 0,46 ^c	17,33 ± 2,67 ^b	14,30 ± 0,91 ^b	11,33 ± 0,11 ^b
200 ± 7	14,67 ± 0,67 ^c	15,33 ± 2,45 ^b	8,33 ± 0,67 ^c	7,9 ± 0,51 ^b
100 ± 3	8,40 ± 0,13 ^d	14,33 ± 0,67 ^b	7,60 ± 0,96 ^c	-
50 ± 2	7,33 ± 0,67 ^e	6,67 ± 0,67 ^c	-	-
МИК, мкг/мл	54 (R ² = 0,9)	27 (R ² = 0,95)	101 (R ² = 0,95)	131 (R ² = 0,95)

*-значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n=3); значения с разными буквами достоверно отличаются при p < 0,05.

Было установлено, что при дополнительном воздействии светового излучения повышается эффективность воздействия экстракта на грамположительные бактерии, величина минимальной ингибирующей концентрации уменьшается в 1,5-3,5 раза. Данное наблюдение согласуется с теорией перекисного окисления органических соединений Баха-Энглера, развитой в дальнейшем академиком Н.Н. Семеновым на основе разработанной им теории цепных реакций. Такому окислению подвергаются в первую очередь вещества, содержащие в своем составе двойные связи, например, ненасыщенные жирные кислоты.

В таблице 8 представлены результаты эксперимента по исследованию антибактериальных свойств неполярных веществ липидной природы из биомассы цианобактерий *Anabaena sphaerica* IP-

PAS В-404. Установлено, что освещение не оказывает влияния на величину МИК.

Таблица 8 – Зоны ингибирования и минимальные ингибирующие концентрации неполярных веществ липидной природы из биомассы цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404

Количество, мкг	Зоны ингибирования неполярных веществ липидной природы из биомассы <i>Anabaena sphaerica</i> IPPAS В-404*, мм			
	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4
	<i>Темнота</i>			
1000 ± 33	7,67 ± 0,67	-	-	7,77 ± 0,03 ^a
900 ± 30	-	-	-	7,16 ± 0,15 ^b
МИК, мкг/мл	≈1000	-	-	830 (R ² =1)
	<i>Свет (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м²·с))</i>			
1000 ± 33	8,67 ± 2,45	-	-	8,80 ± 0,08 ^a
900 ± 30	-	-	-	8,40 ± 0,06 ^a
800 ± 27	-	-	-	7,87 ± 1,49 ^a
500 ± 17	-	-	-	7,70 ± 0,29 ^{ab}
200 ± 7	-	-	-	6,92 ± 0,02 ^b
100 ± 3	-	-	-	6,40 ± 0,25 ^b
МИК, мкг/мл	≈1000	-	-	72 (R ² = 0,94)

*-значения представляют собой среднее значение ±стандартное отклонение для трехкратно повторяющихся экспериментов (n=3); значения с разными буквами достоверно отличаются при $p < 0,05$.

Полученные водорастворимые пептидные фракции из культуральной жидкости и из биомассы клеток *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 были протестированы на наличие антибактериальных свойств. Установлено, что пептидные фракции из биомассы обладают антибактериальными свойствами в отношении грамположительных бактерий как на свету (ФАР = 100 ± 0,1 мкмоль фотонов/(м²·с)), так и в темноте в условиях режима 4, что делает его наиболее перспективным для получения пептидных фракций, имеющих величины МИК 191 и 323 мкг/мл соответственно. Выявлено, что освещение оказывает влияние на величину МИК.

Результаты исследования стимулирующих свойств водорастворимой белковой фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana* позволяют сделать вывод, что культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на питательной среде с добавлением белкового экстракта в количестве 0,005 (образец №3) и 0,01 мл/мл питательной среды (образец №4) существенно

отличается от культивирования контрольного образца №1 (без добавления экстракта) и образца №2 (0,0025 мл/мл питательной среды) (рис. 3-4).

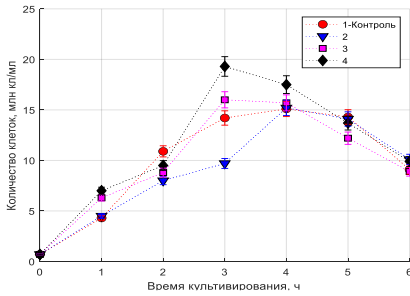


Рисунок 3 – Изменение концентрации клеток дрожжей

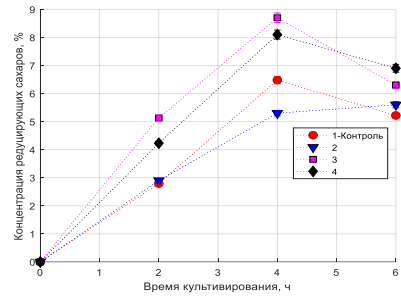


Рисунок 4 – Изменение концентрации редуцирующих сахаров

Предположительно, в составе водорастворимого экстракта микроводорослей *Chlorella sorokiniana* содержатся вещества, стимулирующие рост и размножение клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, белки, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, водорастворимые витамины, что приводит к увеличению основных количественных характеристик процесса культивирования образцов №3 и №4 (табл. 9).

Таблица 9 – Расчет основных количественных характеристик процесса культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (экспоненциальная фаза)

№	Экстракт, мл / мл ПС	μ , ч ⁻¹	g , ч	τ , ч	N , млн кл/мл
1 (К)	-	$0,80 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,03$	$4 \pm 0,20$	$15,20 \pm 0,30$
2	0,0025	$0,80 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$	$4 \pm 0,10$	$15,20 \pm 0,30$
3	0,005	$1,05 \pm 0,02$	$0,67 \pm 0,02$	$3 \pm 0,20$	$16,00 \pm 0,20$
4	0,01	$1,10 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,02$	$3 \pm 0,10$	$19,30 \pm 0,20$

K – контроль, ПС – питательная среда, μ – удельная скорость роста клеток, g – время генерации, τ – время экспоненциальной фазы, N – емкость популяции.

В четвертой главе на базе полученного массива экспериментальных данных предложена технологическая схема производства неполярных веществ липидной природы антибактериального действия (линия 1), пептидных фракций (линия 2) и водного экстракта стимулирующего действия (линия 3), из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana* (рис. 5).

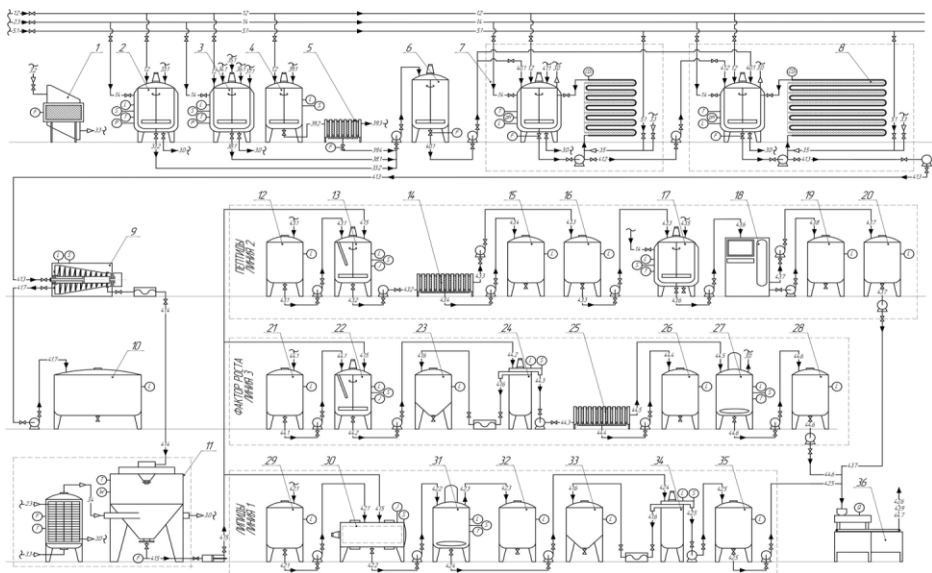


Рисунок 5 – Принципиальная технологическая схема производства антибактериальных и стимулирующих веществ из микроводорослей *Chlorella sorokiniana*:

1 – установка для тонкой очистки воздуха; 2-4,6 – емкости для приготовления питательной среды; 5, 14, 25 – фильтр мембранный; 7, 8 – фотобиореакторы; 9, 24, 34 – центрифуга; 10 – емкость для культуральной жидкости; 11 – сушилка; 12, 21 – емкость для фосфатного буфера; 13, 22 – ультразвуковой экстрактор; 15 – резервуар для пермеата; 16 – резервуар для пасты белков; 17 – установка для протеолиза; 18 – установка для ионнообменной хроматографии; 19, 26 – емкость для примесей; 20 – емкость для пептидов; 23,33 – емкость для отработанной биомассы; 28 – емкость для водного экстракта; 29 – емкость для петролейного эфира; 30 – экстрактор СВЧ; 27, 31 – дистиллятор; 32 – емкость для отработанного петролейного эфира; 35 – емкость для липидов; 36 – фасовочный аппарат.

ВЫВОДЫ

1. Найдены эффективные технологические режимы (уровень ФАР, температура) культивирования цианобактерий *Anabaena sphaerica* IPPAS В-404 и микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, позволяющие накопить биомассу клеток с повышенным содержанием неполярных веществ липидной природы и водорастворимых белков.

2. Определены эффективные режимы дезинтеграции клеток микроводорослей *Chlorella sorokiniana* с точки зрения наибольшего выхода внутриклеточных водорастворимых белков.

3. Выявлена закономерность влияния белого света на антибактериальное действие неполярных веществ липидной природы и водорастворимых пептидных фракций штаммов *Chlorella sorokiniana* и *Anabaena sphaerica* IPPAS B-404.

4. Определено, что добавление водорастворимой белковой фракции микроводорослей *Chlorella sorokiniana* приводит к повышению емкости популяции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на 21 % и увеличению удельной скорости роста клеток на экспоненциальной фазе в 1,4 раза по сравнению с контролем.

5. Предложена принципиальная технологическая схема получения веществ антибактериального и стимулирующего действия из биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Дворецкий Д.С., Темнов М.С., Маркин И.В., Бушковская А.И., Устинская Я.В., Санталов Р.Д., Еськова М.А. Оценка возможности комплексного использования сточных вод для биосинтеза липидов и молочной кислоты. Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. – 2017. – Т. 3. – № 65. – С. 9-16.

Статьи в журналах, входящих в реферативные базы ISI Web of Science и Scopus:

2. Temnov M.S., Ustinskaya Ya.V., Meronyuk K.I., Dvoretzky D.S. A. Study of Complex Cell Disruption Methods of Intracellular Water-Soluble Protein Extraction from *Chlorella sorokiniana*. Industrial Biotechnology. – 2023. – Vol. 19. – P. 145-150.

3. Temnov M.S., Ustinskaya Ya.V., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Dvoretzky D.S. Comparative analysis of disintegration methods of *Chlorella sorokiniana* cells that increase the efficiency of extraction of intracellular water-soluble proteins. ChemChemTech [Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.]. – 2022. – Vol. 65(4). – P. 79-86.

4. Дворецкий Д.С., Темнов М.С., Маркин И.В., Устинская Я.В., Еськова М.А. Вопросы разработки эффективной биотехнологии синтеза ценных компонентов из биомассы микроводорослей. Теоретические основы химической технологии. – 2022. – Т. 56. – № 4. – С. 418-433.

5. Temnov M.S., Ustinskaya Y.V., Eskova M.A., Meronyuk K.I., Golubyatnikov O.O., Dvoretzky S.I., Dvoretzky D.S. Analysing the Influence of Cultivation Conditions on the Activity of Metabolic Pathways of Bcaa Biosynthesis in *Chlorella Vulgaris* Microalgae. Chemical Engineering Transactions. – 2021. – Vol. 86. – P. 169-174.

6. Dvoretzky D., Dvoretzky S., Temnov M., Akulinin E., Markin I., Ustinskaya Y., Eskova M., Meronyuk K. Research into the Influence of Cultivation Conditions on

the Fatty Acid Composition of Lipids of *Chlorella Vulgaris* Microalgae. Chemical engineering transactions. – 2020. – Vol. 79. – С. 31-36.

7. Dvoretzky D., Dvoretzky S., Temnov M., Markin I., Akulinin E., Golubyatnikov O., Ustinakaya Y., Eskova M. Experimental research into the antibiotic properties of *Chlorella vulgaris* algal exometabolites. Chemical Engineering Transactions. – 2019. – Vol. 74. – С. 1429-1434.

8. Темнов М.С., Устинская Я.В., Еськова М.А., Лабутин А.Н., Дворецкий С.И., Дворецкий Д.С. Вопросы интеграции технологий очистки сточных вод и производства возобновляемых источников энергии. – 2019. – Т. 62. – № 12. – С. 125-134.

Публикации в других изданиях

9. Темнов М.С., Устинская Я.В., Меронюк К.И. Исследование антибиотических свойств пептидных фракций биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*, Пищевые технологии и биотехнологии. XVIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная 40-летию биотехнологического образования в КНИТУ. 18 – 21 апреля 2023. С. 256-259.

10. Темнов М.С., Устинская Я.В., Еськова М.А., Меронюк К.И. Исследование антибиотических свойств липидной фракций биомассы микроводорослей *Chlorella sorokiniana*. Пищевые технологии и биотехнологии. XVIII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященная 40-летию биотехнологического образования в КНИТУ. 18 – 21 апреля 2023 г. С. 260-263.

11. Устинская Я.В., Меронюк К.И., Еськова М.А., Темнов М.С., Дворецкий Д.С. К вопросу получения водного экстракта хлореллы и использования его в качестве компонента питательной среды при культивировании *Saccharomyces cerevisiae*. Проблемы и инновационные решения в химической технологии ПИРХТ-2022: материалы всероссийской конференции с международным участием. С. 84-90.

Свидетельства о государственной регистрации программы для ЭВМ

12. Темнов М.С., Дворецкий Д.С., Дворецкий С.И., Акулинин Е.И., Голубятников О.О., Маркин И.В., Устинская Я.В., Еськова М.А. Расчет концентрации клеток микроводорослей в суспензии. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020662770. 19.10.2020.

13. Темнов М.С., Дворецкий Д.С., Дворецкий С.И., Акулинин Е.И., Голубятников О.О., Устинская Я.В., Еськова М.А. Расчет кинетики метаболических путей глутамина и триацилглицеринов в клетке микроводорослей. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021660334. 24.06.2021.

Учебные пособия

14. Перспективные биотехнологии микроводорослей: учебное пособие / Д. С. Дворецкий, М. С. Темнов, Я. В. Устинская, М. А. Еськова. – Тамбов: Издательский центр ФГБОУ ВО «ТГТУ», 2021. – 124 с.