

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

Мурзина Екатерина Дмитриевна

**ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ
Halobacterium salinarum НА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ
ГИДРОЛИЗАТАХ ЗЕРНОВЫХ**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
технических наук

Научный руководитель: кандидат технических наук, доцент
Калёнов Сергей Владимирович

Москва – 2019 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Общая характеристика экстремальных галофильных микроорганизмов.....	9
1.2. Галофильные археи.....	11
1.3. Экстремальные галофильные микроорганизмы – уникальные природные источники биологически активных веществ.....	13
1.3.1. Каротиноиды галоархей и других экстремально галофильных микроорганизмов.....	13
1.3.2. Биологически активные вещества галобактерий.....	20
1.3.3. Применение биомассы и отдельных биологически активных веществ галофильных микроорганизмов.....	28
1.4. Культивирование галоархей.....	32
1.4.1. Варианты культивирования галоархей.....	32
1.4.2. Гидролизаты зерновых как перспективные источники компонентов для питательных сред галоархей.....	37
1.5. Сохранение биомассы экстремальных галофильных архей.....	39
1.5.1. Методы высушивания биомассы галобактерий.....	40
1.5.2. Сравнительный анализ методов высушивания биомассы микроорганизмов.....	44
1.5.3. Сушка ферментных препаратов и термолабильных биологически активных веществ.....	46
1.5.4. Стабилизирующие вещества.....	50
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56
2.1. Объект исследования.....	56
2.2. Питательные среды для культивирования галобактерий.....	57
2.3. Культивирование <i>H. salinarum</i> на ферментолизатах зерновых.....	59
2.4. Культивирование галобактерий в биореакторе.....	60
2.5. Критерии активности культуры галобактерий.....	61
2.6. Определение аминокислотного состава образцов.....	63
2.7. Определение амилолитической активности ферментных препаратов по крахмалу.....	67
2.8. Определение протеолитической активности по казеину.....	68
2.9. Распылительная сушка галобактерий.....	69
2.10. Лиофильная сушка галобактерий.....	71
2.11. Хранение высушенных образцов.....	72
2.12. Методы определения микробиологических и биохимических характеристик высушенных образцов.....	72
2.13. Разработка нейросетевой модели.....	74
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	77
3.1. Культивирование галобактерий на ферментолизатах зерновых..	77
3.1.1. Выбор ферментных препаратов.....	77
3.1.2. Получение ферментолизатов зерновых.....	78

3.1.3. Высокоплотностное культивирование в мембранном реакторе.....	85
3.2. Распылительное высушивание биомассы галобактерий.....	87
3.2.1. Оптимизация параметров распылительного высушивания методом искусственных нейронных сетей.....	89
3.2.2. Микробиологические и биохимические характеристики высушенных образцов.....	89
3.2.3. Анализ клеточной структуры образцов, высушенных на распылительной сушке.....	95
3.2.4. Хранение высушенных образцов.....	99
3.2.5. Влияние протекторов на выживаемость галобактерий, высушенных на распылительной сушке.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	133
Справка о депонировании.....	144
Акт о внедрении результатов работы на производство.....	145

ВВЕДЕНИЕ

Экологические ниши с повышенной концентрацией соли, высокими температурой и уровнем облучения, встречающиеся во всех уголках планеты – в природных рассолах, открытом море, солонцах, являются средой обитания микроорганизмов, перспективных для биотехнологического производства. Такие микроорганизмы могут обладать специфической физиологией, позволяющей им выживать в условиях повышенного осмотического давления, высокой плотности популяции, температуры, облучения, оксидативного стресса, что ведет к определенному набору биохимических механизмов и пула биологически активных соединений, обладающих рядом уникальных особенностей. Эти формы жизни могут иметь важное значение для применения в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве в качестве продуцентов известных веществ или как объектов принципиально новых биологически активных соединений. [1, 2]

Среди экстремофилов находится много архей, отличающихся от бактерий и эукариот особенностями своей молекулярной организации.

Первое упоминание о галофильных микроорганизмах встречается еще в древнем Риме, где окрашенные частички соли использовали в качестве «денег»; в древнем Китае и на Дальнем Востоке пигменты использовались как биомаркер для определения объектов для добычи соли. Древние греки в IV—III веках до н.э. использовали рыбный соус – прототип азиатских рыбных соусов, например, тайского соуса Нам Пла – характерный вкус которому придавали метаболиты галофильных архей. [3, 4]

В настоящее время экстремальными галофилами заинтересованы исследователи всего мира. Наиболее исследованными являются экстремальные галоархеи *Halobacterium salinarum*, биомасса которых содержит незаменимые витамины, микроэлементы, галоцины, специфические ферменты, фосфолипиды, и является источником C_{50} – каротиноидов и бактериородопсина. [1 – 4]

Препараты галобактерий используют в косметической и фармацевтической промышленности; ферменты, галоцины и археасомы (липосомы) *H. salinarum* являются перспективными средствами доставки лекарств в организме. В

литературе имеются данные по использованию бактериородопсина (БР) – ретиналь-содержащего белка – в разработках молекулярных электронных устройств, в голографических пленках и оптических компьютерах. Американскими учеными во главе с Birdge удалось разработать прототип высокоскоростной оптической памяти, используя БР в качестве чувствительного слоя диска. [5 – 11]

В промышленных условиях получение биомассы галобактерий является труднореализуемым и дорогостоящим процессом. Известно, что использование триптона, пептона, дрожжевого экстракта в качестве основных источников питания, а также определенные требования к технологическому оформлению, материалам оборудования для культивирования, способствуют увеличению себестоимости продукции. При этом выход и конечный состав биомассы варьирует при незначительных изменениях параметров процесса.

Для стабилизации процесса культивирования и удешевления процесса выделения целевых компонентов из биомассы *H. salinarum* с целью получения высокоплотной культуры был предложен метод культивирования при использовании адсорбентов или мембранных методов, что позволяло уменьшить влияние метаболитов на показатели процесса культивирования. [12, 13]

Однако, необходимые компоненты питательной среды для культивирования галофильных микроорганизмов остаются дорогостоящими и поставляются из-за рубежа. Разработка технологии получения биомассы галофилов путем импортозамещения основных компонентов питательной среды в настоящее время является важной практической задачей. [14]

В биотехнологическом производстве в качестве основной составляющей питательной среды для выращивания разных культур микроорганизмов используют ферментативные гидролизаты зерновых. [15 – 20] Получение таких продуктов, как аминокислоты, крахмалы из зерна путем его глубокой переработки решает сразу два вопроса: импортозамещения и хранения излишков зерна. К тому же для биотехнологической переработки подходит зерно любого класса и качества. [21]

Анализ литературных данных показывает, что к настоящему времени для увеличения эффективности получения биомассы *H. salinarum* не были использованы источники аминокислот и ростовых факторов растительного происхождения.

Целью работы является разработка технологии процесса получения биомассы галобактерий *H. salinarum* на зерновых ферментолізатах с дальнейшим ее высушиванием и длительным хранением.

Задачи исследования:

1. Выбрать ферментные препараты и режимы обработки зернового сырья для получения белковых ферментолізатов, хорошо усваиваемых галобактериями;
2. Оптимизировать концентрацию компонентов питательной среды для увеличения выхода биомассы и каротиноидов на полученных композициях;
3. Оценить собственную протеолитическую активность галобактерий *H. salinarum*;
4. Провести культивирование в мембранном биореакторе на полученных гидролизатах для получения высокоплотностной культуры;
5. Оптимизировать режимы высушивания биомассы галобактерий для сохранения компонентов клеток;
6. Осуществить длительное хранение высушенной биомассы галобактерий *H. salinarum*.

Научная новизна

В качестве источника углерода для культивирования галобактерий *H. salinarum* впервые использованы ферментолізаты зерновых культур.

Получена высокоплотностная культура, выращенная на ферментолізатах зернового сырья в мембранном биореакторе.

Оптимизирован процесс распылительной сушки галобактерий *H. salinarum*.

Практическая значимость

Разработан и проверен в лабораторных и промышленных условиях режим культивирования галобактерий *H. salinarum* на гидролизатах растительного сырья.

Разработанная экспресс-методика определения каротиноидов позволяет определять содержание каротиноидов в процессе культивирования культуры.

Оптимизирован процесс распылительной сушки, и оценено длительное хранение полученной биомассы.

Получен акт внедрения результатов диссертации в производственный процесс.

На штамм бактерий *H. salinarum* 353П-1 (номер ВКПМ В-12794), используемый для получения бактериальных препаратов, получен патент № РФ 2662996.

Апробация работы

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

Публикации

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

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

Личный вклад автора состоял в анализе литературных источников, в постановке задач работы, проведении экспериментальной части и обсуждении

полученных результатов, а также в непосредственное участие в подготовке публикаций и презентации докладов на конференциях.

Соответствие паспорту научной специальности: диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» по следующим пунктам паспорта специальности:

2. Исследование и разработка требований к сырью (включая вопросы его предварительной обработки), биостимуляторам и другим элементам. Оптимизация процессов биосинтеза.

3. Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения.

4. Изучение и разработка процессов и аппаратов микробиологического синтеза, включая физико-химическую кинетику, гидродинамику, массо- и теплообмены в аппаратах для ферментации, сгущение биомассы, разделения клеточных суспензий, сушки, грануляции, экстракции, выделения, фракционирования, очистки, контроля и хранения конечных целевых продуктов. Разработка теории моделирования, оптимизации и масштабирования процессов и аппаратов микробиологического синтеза.

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

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика экстремальных галофильных микроорганизмов

Галофильные микроорганизмы (от греческого, «ἅλς» - соль, «φιλέω» - любить) обильно развиваются в специфических условиях окружающей среды, в экосистемах, концентрация соли в которых во много раз превышает концентрацию соли в мировом океане, в широком спектре озер, находящихся высоко в горах [22 – 23], в Солнечном Озере и других озерах у побережья Красного моря, Guerrero Negro на побережье нижней Калифорнии, в озере Сиваш у Черного моря и Shark Bay в Западной Австралии, а также в искусственных солнечных солевых прудах. Гиперсоленые испарительные пруды были также обнаружены в Антарктике, в пустынном районе Атакама в Чили [24 – 27].

В зависимости от требовательности к содержанию хлорида натрия галофильные микроорганизмы классифицируются как слабо, умеренно и экстремально галофильные. Слабо галофильные растут при концентрации NaCl в пределах 0,2–0,85 М; умеренные – при концентрации NaCl 0,85–3,4 М; экстремальные галофилы – при концентрации NaCl 3,4–5,2 М [25]. Однако, данная классификация является условной, поскольку концентрация хлорида натрия, необходимая для роста галофильных микроорганизмов, также зависит от температуры и pH среды. В зависимости от совокупности этих условий не исключено перемещение галофилов между группами.

Среди галофильных микроорганизмов присутствуют гетеротрофные, фототрофные и метанобразующие археи, фотосинтезирующие, литотрофные и гетеротрофных бактерии, фотосинтетические и гетеротрофные эукариоты (Рисунок 1) [25, 28].

Экстремально галофильные прокариоты развиваются в средах с концентрацией NaCl около 3,4–5,2 М и являются основными обитателями соленых вод. Наличие C₅₀-каротиноидов (α -бактериоруберина и его

производных), имеющих в мембранах данных микроорганизмов, придают этим водам характерный красный цвет [25].

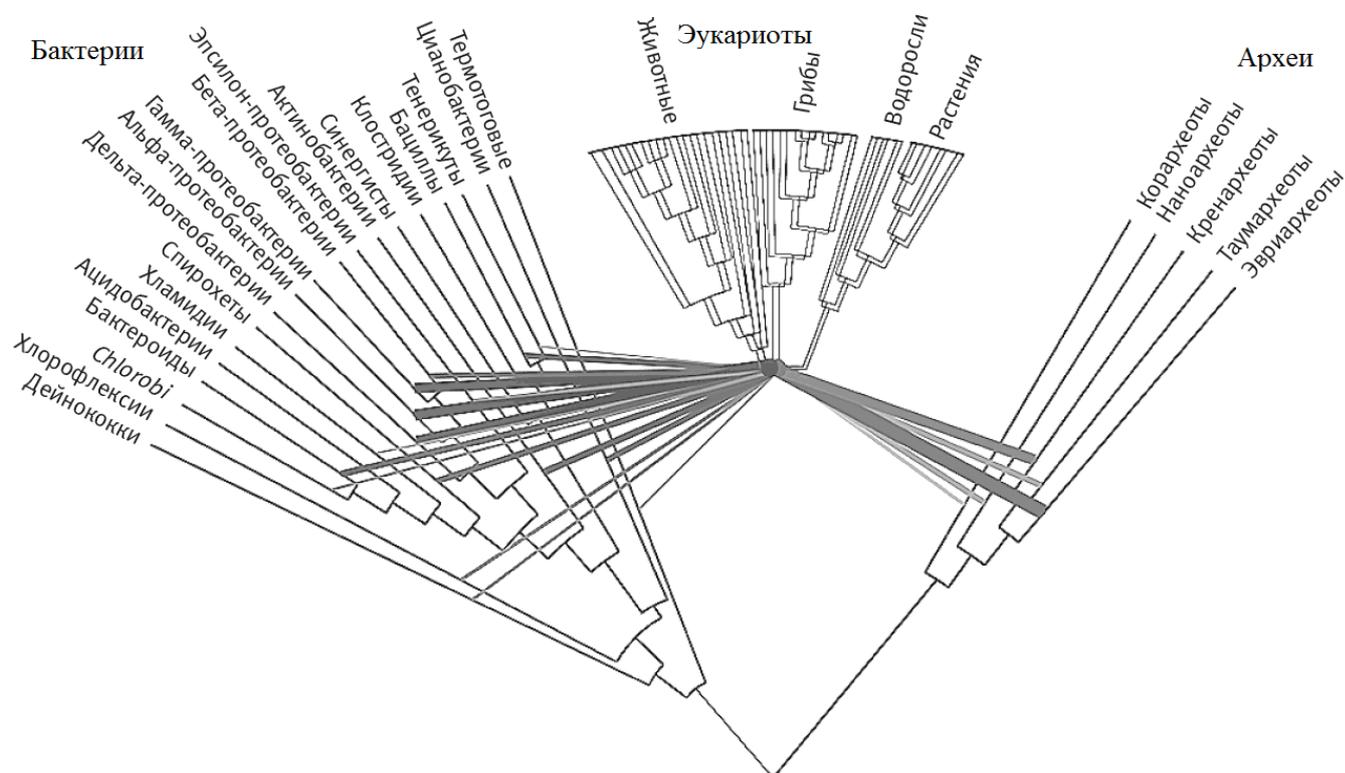


Рисунок 1. Филогенетическое дерево для генов 16S рРНК. [29]

В настоящее время среди архей выделяют 5 типов, но галофильные микроорганизмы встречаются только в ветви Эвриархеот (*Euryarchaeota*) [30].

Умеренные галофильные микроорганизмы как представители домена бактерий встречаются среди протеобактерий, цианобактерий, спирохет, актиномицетов, в то время как экстремальные галофильные бактерии, характерные представители которых род *Halorhodospira* и актиномицеты *Actinopolyspora halophila*, встречаются реже [31 – 32].

Среди грамположительных галофилов встречаются как аэробы, например, бактерии рода *Bacillus*, так и анаэробные семейства *Halanaerobiaceae* и *Halobacteroidaceae* [33 – 34]. К облигатным анаэробным гетеротрофам, преимущественно состоящим из галофилов как *Halobacteriaceae* (археи), относятся представители семейства *Halomonadaceae* [35].

К *галофильным эукариотам* относят некоторые водоросли, простейшие, лишайники и многоклеточные эукариоты.

Водоросли *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis* являются распространенными экстремально галофильными видами, в то время как большинство видов зеленых водорослей являются умеренными галофилами и выдерживают концентрацию NaCl в пределах 1-3,5 М [24]. Разнообразные виды диатомовых водорослей обнаружены в средах с концентрацией NaCl приблизительно 2 М.

Дрожжи и мицелиальные грибы, способные выдерживать высокие концентрации NaCl, например, галотолерантные дрожжи *Debaryomyces hansenii*, растут аэробно при концентрации 4,5 м NaCl [36]. Меристемный гриб *Trimmatostroma salinum* и черные дрожжи *Hortaea werneckii* способны произрастать в средах с различной соленостью, вплоть до насыщающей концентрации хлорида натрия [37].

Заслуживают внимания также большое количество беспозвоночных животных, обитающих в гиперсоленых средах: рассольная муха *Ephydra cinerea*, рассольная креветка *Artemia franciscana*, коловратка *Keratella quadrata*, плоские черви sp. *Macrostomum* [24].

1.2. Галофильные археи

Семейство (*Halobacteriaceae*) относится к классу галобактерий, типу эвриархеот (*Euryarchaeota*), принадлежащему к домену архей (*Archaea*) [38].

Термин галобактерии в русских и иностранных источниках имеет широкую интерпретацию. Название происходит из р. *Halobacterium*, представители которых относятся к археям, поэтому в каждом случае употребление термина «галобактерии» должно сопровождаться уточнением либо галофильные бактерии, либо галоархеи.

Галобактерии включают в себя более двадцати пяти родов. Наиболее известными считаются роды *Halococcus*, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Natrococcus*, *Natrobacterium*. В основном галофилы являются экстремальными микроорганизмами с растут при концентрации хлорида натрия в пределах 2,5 –

5,2 М, но также встречаются умеренные галофильные археи такие, как р. *Halobacterium* и р. *Halococcus*. Слабо галофильные представители в домене архей практически не находятся [39].

По морфологии галоархеи являются палочками, кокками или дискообразными. В зависимости от условий окружающей среды также встречаются треугольные или квадратные формы [25]. Окрашиваются галофилы грамположительно (*Halococcus*), но встречаются и грамтрицательные виды такие, как *Halobacterium salinarum*. Плавуемость некоторых микроорганизмов обусловлена наличием газовых вакуолей. Оптимальные условия роста, так же, как и ростовые факторы различны для штаммов галобактерий. Разновидность по типу питания определено условиями среды, галофилы могут быть и фотоорганогетеротрофами, и хемоорганогетеротрофами. Так факультативные анаэробы *Halobacterium salinarum*, обладающие пурпурными мембранами и красно-оранжевыми каротиноидами, потребляют аминокислоты и растут при повышенных температурах (38-45 °С). Галоархеи такие, как *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax volcanii*, *Halorubrum lacusprofundi* используют для роста углеводы [38]. Некоторые галоархеи способны расти, используя единственный источник углерода (сахар, глицерин, ацетат) [41].

Большинство галоархей являются факультативными аэробами, использующие в качестве источника углерода amino- и органические кислоты. Некоторые виды потребляют полисахариды, углеводы и глицерин [30]. Многие галобактерии под влиянием внешних условий (высокая соленость и низкое содержание растворенного кислорода) способны к анаэробному росту путем ферментации аргинина или используя диметилсульфоксид, триметиламин, фумарат, окись азота, нитрат в качестве конечных источников электронов [30, 42 – 43].

Одним из широко распространенных видов галоархей являются *Halobacterium* sp. NRC-1, относящиеся к факультативным аэробным гетеротрофам и с оптимумами температуры 42 °С, концентрации NaCl 4,3 М. Они способны утилизировать аргинин, расти в анаэробных условиях и фототрофным способом, в

течение короткого периода времени, посредством использования бактериородопсина [44], но не способны использовать сахар и синтезируют малое разнообразие аминокислот.

Оптимумы по температуре для галоархей различны, для видов выделенных в Антарктике пределах 22 °С, до 55-60 °С для *Halorhabdus tiamatea* из Красного моря; диапазон pH варьирует от 9,5-10 для *Natronococcus occultus*, до 4-6 для *Halarchaeum acidiphilum* [25, 45].

1.3. Экстремальные галофильные микроорганизмы – уникальные природные источники биологически активных веществ

1.3.1. Каротиноиды галоархей и других экстремально галофильных микроорганизмов

Характерная пигментация галофильных микроорганизмов зависит от присутствия в клетках каротиноидов, необходимых для стимуляции активной системы фоторепарации для восстановления димеров тимина, выполняющих защитную функцию от воздействия солнечной радиации [46, 47].

Каротиноиды классифицируются по химическому строению на две группы: каротины, которые состоят из углерода и кислорода, и насыщенные кислородом ксантофиллы, которые могут содержать различные функциональные группы: эпоксидную, карбонильную, гидроксильную, метокси- или карбоксильную [48]. К каротинам относятся ликопин и β-каротин, к ксантофиллам – лютеин, кантаксантин, зеаксантин, виолаксантин, капсорубин и астаксантин (Рисунок 2).

Каротиноиды имеют сопряженные двойные связи и циклические концевые группы, что позволяет им образовывать множество стереоизомеров с разными химическими и физическими свойствами [50].

Также каротиноиды подразделяются по содержанию витамина А:

- неокрашенные предшественники витамина А (β-каротин)
- пигменты, обладающие частичной активностью витамина А (криптоксантин, этиловый эфир β-апо-8'-каротиновой кислоты)

- не являющиеся предшественниками витамина А, бедно окрашены или неокрашенные (виолаксантин и неоксантин)
- окрашенные непредшественники витамина А (лютеин, зеаксантин и кантаксантин) [51].

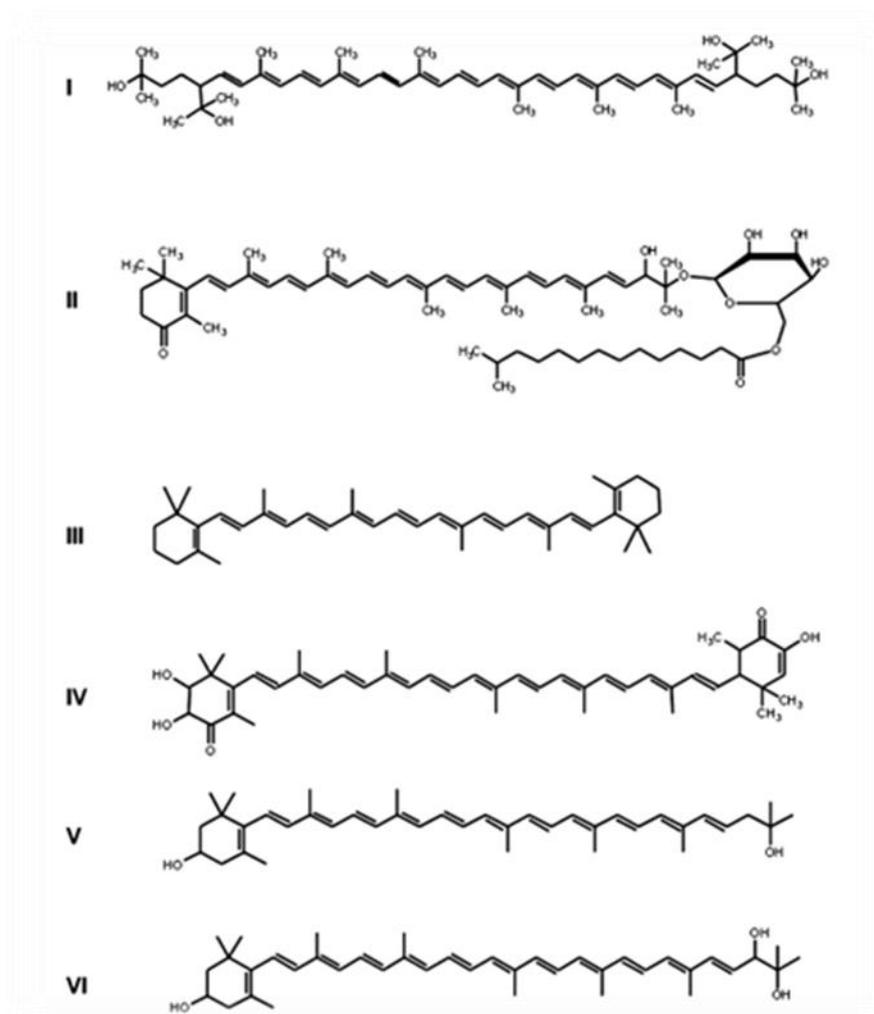


Рисунок 2. Структура каротиноидов, обнаруженных у галофилов: (I) α -бактериоруберин; (II) салиниксантин; (III) β -каротин; (IV) 2-гидроксиастаксантин; (V) сапроксантин; (VI) миксол. [49]

В биотехнологии и медицине применяют астаксантин, β -каротин, кантаксантин, β -криптоксантин, фукоксантин, ликопин, лютеин, зеаксантин и виолаксантин [49].

Основная масса каротиноидов – это бактериоруберин и его производные: моноангидробактериоруберин, бисангидробактериоруберин и тетрагидробисангидробактериоруберин [52 – 54]. Бактериоруберин интегрирован

в структуру родопсинового комплекса, выполняющего работу протонной помпы. Кристаллографические исследования показали, что роль бактериоруберина в составе комплекса – сшивка зазоров между субъединицами тримерной структуры археродопсина, что помогает поддерживать необходимую структуру комплексного соединения [55]. Также, бактериоруберин находится в структуре галородопсина – ретинального белка, локализованного в клеточной мембране галофилов, не имеющих бактериородопсин. Действует галородопсин как светозависимый хлоридный насос [42, 56 – 57].

Наличие в молекуле бактериоруберина 13 сопряженных двойных связей способствует эффективному устранению гидроксильных радикалов, в отличие от β -каротина, содержащего 11 сопряженных двойных связей. Таким образом, антиоксидантное действие бактериоруберина благодаря высокой концентрации двойных связей сопряженного характера в составе молекулы, имеет высокую антиоксидантную активность [58].

Клетки галоархей содержат в небольших количествах β -каротин, что определяется синтезом ретиналя путем оксидативного расщепления β -каротина. β -каротин, содержащийся в клетках галофилов, является мощным антиоксидантом, обеспечивает защиту мембран от повреждений, усиливает регенерацию многослойного эпителия [59].

Механизмы действия каротиноидов как антиоксидантов, определяются как фотозащитные агенты от пагубного воздействия света и кислорода или как соединения, которые реагируют с химическими радикалами, образующимися в клетках, и способны устранить последствия нежелательных окислительных процессов. В реакциях с атомарным кислородом данный механизм протекает через физическую блокировку или путем реакции с рядом свободных радикалов. При физическом взаимодействии каротиноиды не теряют свою структуру – блокировка $^1\text{O}_2$ ведет преимущественно к выделению энергии диссипации в виде тепла, тогда, как реакция между каротиноидами и свободными радикалами приводит к транспорту электронов или к следующей радикальной реакции.

Кислородные радикалы образуются в клетках в результате метаболических процессов или посредством воздействия ксенобиотиков, разрывающих цепи ДНК, окисляющих липиды в перекисные соединения, изменяющих ферментативную активность, деполимеризующих полисахариды и тем самым убивающих клетки. Доказано, что каротиноиды блокируют данные радикалы, предотвращая дальнейшие повреждения ядра и клетки.

Свободные радикалы, являясь побочными продуктами метаболизма и возникающие из загрязнений внешней среды, способны наносить вред структуре и функциям клеточных мембран, нуклеиновых кислот и участкам электронного связывания в белках. Особо опасными считаются пероксидные радикалы, являющиеся одной из причин болезней сердца, рака и преждевременного старения. Данные радикалы также могут быть блокированы каротиноидами, в результате чего происходит перенос электронов или возможная дополнительная реакция. [60]

Устойчивость к высоким концентрациям NaCl обусловлена наличием развитой системы активного транспорта, поддерживающего концентрацию ионов Na^+ на низком уровне, в то время как на клеточной мембране их концентрация значительна [61].

Галофильные археи не способны вырабатывать осмопротекторы в отличие от большинства галофилов. Таким образом, для выживания в экстремальные условия археи закачивают ионы калия в цитоплазму в концентрации выше, чем внешняя концентрация ионов натрия, что позволяет сохранить положительный водный баланс клетки и препятствует обезвоживанию при высоком осмотическом давлении и большой ионной силе окружающей среды.

Важным отличительным признаком галобактерий является строение их мембраны, представленной фосфолипидами, которые в свою очередь представлены изопраниловыми эфирами глицерина и синтезируются через конденсацию глицерина с изопреноидными спиртами с числом углеродных атомов 20, 25 или 40, образуя липидный бислой [62]. В состав клеточной стенки галобактерий входят белки и гликопротеины, но в отличие от бактерий функции

пептидогликана у архей выполняет псевдомуреин, что способствует резистентности к пенициллину и другим антибиотикам, подавляющим синтез пептидогликана.

В пурпурной мембране галобактерий присутствует один из наиболее изученных компонентов – бактериородопсин – ретиналь-содержащий белок. Этот белок синтезируется при низком парциальном давлении и высокой световой интенсивностью и может покрыть больше чем 50% поверхности клеток (Рисунок 3).

Бактериородопсин действует как свето-зависимый трансмембранный протонный насос, что позволяет управлять синтезом аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и поддерживать период фототрофного роста [6, 63].

Трансмембранная часть бактериородопсина состоит из 7 регулярных α -спиралей, пронизывающих мембрану. Находящиеся на α -спиралях гидрофобные группы обращены наружу к липидам мембраны, в то время как полярные группы обращены внутрь канала, по которому идет протон. Проводимость протона осуществляется с помощью ретиналя, перекрывающего центральный канал бактериородопсина. После поглощения фотон ретиналь, изгибаясь, переходит из полностью-транс- в 13-цис-форму, перенося протон с одного конца семиспирального пучка на другой. Далее ретиналь возвращается в исходное положение, но уже без протона (Рисунок 4) [64].

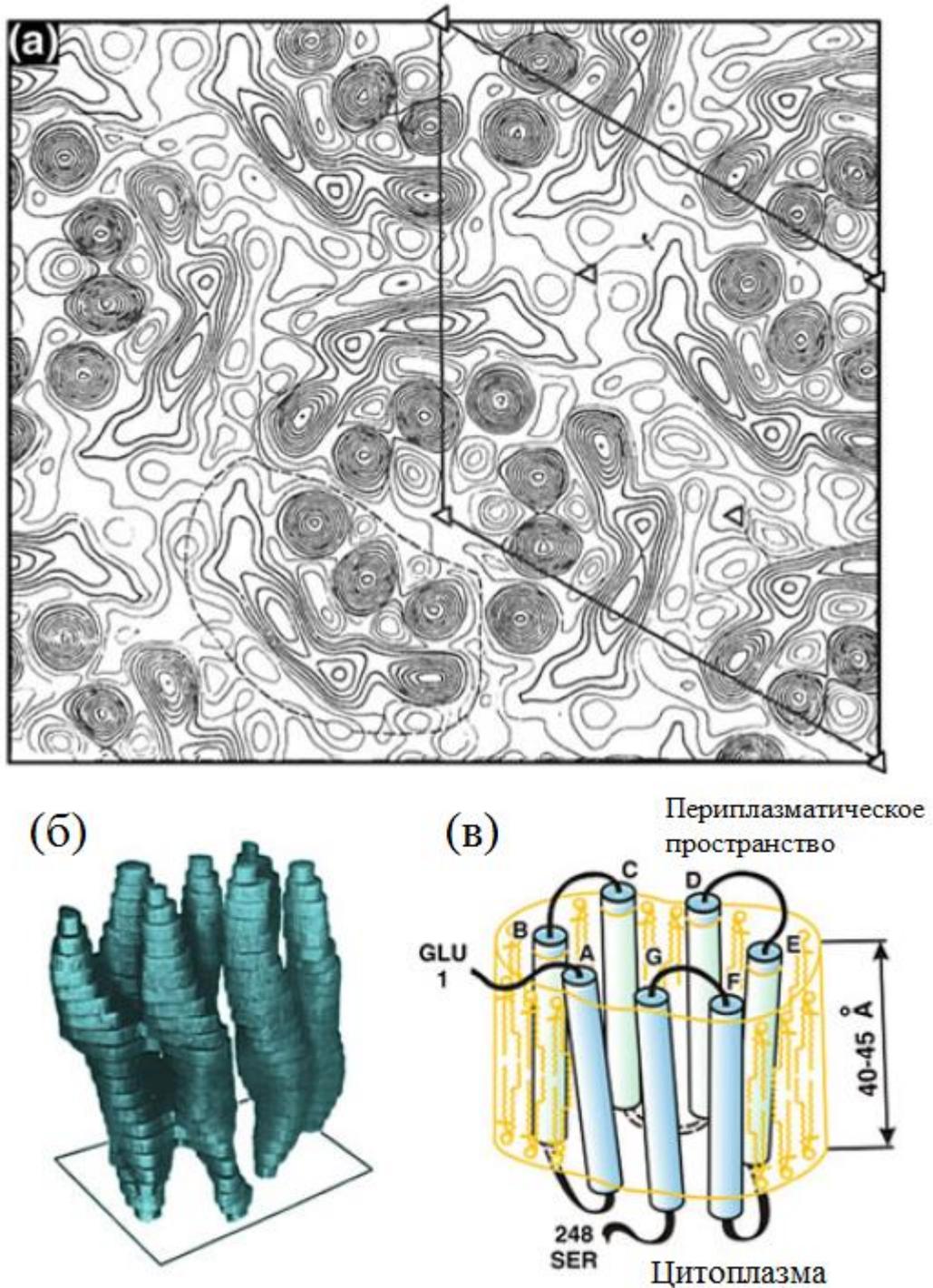


Рисунок 3. Пространственное расположение бактериородопсина. Карта плотности рассеяния электронов фиолетовой мембраны (проекция на плоскость мембраны); одиночная молекула бактериородопсина очерчена пунктирной линией, ячейка двумерного кристалла прямой линией; б – вид модели одиночной молекулы бактериородопсина на основе карт плотности рассеяния электронов; в – схема, иллюстрирующая положение семи α -спиральных сегментов в молекуле бактериородопсина [65, 66].

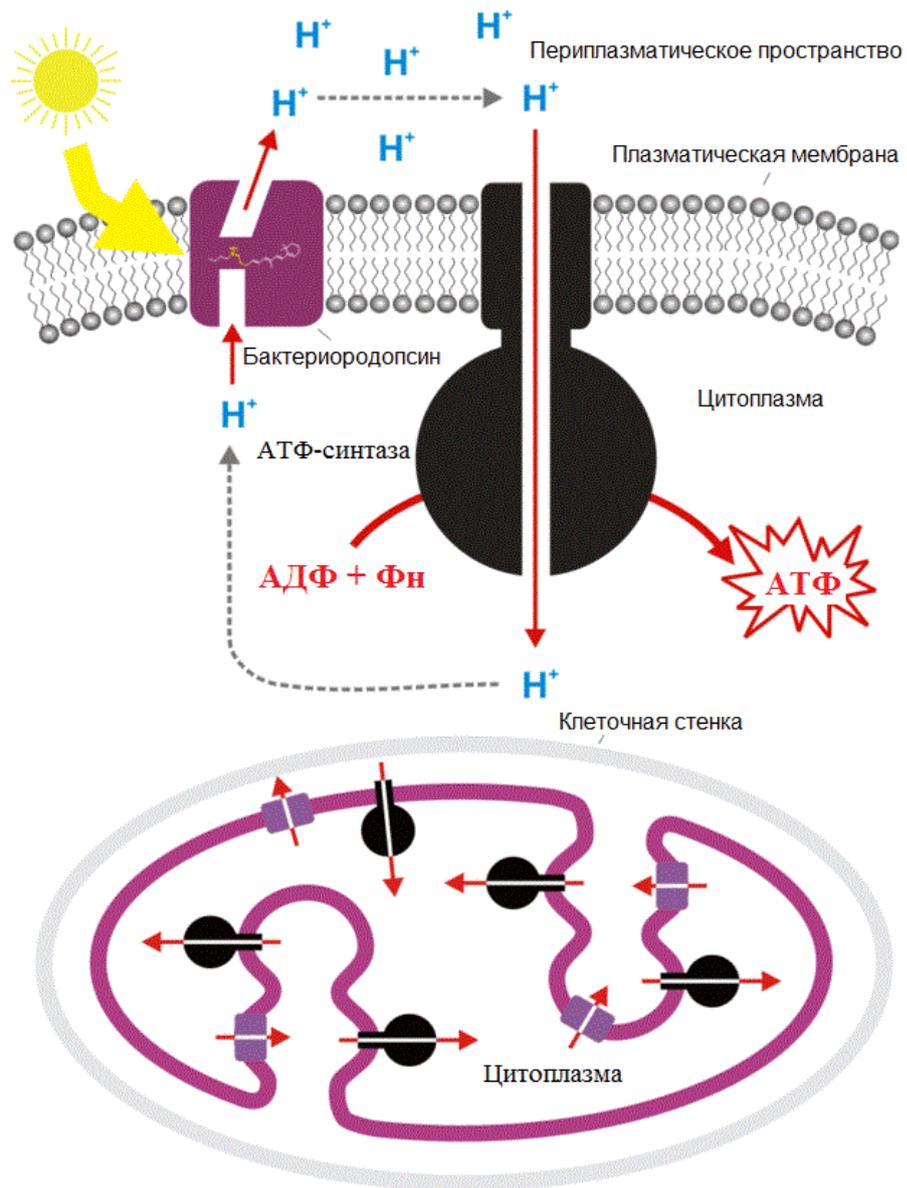


Рисунок 4. Схема работы бактериородопсиновой протонной помпы [67].

Подобные фотосенсорные рецепторы и светозависимые насосы были обнаружены в широком спектре микроорганизмов [65].

В клетках галобактерий также обнаружены два сенсорных родопсина. Они обеспечивают положительный и отрицательный фототаксис. Данные белки, как детекторные молекулы, способны считывать различные длины волн, что вызывает каскад сигналов, управляющих жгутиковым двигателем бактерии, тем самым обеспечивая микроорганизмам самостоятельное перемещение в свет подходящего спектра [68].

1.3.2. Биологически активные вещества галобактерий

Во многих биотехнологических технологиях используются ферменты, выдерживающих жесткие промышленные условия. Использование ферментов экстремальных галофильных микроорганизмов – экстремозимов (*extremozymes*) – в данном случае является перспективным, так как эти ферменты стабильны и активны в экстремальных условиях [69].

Каждая группа экстремофилов имеет уникальные особенности, а их ферменты адаптированы к особым экстремальным условиям согласно их экологической ниши, что открывает широкие возможности их применения [70]. Естественная среда обитания галофильных микроорганизмов отличается общностью экстремальных условий, таких как чрезвычайно высокая ионная прочность, вплоть до насыщенной солью воды, повышенная температура (49-58 °С) и высокие уровни ультрафиолетовой радиации [71]. Таким образом, ферменты галофильных микроорганизмов представляют особый интерес и являются потенциально значимыми для использования в биотехнологических производствах [72].

Активность ферментов сохраняется благодаря преобладанию отрицательно заряженных остатков на поверхностях белка, которые подвергаются воздействию растворителя. Молекулы воды притягиваются отрицательными зарядами, что способствует удержанию гидратированных белков от осаждения. Между отрицательными боковыми цепями и молекулами воды образуются водородные связи, приводящие к образованию стабильной гидратной оболочки [73]. Увеличение отрицательных зарядов также приводит к увеличению сетей ионных пар в галофильных ферментах [74]. Другими свойствами ферментов галофильных микроорганизмов являются уменьшение гидрофобных поверхностей и необычно большое количество упорядоченных боковых цепей [75].

Благодаря необычному составу белков галофильные ферменты активны при низком уровне активности воды и способны функционировать в органических растворителях [76]. Согласно литературным данным, каталаза *Halobacterium salinarum* переносит водные растворы этиленгликоля, глицерина и

диметилсульфоксида (ДМСО) (до 2, 4,5 и 2– 5 М соответственно) без NaCl или других солей [77]. В работе [78] отмечено, что культуры *Haloarcula*, *Hal. vallismortis* и *Hal. argentinensis* могут расти в присутствии ндекана, н-нонана и гексилового эфира, в присутствии 17% NaCl, а также может расти в изооктане и циклооктане с 25–27% NaCl в среде (кроме штамма *Hal. argentinensis*) [78].

Гликозилгидролазы – большая группа ферментов, основанная на углеводном метаболизме, и включающая, среди прочего, амилазы, пуллулаказы, декстраназы, гиалуронидазы, ксилозидазы и целлюлазы [79, 80].

- Амилазы

Амилазы в настоящее время наиболее важны в пищевой (на первом этапе производства кукурузного сиропа с высоким содержанием фруктозы) и моющей промышленности, в основном для разложения крахмала. В настоящее время амилазы охарактеризованы для многих галофильных штаммов от умеренных (*Halomonas meridiana*) до экстремальных (*Hal. Hispanica* и *Natronococcus amylolyticus* галофилов [81].

В 1969 году была впервые отмечена активность данного фермента у *sp. Halobacterium*, при этом стабильность амилазы наблюдалась в течение 6 дней в 5% NaCl при 25 °C, 15% NaCl при 40 °C; и 25% NaCl при 55 °C, при 70 °C активность терялась. Позже этими же учеными были определены оптимальные параметры активности амилазы *Halobacterium salinarum*: 0,05% NaCl в 0,01 М-глицерофосфатном буфере, pH 7 и при 55 °C, при этом крахмал был гидролизован до мальтотриозы, мальтозы и глюкозы [82].

Natronococcus sp. выделяет амилазу, приводящую к образованию мальтотриозы из крахмала [83]. Для культуры *Hfx. mediterranei*, выделяющей амилазу при выращивании на ацетате аммония в качестве источников углерода и азота, были обнаружены три внутриклеточные амилазы AMY 1, AMY2 и AMY3, при этом AMY2 был обнаружен как внутриклеточно, так и внеклеточно, и ни один из них не был получен в отсутствие крахмала, что указывает на то, что они не являются конститутивно экспрессируемыми ферментами [84].

За счет способности галобактерий функционировать в органических гидрофобных растворителях, было определено, что активность и стабильность амилазы *Haloarcula sp.* штамм S-1 сохранялась в бензоле, толуоле и хлороформе при содержании NaCl менее 2 М в среде [85].

- Агараза

Агараза катализирует гидролиз агара и способствует выработке неоагаросахариды, ингибирующие рост бактерий, замедляющие деградацию крахмала и обладающие противоопухолевой и антиоксидантной активностью [86]. Данный фермент необходим для освобождения ДНК и других встроенных молекул от агарозы и извлечения биологически активных или лекарственных соединений из водорослей в лабораторных и промышленных условиях. В литературе представлены сведения об очистке агаразы нескольких солеустойчивых микроорганизмов, обнаруженных в океане (*Pseudoalteromonads*, *Pseudomonas* и *Vibrio*), и был выдан патент на агаразу из микроорганизма соленого болота [87].

- β -галактозидаза

β -галактозидаза широко используется в пищевой промышленности для удаления лактозы из молочных продуктов. Из галофильных микроорганизмов было выделено две β -галактозидазы: β -галактозидаза из *Haloferox alicantei* (при 4 М NaCl в среде), и семейство из 42 β -галактозидаз, выделенное из галотолерантного антарктического изолята *Planococcus sp.*, с активностью близкой к активности фермента *E.coli lacZ* (менее 50% активности сохраняется при 4 М KCl в среде) [81].

- Ксиланазы

Ксиланазы, используемые в производстве кофе, кормов для скота, муки, в качестве отбеливателя для удаления остаточного лигнина из пульпы, и ксилозидазы найдены у *Halorhabdus utahensis*. [81] У культуры отмечено наличие сразу двух ксиланаз, что подтверждено зимограммой, которая показала присутствие одного фермента примерно при 45 кДа, а другого – примерно при 65 кДа. Ксиланазы были активны в диапазоне солей от нуля до 30% NaCl с

оптимумом при 5–15% NaCl, и 55% активности сохранялись при диализе против фосфатного буфера, дополненного 1% MgSO₄*7H₂O. Для ксилозидазы оптимальное содержание соли, pH и температуры было следующим: 5% NaCl, pH 6–7 и 65 ° C; при диализе в том же буфере сохранялось 83% исходной активности [88].

- Липазы и эстеразы

Малочисленные исследования показали, что среди галоархей распространены липазная и эстеразная активности. В работах [89, 90] путем скрининга 35 штаммов, был отобран галофил *Natronococcus sp.* с липазной активностью при 4 М NaCl и 40 ° C. Липаза оставалась стабильной при инкубации в течение 60 мин при 50 ° C; при увеличении показателей до 80 ° C и 76 мин, активность снижалась на 50%. [89, 90] Недавно из культуры *Haloarcula marismortui* была выделена эстераза, предпочитающая короткоцепочечные жирные кислоты и сложным моноэфиром, и зависящая от присутствия соли для правильного свертывания и активности [91].

Эстеразы являются либо внеклеточными, как часть общей группы липаз, либо внутриклеточными и участвуют в гидролизе различных типов карбоксильных сложноэфирных связей. В работе [92] были изучены гидролазы карбоксильных эфиров *Halobacterium sp.* NRC-1. Максимальная продуктивность фермента отмечалась после инкубации в течение 40 ч при 30–46 ° C и 3,5–5 М NaCl, данные о концентрации соли для поддержания активности не были приведены.

Эстеразы и липазы используются как биокатализаторов из-за их способности вырабатывать оптически чистые соединения, в качестве ингредиентов для моющих средств для удаления масляных пятен [81]. Однако, данные о применении галофильных эстераз и липаз в промышленности не представлены.

- Ферменты рестрикции

Галофильные эндонуклеазы рестрикции, применяемые в молекулярной биологии, были выделены из *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium cutirubrum*, *Halococcus acetoinfaciens* [81].

- Дегидрогеназы

Ферменты дегидрогеназы применимы в биосенсорах и диагностических наборах [93], в синтезе хиральных аминокислотных синтонов для фармацевтической промышленности [94], для регенерации восстановленных или окисленных кофакторов [95].

Группа ученых под руководством Munawar [96] исследовали семейство аминокислотных дегидрогеназ и оценили потенциал одной из глутамат-дегидрогеназ штамма *Halobacterium salinarum* NRC-36014. Растворимый активный рекомбинантный фермент обеспечил сверхэкспрессию в галофильном хозяине *Haloferax volcanii*. Был получен фермент со следующими свойствами: активность сохраняется до температуры 90 °С, фермент полностью стабилен до 70 °С, не теряет активности при смешивании с органическими растворителями, высокие концентрации соли могут быть заменены 30% диметилсульфоксидом (ДМСО) или бетаином. Таким образом, был получен фермент, открывающий новые перспективы в развитии белковой инженерии [96].

- Протеазы

Галофильные протеазы являются наиболее активно изучаемыми экстремозимами, широко применимыми в различных биологических и промышленных процессах [97, 98]. Протеолитическая активность с потенциальным промышленным применением была охарактеризована у *Halobacterium sp.*, *Haloferax mediteranei*, *Natrialba asiatica*, *Natrialba magadii*, *Natronococcus occultus* и *Natronomonas pharaonis* [81].

Впервые протеазы галобактерий начали изучать Norberg and Hofsten [99]. В качестве модельной культуры был взят штамм *H. salinarum*. Культуральную жидкость штамма тестировали на активность против желатина и казеина. Было отмечено, что фермент активен при содержании NaCl в среде, причем фермент

был более активным с NaCl, чем с KCl. Также было обнаружено, что у культур рода *Halococcus* отсутствует внеклеточная протеолитическая активность.

При дальнейших исследованиях российскими и зарубежными учеными были открыты сериновые протеазы галобактериальных микроорганизмов.

Протеаза *H. salinarum* штамм 353П обладала молекулярной массой 41 кДа, имела высокую специфичность в отношении азоказеина и синтетического пептида L-пироглутамил-L-аланил-L-аланил-L-лейцин-п-нитроанилида, расщепляла только одну связь в В-цепи инсулина и ингибировалась только 5% диметилформамидом (ДМФА) [100].

В работах [101, 102] отмечено, что внеклеточная протеаза *H. salinarum* максимально активна при концентрации соли 4 М NaCl, а при значениях ниже – была необратимо инактивирована.

В исследованиях бактерии *Natrialba asiatica*, обнаружено, что сериновая протеаза, названная авторами работы галолизином, имела максимальную активность азоказеина при 10% NaCl, в то время как гидролиз синтетических субстратов был максимальным при 30% NaCl [103]. Согласно [104, 105], галолизин также вырабатывают галоархеи *Hfx. mediterranei*. Максимальная активность фермента была достигнута при pH 8–8,5 при наличии NaCl для активности, при добавлении 10% ДМФА и концентрации NaCl в среде 4,5 М активность составляла 30%. Ингибирование наступало при воздействии 0,15 мМ ПМСФ (фенилметилсульфонилфторид) и 0,1 мМ диизопропил-ксорфофосфата [106].

Также были отмечены сериновые протеазы *Halogeometricum* sp., *Natrialba* sp., *Natrinema* sp., *Hfx. Genus* [107], *Natronomonas asiatica* sp. [108], *Natronococcus occultus* [109], имеющие перспективу промышленного применения.

Другие активные вещества галобактерий.

- Экзополисахариды

Биомасса галоархей обладает высокой вязкостью, что свидетельствует о наличии внеклеточных полисахаридов (ЭПС), исследованных и

охарактеризованных многими учеными. Известно, что *Hfx. mediterranei* ATCC 33500 синтезирует гетерополисахарид, состоящий в основном из маннозы [110], культура *Nab. aegyptiaca* производит поли- γ -D-глутамат, не распространенный у галоархей [111], *Hfx. mediterranei* и *Hfx. volcanii* синтезируют полигидроксидибутрат, причем на количество последнего влияет концентрация солей в среде [112].

- Полигидроксиалканоаты

Полигидроксиалканоаты (ПГА) галобактерий *Hfx. mediterranei* описаны в работах [111, 113, 114]. Было обнаружено два сополимера: одна цепь содержит 10,75 мол. % 3-гидроксивалерата, другая – 12,3 мол. % 3-гидроксивалерата (данные о влиянии внешних условий на процентное содержание веществ не приводятся); наибольший синтез ПГА отмечен при 10% NaCl. Исследуя генетику продукции ПГА, отмечено, что ключевым ферментом для этого синтеза является группа ПГА-синтетаз, сгруппированных в четыре класса в зависимости от их субстратных особенностей и белковых субъединиц [115]. Для *Hfx. Mediterranei* [116], *Nar. marismortui* [117], *Nar. hispanica* and *Hfx. volcanii* [118] необходимы ПГА-синтетазы класса III. Авторы также отметили, что ген *FagG1* был гомологом ПГА-специфической ацетоацетил-КоА-редуктазы *PhaB*, обнаруженной в бактериях в домене Бактерии. Rehm [119] описал частицы ПГА как наночастицы, полученные в результате полиэфирсинтаз, и отметил, что удлинение алканоатных цепей может происходить по механизму, аналогичному синтезу жирных кислот [119].

- Поверхностно-активные вещества

В отличие от биополимеров, поверхностно-активные вещества галоархей исследованы очень мало. В литературных данных упомянуто только три исследования синтеза биосурфактантов галобактериями [120]. В работе [121] проведен анализ пяти отдельных штаммов галоархей, снижающих поверхностное натяжение культуральной среды до уровня ниже 40 мН/м. Особенно эффективны поверхностно-активные вещества *Haloarcula* sp. штамм D21 и *Halovivax* sp. штамм A21, стабилизирующие эмульсию «дизельное топливо-вода» от pH 2 до pH

11 в присутствии 25–50% этанола и 15–35% NaCl в водной фазе. При этом разведение дистиллированной водой не влияло на эмульсию [122].

- Липосомы

Отдельного внимания заслуживают липосомы галобактерий. Липосомы *H. cutirubrum*, устойчивые к фосфолипазам, могут доставлять лекарства в различные части тела. Однако, до сих пор эти липосомы не используются в медицине [122].

Благодаря созданию обратных мицелл, авторы работы [123] поддерживали ферментативную активность щелочной п-нитрофенилфосфат-фосфатазы из *H. salinarum* в органических растворителях при 0,048–0,85 М NaCl. Поддержание активности при концентрации соли 0,5 М KCl для фермента *Hfx. mediterranei* стало возможным после сшивания в белковой матрице или иммобилизации 0,5% глутаровым альдегидом галофильной альдолазы [124].

В работе [125] предложили применение липосомы, прикрепленной к основному планшету с антителом, для определения количество присутствующего АТФ. Липосома была составлена из галобактериородопсина, интегрированного в комплекс соевого фосфолипида, фосфолипидного антигена, АТФ-азы (полученной из митохондрий) и рН-чувствительного красителя в качестве неживой системы генерирования энергии [125].

- Галоцины

Из литературных данных известно, что галобактерии продуцируют галоцины, но информации об антимикробных средствах практически нет. Причина заключается в том, что многие из очищенных галоцинов не были активны против стандартного набора бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* и *Sarcina luteus* [126].

Галоцины представляют собой пептиды. Некоторые из них являются активными протеолитическими ферментами. Согласно данным работы [127] галоархеальные палочки проявляют ингибирующую активность по отношению к другим галоархеям. Галоцин Н6 обладает антимикробными свойствами и в настоящее время является единственной известной биологической молекулой,

которая оказывает специфическое ингибирующее действие на Na^+/H^+ -обменник клеток млекопитающих [128, 129].

Наряду с галоцинами изучаются галобактериальные микрогалоцины. Исследовано, что галоцин Н6 из *Haloferax gibbonsii* и микрогалоцин S8 галоархеального штамма S8a сохраняют около 50% активности при температуре около 100 °С [130].

1.3.3. Применение биомассы и отдельных биологически активных веществ галофильных микроорганизмов.

Галофилы находят практическое применение в различных областях пищевой промышленности: молочной, хлебобулочной, масложировой, макаронной и сыроваренной [131 – 133]. В фармацевтической промышленности используются ферменты, антибиотики галобактерий и археасомы (липосомы галобактерий), являющиеся перспективными средствами доставки лекарств в организме [48].

Содержание макро- и микроэлементов, биологически активных веществ таких, как витамины, галоцины, фосфолипиды, нуклеиновые кислоты и каротиноиды, делает биомассу архебактерий *Halobacterium salinarum* незаменимым компонентом в косметологии для производства препаратов с омолаживающим эффектом [9 – 11].

В России на основе биомассы галобактерий производили пищевые добавки Баксин-визио и Бактион, а также ветеринарный препарат Баксин-вет [134]. Проведенные исследования доказали противовоспалительное и антиоксидантное действия данных препаратов. А благодаря уникальному витаминно-минеральному составу данные препараты находят широкое применение в лечении таких заболеваний, как хронические герпесвирусные инфекции, хронический респираторный хламидиоз, хронический неспецифический простатит, нарушение минерального и углеводного обмена, артрозы и артриты различного происхождения, острые и хронические дерматозы (псориаза, нейродермитов), инфекционные и простудные заболевания, при проведении химио- и радио-

терапии, как детоксицирующий агент в качестве радиопротектора, химиопротектора, как на этапах подготовки к консервативному противоопухолевому лечению, так и при развившихся осложнениях специфической терапии (купирования токсических реакций химио-лучевого лечения), обусловленных избыточным радикалообразованием [135].

Особое место занимают отдельные компоненты галофилов. Каротиноиды используются во многих областях. Наиболее применимой в объемах производства функцией на сегодняшний день считает способность каротиноидов придавать окраску, вследствие чего их применяют в животноводстве для окраски желтков и кожи птицы, окраски мяса рыбы и раковин морепродуктов [136]. В пищевой промышленности каротиноиды используются как краситель и как компоненты витаминов и различных пищевых и биологически активных добавок (астаксантин, β -каротин и кантаксантин) [137]. Потребление β -каротина в качестве витаминной добавки способствует повышению защитных сил организма против вредного воздействия радиационного облучения и образования злокачественных опухолей, артериосклероза, катаракты, возрастной макулярной дегенерации, рассеянного склероза, понижается риск возникновения сердечно-сосудистых и желудочно-кишечных заболеваний [131, 138 – 142].

В последнее время производители все чаще заменяют синтетические красители, способные вызывать аллергические реакции, на натуральные. На сегодняшний день существует несколько успешно используемых способов производства каротиноидов: *Dunaliella salina* – β -каротин [143], *Phaffia rhodozyma* – астаксантин [144], *Haematococcus pluvialis* – астаксантин [145], *Chlorella zofingiensis* – астаксантин и кантаксантин [146]. Однако, из-за сложности процесса выделения каротиноидов и возможности заражения промышленной микрофлоры не угасает интерес к красным галофильным археям, продуцирующим производные ациклического C_{50} -каротиноида бактериоруберина и кетокаротиноиды, такие, как 3-гидроксиэхиненон или транс-астаксантин и кантаксантин [146 – 148]. Способность архей расти в нестерильных условиях и возможность выделения каротиноидов без применения механического

воздействия представляют особый интерес в качестве альтернативного источника каротиноидов в производстве [149].

Особо выделяется компонент клеточной стенки галофилов – ретиналь-содержащий комплекс – бактериородопсин. Его применение возможно в конструкциях молекулярных электронных устройств, в голографических пленках и оптических компьютерах. Благодаря высокой стабильности данный белок может быть использован в биомолекулярной электронике для создания фоторецепторов с микроэлектродом из SnO_2 для применения в искусственных энерго- и фотопреобразующих мембранах и нанопленках [150 – 152].

Технические устройства на основе бактериородопсина имеют ряд преимуществ перед полупроводниковыми: увеличение объемной записи информации, функционирование системы в широком диапазоне температур, естественная защита технических устройств от мощных источников радиоизлучения различной природы, не требуют таких мощных систем защиты, что позволяет значительно уменьшить габариты и массу компьютеров, и имеет большое значение для космических технологий [153 – 155].

Для защиты денежных знаков и государственных документов от подделки рационально использовать бактериородопсин содержащие краски, которые изменяют цвет в зависимости от условий освещения. Цикличность молекул бактериородопсина во много раз превышает показатели цикличности и квантового выхода фотохромных органических соединений, используемых в настоящее время.

Ретинальпротеины галофильных биомолекул используются для различных применений: в биокомпьютинге (искусственный интеллект), в качестве светочувствительного неврологического зонда, для лечения «куриной слепоты» [156 – 158].

Также научный и коммерческий интерес представляют ферменты галофилов, функционирующие в средах с низкой водной активностью и имеющие в преимуществе отрицательно заряженные остатки на поверхности реакционных белков, притягивающие молекулы воды, что способствует сохранению белка и

предотвращению его осаждение. В литературных источниках сообщается, что галофильные ферменты, функционирующие в данных условиях, достигают значительных уровней активности в органических средах, что делает их потенциально идеальными биокатализаторами в органических растворах [77].

Широкое применение находят протеазы галофилов в производстве моющих средств, пищевой и кожной промышленности, соевых продуктов и аспартама.

Гликозидазы галобактерий применяют для деградации целлюлозы, агара, агарозы, лактозы, амилозы. Галобактерии *Halorhabdus utahensis* синтезируют такие ферменты, как ксиланаза и ксилозидаза, необходимые для полного разложение ксилана, основного компонента гемицеллюлозы. Ксиланазы применяют при производстве кофе, корма для скота, муки [159], в качестве отбеливателя, удаляющего остатки лигнина из целлюлозной массы [160].

В лабораторных и промышленных условиях используют агаразы для извлечения ДНК из агарозы и биологически активных соединений из водорослей. В результате данных реакций образуются неоагаросахариды, ингибирующие рост культуры, замедляющие разложение крахмала и оказывающие антиоксидантную активность [86].

В молочной промышленности для удаления остатков лактозы используются β -галактозидазы, обнаруженные у галобактерий *Haloferax alicantei* [161].

Амилазы, продуцируемые многими галофилами, например, *Halomonas meridian*, *Haloarcula hispanica*, *Natronococcus amylolyticus*, отвечают за гидролиз крахмала и применимы при производстве глюкозно-фруктозного кукурузного сиропа, в текстильной промышленности [162].

Фермент HsaI, получаемый из *Halobacterium salinarum*, который обладает эндонуклеазной активностью, производится в промышленном масштабе [163].

Из *Haloarcula marismortui* выделяют эстеразы, используемые как биокатализаторы и добавляемые в стиральные порошки для удаления жирных пятен [81].

Также некоторые штаммы галобактерий в условиях высокой солености обладают целлюлолитической активностью [164 – 165].

Галофильные археи синтезируют огромное количество полигидроксиалканоатов (ПГА) – полиэфиров, которые микробные клетки нередко как запас углерода. ПГА обладают биоразлагаемыми, биосовместимыми и водопрочными свойствами, с чем связан интерес данных соединений для производства хирургических нитей, протезов, в качестве компонентов для доставки лекарственных средств и, возможно, биоразлагаемого пластика [166].

Галобактерии вырабатывают биосурфактанты, которые могут применяться в производстве терапевтических антимикробных агентов, сельскохозяйственных противомикробных препаратов, средств личной гигиены, для применения в пищевой, горнодобывающей промышленности, при добыче нефти, а также для очистки нефтяных резервуаров [167].

Экологически значимым становится применение галофил в биоремедиации для очистки загрязненных стоков от соли, выделяемой промышленными процессами [168]. Проблему очистки от ароматических и алифатических углеводородов возможно решить при использовании галобактерий р. *Haloferax* и р. *Halorubrum*, использующие бензойную кислоту и другие ароматические субстраты как единственные источники углерода и энергии [169 – 170]. Штамм *Haloferax mediterranei* в качестве источника азота для роста способен употреблять нитраты и нитриты, содержащиеся в средах [171]. Также галофилы находят применение в разработке устойчивых биоэнергетических технологий для решения проблем, связанных с нехваткой нефти и глобальным потеплением [25].

1.4. Культивирование галоархей

1.4.1. Варианты культивирования галоархей

При множестве схожих вариантов выживания в экстремальных условиях, археи имеют различия в метаболизме. Галофилы чувствительны даже к незначительным изменениям соотношений компонентов в питательной среде. В зависимости от получаемого продукта их выращивают на средах, разнообразных по составу. Обязательными составляющими ростовых сред являются хлорид натрия в высокой концентрации и источник углерода, представляющий собой

набор отдельных аминокислот или гидролизатов белков микробного, растительного или животного происхождения. Однако, культивирование галобактерий характеризуется низкими темпами роста чистой культуры, время генерации для разных штаммов составляет от 1,5 часов до 2 дней, и в зависимости от предложенных сред может увеличиваться. Следует отметить, что достаточно мало исследований посвящено изучению питательных сред.

Таким образом, подбор оптимальной среды для культивирования микроорганизмов является одной из важных задач для промышленного применения.

По литературным данным известно, что галоархеи имеют полные комплексные требования по питанию. Для культивирования часто используют синтетические среды, основанные на аминокислотах [172]. Химически определенные среды содержат неорганические соли, такие как NaCl, KCl, цитрат Na, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 нуклеотида (аденозин и уридин), глицерин и комбинированный набор из 10-15 отдельных аминокислот (АК), в состав которого входят четыре незаменимые АК, в основном это валин, метионин, лейцин и изолейцин, используемые в процессах биосинтеза, в то время как другие АК являются стимуляторами роста [173, 174]. Однако, в ряде научных работ используют среды с различным аминокислотным составом. Скорее всего, это связано с тем, что в задачи исследований не входило изучение состава питательной среды. Так, в некоторых статьях значимым представлен набор из следующих АК: D,L-аланин, D,L-гистидин, L-глутаминовая кислота, D,L-изолейцин, D,L-метионин, D,L-треонин и L-тирозин, D,L-фенилаланин, L-цистеин, в то время как остальные являются стимуляторами роста [175]. В статье [53] отмечено, что исключение из среды таких аминокислот, как аргинин, валин, лейцин или лизин сильно замедляет рост культуры, при отсутствии глицерина и метионина резко снижается уровень каротиноидов, а добавление нуклеиновых компонентов целесообразно при отсутствии источников фосфатов [176]. Концентрации аминокислот в питательных средах также отличаются в статьях разных авторов.

Большинство исследований проведено на средах, в состав которых входят протеиновые вытяжки и высокие содержания хлорида натрия. Выход биомассы при культивировании на таких средах значительно выше, чем на средах, содержащих триптон и дрожжевой экстракт. Однако, фактор наличия в пептоне солей желчных кислот, угнетающих рост культуры, является основным при предпочтении использования в качестве субстратов для роста галобактерий триптона и дрожжевого экстракта [4].

Использование менее дорогих гидролизатов неконтролируемого состава экономически выгодно, однако существует возможность невоспроизводимости результатов из-за особенностей в технологии производства препаратов.

Требования по питательным веществам у галоархей также различны. Если некоторые микроорганизмы способны расти на достаточно простых средах, то для *H. salinarum* необходимы комплексные субстраты для нормального развития.

При культивировании галобактерий важным являются концентрации солей и глицерина. Хлорид натрия в среде обеспечивает стабильность структуры клеток галобактерий, поддерживает осмотическое давление, обеспечивает активный транспорт калия в клетки. Оптимальная концентрация хлорида натрия составляет 250 г/л. По литературным данным известно, что при снижении концентрации NaCl в среде происходит снижение активности роста культуры, а при достижении значения ниже 15% – разрыв клеточной оболочки. Так в работе [177] отмечается, что изменение концентрации хлорида натрия в среде влияет на изменение уровня накопления биомассы и формы клеток галобактерий. Замещение ионов натрия на ионы других металлов возможно только частично, ионы хлора также могут быть заменены лишь частично бромидами, сульфатами или нитратами [178].

Ионы калия являются практически незаменимыми при культивировании галобактерий. Основная концентрация калия находится в клетках микроорганизмов и обеспечивает работу K-Na насоса. Для работы K-Na насос потребляет энергию, поступающую через АТФ при окислении источника углерода, или световую энергию при недостатке кислорода за счет работы бактериородопсина. При увеличении концентрации калия затраты на кислород и

источник углерода на образование биомассы культуры снижаются, при уменьшении – возрастают за счет увеличения нагрузки на работу К-На насоса. При отсутствии ионов калия в среде клетки галобактерий не растут [179].

Источником органического фосфора в комплексных средах являются нуклеотидные остатки. В синтетических средах неорганический фосфор представлен солями ортофосфорной кислоты. Выбор химического состава фосфора не влияет на выход биомассы. При одновременном использовании органического и неорганического фосфора потребление последнего предпочтительнее [180].

Ионы магния влияют на морфологию клеток. Если концентрация магния в среде опускается ниже 0,01 М, палочки трансформируются в коки. Оптимальная концентрация в пределах 0,1-0,5 М, при концентрации 0,001 М, рост культуры не выявлен [179].

Ионы микроэлементов Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} и др. являются необходимыми компонентами среды, и оказывают стимулирующее действие на рост клеток *H. salinarum* [173, 181]. Также стимулируют рост культуры витамины, добавленные в среду на ранних стадиях культивирования, и глицерин.

В то время как *Haloferax mediterranei*, *Haloarcula marismortui* и *Halococcus saccharolyticus*, способны утилизировать гексозы (глюкозу, фруктозу), пентозы (арабинозу, ксилозу), сахарозу и лактозу [182 – 184]. Отсутствие в клетках ферментных систем, необходимых для расщепления углеводов, не позволяет *H. salinarum* потреблять сахара [182]. Таким образом, в качестве источника углерода при культивировании данных галобактерий используют белки и аминокислоты [173].

Также некоторые галобактерии способны метаболизировать алифатические углеводороды, ароматические соединения, уксусную кислоту, однако последняя потребляется в малых количествах [32]. Из-за недостатка нитрификаторов и высоких значениях рН галобактерии рода *Haloferax* способны усваивать соли аммония и нитраты, содержащиеся в малых количествах в среде обитания.

В литературе имеются данные о выращивании галобактерий на пептон-содержащих средах с добавлением крахмала (возможно, с целью связывания токсичных желчных солей) и желатина [5]. В работе [7] в среду добавляли кукурузный порошок, в объеме, превышающем в 5 раз объем мясного экстракта. Причем прирост биомассы был значительным. Возможно, что данные компоненты сорбировали ингибиторы роста культуры и вырабатываемые галобактериями метаболиты.

Также для удаления метаболитов при глубинном культивировании в среду добавляли активированный уголь, инкапсулированный в агар для предотвращения разрушения, и Hypersol-Macronet MN-500 (Purolite) адсорбент-катионообменную смолу [185].

Для производства ПГА из *Hfx. mediterannei* штамм ATCC 33500 в среду добавляли экструдированные рисовые отруби и экструдированный кукурузный крахмалой при этом выход продукта составлял 77,8 г среды ПГА / л. В качестве источника углерода также использовали сыворотку, при этом полученные ПГА обладали следующими свойствами: низкая температура плавления и высокая молекулярная масса при довольно недорогой последующей обработке [186, 187].

В работе [188] в качестве альтернативы дорогим компонентам питательной среды для производства протеаз из галоалкилифильных архей были предложены куриные перья.

При использовании оптимизированных композиций сред, главным образом нацеленных на повышение выхода целевых продуктов (специфических ферментов и БР), и контролируемого культивирования в непрерывном режиме или через полые волокна, выходные показатели биомассы культуры достаточно высоки. Однако, при культивировании галобактерии морфологически и физиологически нестабильны, чувствительны к малейшим изменениям условий и подвержены частым спонтанным мутациям, что затрудняет производство и делает его дорогостоящим, и, как следствие, сдерживает практическое внедрение.

Таким образом, возрастает необходимость в существенном удешевлении среды при получении биомассы галобактерий. Этому способствует внедрение и

оптимизация сред с экономически выгодными субстратами, содержащими в нативном состоянии высокомолекулярные углеводы, белки, микроэлементы и ростовые факторы. Такими субстратами могут быть гидролизаты зерновых культур и отходов зернового производства, обработанные ферментными препаратами для увеличения доступности питательных компонентов.

1.4.2. Гидролизаты зерновых как перспективные источники компонентов для питательных сред галоархей

По литературным данным известно, что на зерновом сырье основано промышленное получения пробиотических композиций на основе лактобактерий, бифидобактерий, микробной биомассы, обогащенной белком, витаминами и микроэлементами [15 – 18]. Среды с гидролизатами зерновых культур, предварительно прошедшие процесс тепловой, температурной и ферментной предобработки, применимы для культивирования углеводпотребляющих галобактерий *Haloferax mediterrane* [189].

Использование растительных источников питания для выращивания *Halobacterium salinarum*, имеет несомненное преимущество, в особенности для производства биомассы галобактерий в кормовых целях и качестве продукта функционального питания. Как было сказано ранее, *Halobacterium salinarum* не способны усваивать углеводы, но последние могут выступать в качестве связующего звена для ингибиторов роста галобактерий. А оставшиеся в среде после культивирования углеводы с различной степенью полимеризации, будут способствовать сохранению биомассы в процессе сушки и при хранении [190].

Получение гидролизатов растительного происхождения приведено в статьях и патентах, посвященных оптимизации процесса культивирования лактобактерий [20 – 21, 191 – 193], основные различия которых заключаются в использовании ферментных препаратов, степени гидролиза и в вариантах тепловой обработки.

В большинстве работ в качестве источника углерода описано использование зерновых культур (солод, ячмень, пшеница, рис, соевые бобы) и продуктов их

переработки [194 – 198], гидролизатов кукурузы и низкомолекулярных пептидов, полученным из отходов ее переработки [199].

Ферментативный гидролиз зерновых культур проводился протеолитическими ферментными препаратами, с получением свободных аминокислот, олигопептидов и углеводов разной степени полимеризации [200, 201].

Из семян рапса белковые гидролизаты были получены с использованием из Алкалазы 2,4 L FG и ферментного препарата Flovourzyme-1000 MG [202]. Отмечено, что для получения больших объемов гидролизатов требовались высокие концентрации ферментов.

Из рисовой муки гидролизаты получали путем последовательного использования амилолитического, ксиланазного, протеолитического ферментных препаратов [203].

Для повышения доступности компонентов проводилась предварительная тепловая обработка зерна. При этом отмечены значения различного давления и времени обработки для разных видов круп, а также различное соотношение растворителя (дистиллированной воды) и сухой массы зерновых культур.

Из зерна пшеницы белковые компоненты получали при использовании ферментного препарата Протосубтилин ГЗХ в течение 22 часов при температуре 45 – 55 °С, рН 6,5 – 7,5, соотношение дистиллированной воды к зерну составляло 1:2. В качестве предварительной обработки зерно измельчалось до фракции мучного помола [204].

Гидролиз зерна тритикале [205] проводился в течение 9 – 12 часов при 40 – 50 °С при замачивании в растворе, содержащем лимонную кислоту, цитрат натрия, ферментный препарат Целловиридин Г20х и комплексный ферментный препарат на основе фитазы F-4,2 В FD-UF. Полученный гидролизат с влажностью 40 – 43 % просушивали до влажности 11 – 14 % и измельчали.

Кукурузная крупа обрабатывалась щелочной протеазой [206], разделение полученных полипептидов проводили мембранной фильтрацией.

Однако, для культивирования галобактерий дополнительная очистка может приводить к вымыванию ростовых факторов и микроэлементов, от которых зависит собственная протеолитическая активность культуры.

Таким образом, анализ литературы показывает, что в соответствии с целью использование гидролизатов растительного сырья для культивирования галофильных архей, обладающих уникальными свойствами, может способствовать удешевлению производства в различных сферах.

1.5. Сохранение биомассы экстремальных галофильных архей

Нативные клетки получаемых препаратов микроорганизмов обладают сравнительно недолгим сроком хранения. В связи с этим в биотехнологическом производстве можно использовать такие методы сохранения получаемого препарата, [207] как:

- хранение при пониженных температурах,
- хранение при повышенных температурах с применением химических соединений консервантов,
- хранение путем высушивания.

Высушивание является наиболее востребованным методом сохранения получаемой биомассы, так как данный метод позволяет сохранять жизнеспособность клеток, а процесс обезвоживания сырья приводит к уменьшению массы продукта и уменьшению затрат на транспортировку.

Массовое производство препаратов на основе галобактерий, сталкивается с проблемой высушивания биомассы с целью длительного сохранения компонентов клетки в нативном состоянии. Описаны способы сохранения клеток галобактерий путем глубокого замораживания с добавлением стабилизаторов (глицерин, ДМСО), или использовании лиофильной сушки. При этом отмечено, что замораживание отрицательно влияет на выживаемость клеток. Применение метода распылительной сушки может быть альтернативным, ввиду природной особенности этих микроорганизмов длительное время сохранять

жизнеспособность клетки при высушивании и включении в кристаллы соли [208, 209].

Применяемые методы искусственного высушивания получаемых продуктов различны: сублимационный (лиофильная сушка), конвективный (распылительная сушка), контактный, терморadiационный, высокочастотными токами, комбинированный. Первые три метода наиболее часто применимы в биотехнологической промышленности [210].

На выбор метода сушки влияют: длительность процесса высушивания, скорость испарения влаги, скорости нагрева и охлаждения и физико-химические свойства высушиваемого материала, а также качество и свойства конечного продукта.

1.5.1. Методы высушивания биомассы микроорганизмов

Лиофильное высушивание, основанное на замораживании исходного материала, дальнейшего удаления кристаллизованной влаги путем фазового перехода «твердое – пар» и досушивания, применяется в технологиях для высококачественного сохранения термолабильных компонентов. На данный момент существуют два вида лиофильной сушки, различных по времени проведения процесса: атмосферная и вакуумная (Рисунок 5). Атмосферная сушка протекает крайне медленно, в то время как процесс сушки при пониженном давлении происходит значительно интенсивнее [211].

Время замораживания исходного продукта влияет на размер образованных кристаллов. Чем мельче размер замороженных кристаллов, тем быстрее проходит процесс сублимации, и структура замораживаемых компонентов не разрушается.

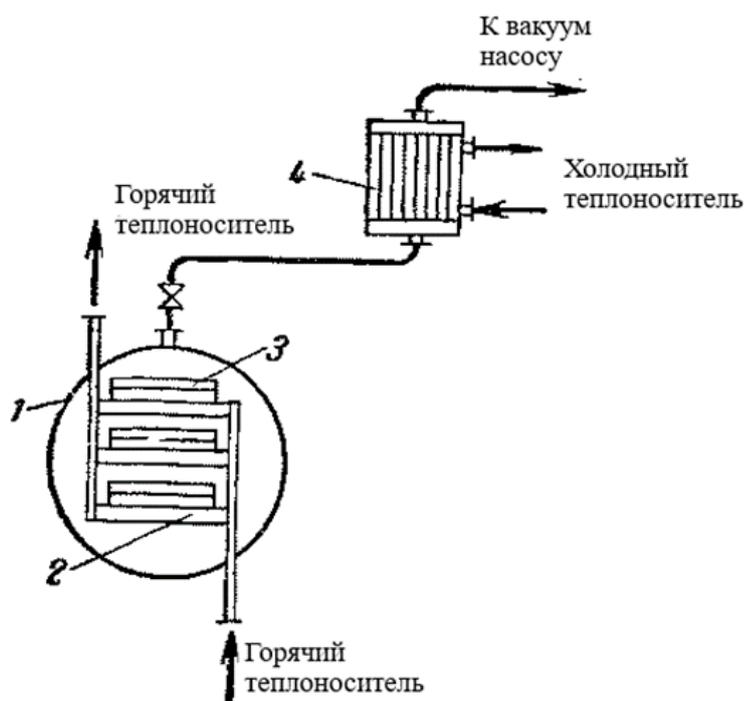


Рисунок 5. Принципиальная схема установки для лиофильной сушки. 1 – сушильная камера (сублиматор), 2 – пустотелая плита, 3 – противень, 4 – конденсатор-вымораживатель [211]

Процесс досушивания осуществляется при температуре 40 °С путем подвода тепла [212].

Лиофильное высушивание обеспечивает получение высококачественного материала с сохранение нативных свойств продукта. Однако оборудование для данного метода является сложным и дорогостоящим [213].

Метод распылительной сушки применим во многих областях промышленности: химической, фармацевтической, пищевой и других.

Технология основана на высушивании жидкого сырья (раствор, суспензия, эмульсия, дисперсия) путем внесения в среду горячего сушильного агента с получением порошкообразного продукта. Консистенция продукта может меняться в зависимости от физических и химических свойств сырья, требований к конечному продукту и от устройства сушилки (Рисунок 6) [214].

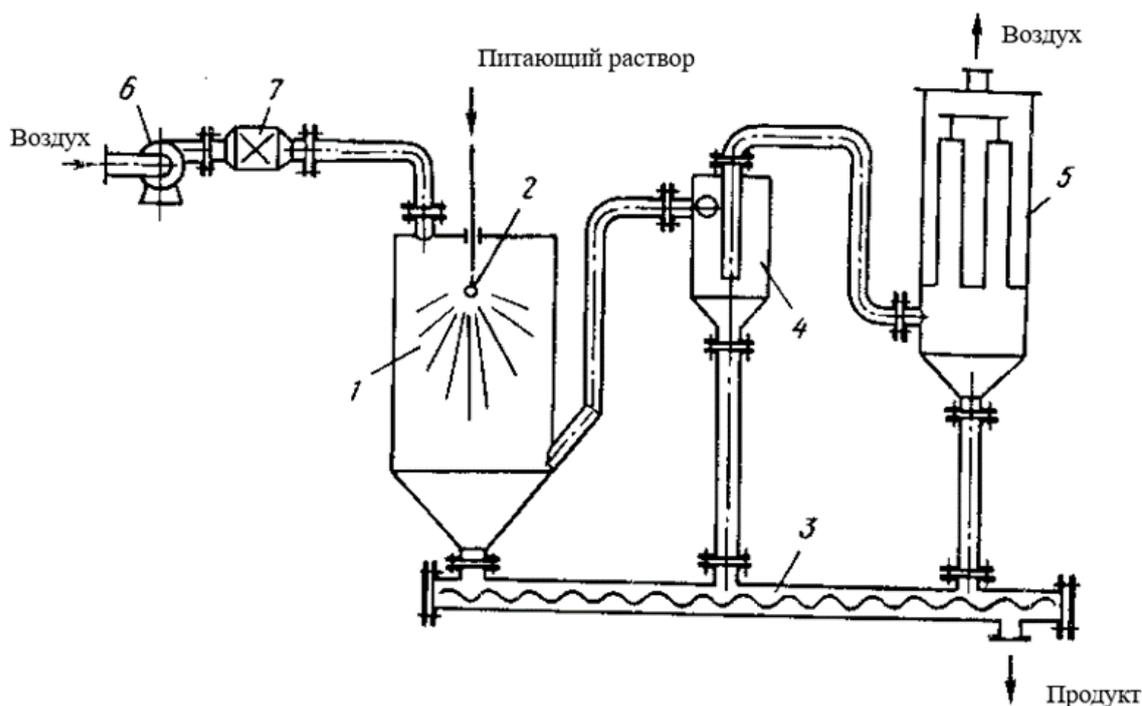


Рисунок 6. Принципиальная схема установки для распылительной сушки. 1 – сушильная камера, 2 – атоизатор, 3 – устройство вывода продукта, 4 – циклонная установка, 5 – воздушный фильтр, 6 – вентилятор, 7 – калорифер [211]

Процесс высушивания продукта на распылительной сушилке основан на 5 стадиях: концентрация исходного сырья, распыление высушиваемого материала, оптимизация поверхности контакта сырья с сушильным агентом, высушивание капель, отделение конечного продукта от сушильного агента [215, 216].

Высокая скорость сушки (15-30 секунд) предотвращает перегревание высушиваемого сырья, что обеспечивает получение высококачественного продукта с сохранением нативных свойств и предотвращает процессы денатурации белков, потери биологически-активных веществ, и окисление. Путем регулирования процесса можно получать продукты с заданными характеристиками, многокомпонентные смеси, предварительно добавив к исходному сырью необходимые примеси.

Процесс распылительной сушки упрощает вопрос в выборе материала сушильной камеры, позволяет производить сушку в широком интервале

температур, позволяет частично или полностью автоматизировать производство, что является экономически важным.

К основным недостаткам относятся: большие габариты сушильных установок для высушивания сырья с начальной температурой сушильного агента 100 – 150 °С, дорогостоящее и сложное оборудование для распыления исходного материала и отделения готового продукта.

На состояние конечного продукта влияют температура и движение потока сушильного агента в сушильной камере.

Процесс распылительной сушки основан на следующих параметрах:

- Температура сушильного агента на входе в сушильную камеру. Чем она выше, тем быстрее протекает процесс обезвоживания.
- Температура сушильного агента на выходе из сушильной камеры. Данный показатель влияет на содержание влаги в конечном продукте и на технические характеристики оборудования для отделения конечного продукта от сушильного агента.
- Вязкость подаваемой жидкости влияет на образование структуры капель, затрачивание энергии, показания давления для распыления жидкости и, как следствие, на выбор типа используемого распылителя.
- Содержание твердых частиц в сырье.
- Поверхностное натяжение подаваемого жидкого сырья. Добавление к исходному сырью поверхностно-активные вещества способствует более тонкому распылу жидкости при высоком поверхностном натяжении.
- Температура подаваемого сырья способствует регулированию перепада температур, необходимых для высушивания сырья.
- Температура испарения растворителя, влияющая на температуру сушки.

- Материал распылителя (нержавеющая сталь или карбид вольфрама), обладающий высокой коррозионной стойкостью и стойкость к истиранию [216].

1.5.2. Сравнительный анализ методов высушивания биомассы микроорганизмов

Оптимизация процесса сушки является одной из важных в технологическом производстве.

В литературе встречается ряд работ, основанных на оптимизации процесса сушки высокочувствительной к изменениям температуры культуры *Lactococcus lactis*, требующей особого внимания к проектированию сушильной установки и параметрам процесса обезвоживания для получения препаратов, содержащих жизнеспособные микроорганизмы.

Влияние температуры сушильного агента, влияющей на выживаемость клеток, стабильность культуры и характер клеточных повреждений после высушивания, описано в ряде статей. В работе [217] оптимизация параметров сушки была проведена при сравнении различных методов сохранения: заморозка, лиофилизация, высушивание на распылительной сушилке. Степень клеточных повреждений оценивали путем определения выживаемости культуры, а также по выработке ими молочной кислоты.

Исходное сырье в виде суспензии смешивали с 30% сухим молоком и доводили дистиллированной водой до содержания биомассы в 3, 30, 100 и 200 мг/мл. Полученные смеси высушивали в распылительной сушке по следующей методике. Сушильный агент с исходной температурой 220 °С подавался с расходом 4,57 мл/мин. Питающие растворы выдерживались на ледяной бане и подавались посредством перистальтического насоса через двухходовой атомизатор из нержавеющей стали. Конечная температура сушильного агента контролировалась при помощи регулирования скорости подачи питающей суспензии клеток. Скорость подачи раствора 27, 23, 17, 13 и 10 мл/мин обеспечивала температуру выходящего воздуха 77, 90, 100, 110 и 120 °С

соответственно. Полученные образцы хранились стерильно без доступа воздуха при температуре 4 °С.

Для изучения повреждения клеток в процессе лиофилизации 3% суспензии исходного сырья замораживали при температуре -50 °С в течение 25 минут. Замороженные образцы хранились при температуре -20 °С. Часть данных образцов подвергали лиофильной сушке в сушильной камере при давлении 27 Па и температуре -52 °С в течение 2-х дней.

При данных параметрах было выявлено, что содержание влаги в высушенных образцах варьировалось в пределах от 0,2% до 5,8% и зависело от конечной температуры сушильного агента, что влияло на время процесса сушки. Однако, увеличение температуры сушильного агента приводило к инаktivации клеток в высушиваемом материале. Сохранение жизнеспособных клеток в получаемом продукте регулировалось за счет уменьшения степени клеточных повреждений путем увеличения концентрации и скорости потока исходного сырья.

Процент выживаемости клеток после распылительной сушки составлял около 62% и уменьшался в процессе хранения при 4 °С в течение 3 месяцев, в то время как после замораживания культуры выживаемость была около 100%, а после лиофилизации – 84%.

В работе [218] также было проведено сравнение различных методов высушивания при изменении основных параметров. В качестве модельной культуры использовали штамм *Brevibacterium linens* широко применяемый в производстве. Распылительная сушка рассматривалась как альтернативный вариант высушивания биологического сырья, позволяющего снизить эксплуатационные расходы и увеличить объем производства.

Концентрация исходного сырья составляла 3 г биомассы на 100 мл натрий-фосфатного буфера. Сушку проводили с использованием камер из нержавеющей стали и стеклянной. Конечная температура сушильного агента в стеклянной камере (4,5 л) и в камере из нержавеющей стали (12,5 л) применялась с шагом в 5°С в интервале 70-90⁰ и 60-90 °С соответственно.

Суспензия подавалась в камеру со скоростью 30мл/мин и температурой 15°C для изучения процесса распыления на сохранность клеток. Влияние эффекта нагрева проводили при распылении с той же скоростью, температуру увеличивали до 220°C. Образцы помещались в полиэтиленовые мешки и плотно закрывающиеся емкости с дальнейшим хранением при -4°C.

Для сравнения различных процессов сушки суспензию в постоянной концентрации 3% подвергали заморозке в сухом льду в течение 5-10 минут и лиофилизировали при давлении в 900 Па, температуре -53°C в течение 24 часов. Высушенные образцы хранили при температуре -20°C и -4°C соответственно.

Как и в предыдущей работе в процессе высушивания на распылительной сушилке увеличение температуры сушильного агента приводило к термической инаktivации клеток. Увеличение объема сушильной камеры также действовало губительно на подаваемое сырье за счет длительного взаимодействия с сушильным агентом. В то время как при замораживании и лиофилизации выживаемость культуры составляла примерно 100%.

В процессе хранения при температуре 4°C клетки высушенных образцов (после лиофильной и распылительной сушек) сохраняли свою жизнеспособность в течение двух месяцев. Добавление глицерина в концентрации 1% от объема способствовало увеличению стабильности высушенных образцов.

1.5.3. Сушка ферментных препаратов и термолабильных биологически активных веществ

Сохранение стабильности и активности ферментов является главным фактором в выборе метода сохранения. В настоящее время ферменты подвергают лиофилизации. Однако применение распылительной сушки может быть более практичным и рентабельным.

В литературе имеются данные, описывающие процесс распылительной сушки применительно к ферменту α -амилаза.

Исходное сырье, подаваемое на сушку, представляло собой смесь мальтодекстрина, фермента и хлорида кальция. Температура сушильного агента

(воздуха) имела следующие значения: 160, 180, 200 и 220 °С. Для каждого значения температуры было выбрано четыре скорости подачи раствора фермента: 0,4, 0,8, 1,3 и 1,7 мл/с.

При данных параметрах было выявлено, что содержание влаги в высушенных образцах варьировалось в зависимости от температуры сушильного агента и скорости подачи исходного сырья в пределах от 2,1% до 9,6%.

Активность высушенного фермента, заранее регидратированного в буферном растворе (рН 4,7), проверяли путем ферментативной деградации крахмала и его способности образовывать сине-черный комплекс с йодом. При разрушении комплекса раствор менял окраску с темно-синего на красно-коричневый. Ферментация проводилась на водяной бане при температуре 37°С в течение 15 минут, после чего фермент инактивировался добавлением соляной кислоты. Поглощение измеряли на спектрофотометре при длине волны 570 нм.

Активность α -амилазы после процесса сушки составляла от 51,9% до 91,8%. Воздействие температуры сушильного агента и изменение скорости подачи исходного сырья оказывали значительное влияние на сохранение свойств фермента. Уменьшение контакта высушиваемого материала с сушильным агентом путем увеличения скорости подачи суспензии приводило к наибольшей сохранности активности высушенных образцов [219].

В работе [220] проводилось исследование процесса распылительной сушки на характеристики используемого в фармацевтической промышленности пептидного препарата, содержащего фермент β -галактозидазу. Помимо влияния на высушиваемый препарат основных показателей (температура сушильного агента, скорость подачи исходного сырья, расход воздуха) было проведено оценивание влияния вспомогательных веществ, добавляемых в исходный материал.

Аналогично с работами [217 – 219] содержание влаги в получаемом препарате зависело от температуры сушильного агента, а сохранение характеристик высушиваемого препарата от температуры сушильного агента и скорости подачи питающего раствора. Однако увеличение выхода получаемого

препарата путем высушивания при высоких начальных температурах сушильного агента и низких скоростях подачи питающего раствора приводило к уменьшению остаточной активности фермента, что повлияло на необходимость исследования применения стабилизирующих добавок.

В ходе экспериментов было выявлено, что при высушивании исходного сырья на минимальных температурах, без использования дополнительных веществ или с добавлением маннитола потеря активности препарата была высокая. В процессе хранения также наблюдалось понижение активности. Аналогичный эффект прослеживался при резком изменении температуры, что было объяснено денатурацией белка. При добавлении к исходному сырью аргинин гидрохлорида и трегалозы активность ферментного препарата после высушивания и во время хранения (1 год при температуре 40°C) оставалась практически без изменений. Добавление сахарозы также стабилизировало сохранение активности после процесса сушки, однако при хранении полученных образцов выше 5°C активность снижалась через три месяца.

Биологически активные вещества являются важными компонентами в фармацевтике, пищевом и сельскохозяйственном производстве. Исследование сохранения активности БАВ после высушивания на распылительной сушилке представлено в работе [221] на примере получения кормовой добавки из клеток *Rhodotorula glutinis*, содержащих β -каротин. Получение препаратов, содержащих данный каротиноид, и их свойства хранения являются нестабильными в основном из-за химической денатурации компонентов, происходящей за счет повышения температуры, воздействия кислорода, УФ-излучения. Анализируемые высушенные образцы оценивали на содержание влаги и β -каротина, на наличие жизнеспособных клеток, используя метод посева на агаризованную среду, с последующим подсчетом колоний.

Концентрированную биомассу высушивали при различных температурах атомизатора, регулируя изменение скорости потока исходной суспензии; скорость потока сушильного агента была постоянной и составляла 600 л/ч. В качестве стабилизирующих веществ были добавлены ионол и α -D-токоферол,

приготовленные по методике [221]. Хранение высушенного материала проводили при температурах 4 и 30°C в условиях без и с облучением белым светом. Определение содержания β -каротина проводили методом экстракции из высушенных образцов с последующим определением на аппарате высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В результате проведенных исследований было отмечено негативное влияние увеличения температуры сушильного агента и концентрации антиоксидантов на количественное содержание и активность β -каротина в высушенных образцах. Срок хранения полученного материала уменьшался с увеличением остаточной влаги в образцах и большим содержанием живых клеток. По полученным результатам был сделан вывод, что максимальная сохранность β -каротина и выживаемость клеток зависят от скорости подачи питательного раствора, а оптимальными параметрами являются те, при которых был получен абсолютно сухой продукт и полная инактивация клеток. Добавление стабилизирующих веществ дает временный результат в течение 5 недель. Воздействие светом при хранении негативно сказывалось на стабильности каротиноидов и приводило к разрушению β -каротина.

Таким образом, на основании анализа литературы можно сделать вывод: распылительная сушка может быть использована для высушивания различных биологических объектов с получением продуктов с требуемыми характеристиками, при этом основные показатели процесса распылительной сушки, которые могут влиять на свойства конечного продукта при высушивании штаммов галобактерий, следующие:

- Начальная температура сушильного агента и скорость подачи питающего раствора;
- Добавление стабилизирующих веществ, способствующих сохранению нативных свойств исходного сырья и стабилизации компонентов в полученных образцах при дальнейшем хранении;
- Процесс обезвоживания высушиваемого материала;

- Остаточная влажность получаемого продукта. Для белковых компонентов продукт должен быть абсолютно сухим, что достигается высокой температурой и, как следствие, термической инактивацией клеток, в то время как для жизнеспособности клетки такие условия губительны;
- Скорость подачи питающего раствора, влияющего на время контакта исходного материала и сушильного агента. Минимальное время контакта положительно воздействует на сохранение жизнеспособности клеток высушиваемого материала и их БАВ.

1.5.4. Стабилизирующие вещества

Основным механизмом защиты клеточной массы при высушивании является внесение в сушильный агент стабилизирующих веществ в концентрации 5—20 %, которые способствуют регулированию осмотического давления и устранению вредного воздействия кислорода и свободных радикалов [222]. Выбираемые протекторы обладают термозащитными функциями (лактоза, сахароза или трегалоза, декстроза, многоатомные спирты (маннитол, сорбитол) или выступают в качестве пробиотических стимуляторов роста (олигофруктоза- и галактоолигосахариды) [223 – 229]. В дополнение к протекторам, используют несущий материал (лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, комплексные наполнители “StarLac”, “Ludipress”) [230], обеспечивающий следующие характеристики получаемого порошка: пористость, сыпучесть, противослеживание, хорошие смачивающие и диспергирующие свойства. Наиболее востребованными наполнителями в фармацевтических, пищевых и биотехнологических производствах являются биологически приемлемые и неактивные вещества или смеси этих веществ (лактоза, сахароза, сорбитол и т.д.) [230 – 232].

Использование сахаров в качестве протекторов является предпочтительным из-за их относительно низкой цены, химически безвредной природы и общего использования в пищевой промышленности. Наличие различных

ферментируемых сахаров в питательной среде приводит к образованию метаболитов, повышающих жизнеспособность бактериальных культур при сушке. Неферментируемые сахара оказывают гиперосмотическое воздействие на клетки, что способствует накоплению совместимых растворенных веществ, делающих клетки устойчивыми к осмотическому шоку во время сушки. Согласно работе [233], сахара, особенно дисахариды, могут заменять молекулы воды и сохранять мембранные структуры, задерживать денатурацию белка путем образования водородных связей с последними. [234]

Для повышения выживаемости культур, высушенных методом распылительной сушки, используют различные сочетания протекторов. В работе [233], использование комбинации соевого белка и мальтодекстрина или обезжиренного молока и арабской камеди увеличивало количество жизнеспособных клеток *Bifidobacterium lactis* BB12. При использовании камеди акации для защиты пробиотических культур *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 во время распылительной сушки и хранения было показано, что добавление камеди акации в концентрации 10 мас.% увеличивают выживаемость клеток в 10 раз по сравнению с контрольным образцом [235].

При высушивании биосуспензии штамма бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* в качестве защитных компонентов были добавлены крахмал 1,0 мас.%, молочные сливки 2,5 мас.% и смесь из 10,0 мас.% сахарозы и 1,0 мас.% желатина. По результатам исследования известно, что введение наполнителей увеличивает скорость высушивания продукта в 1,5 раза. Коэффициент массоотдачи был максимальным при добавлении крахмала, а при добавлении сахарозы и желатина не зависел от скорости сушильного агента, что объясняется образованием различных поверхностей получаемого продукта. Показано, что внесение стабилизирующих веществ способствовало уменьшению стресса на микроорганизмы за счет уменьшения поверхностного натяжения и расширения пор, что являлось причиной снижения капиллярного давления, и, благодаря встраиванию молекул наполнителя, приводило к укреплению клеточной стенки [236].

Для доставки лекарств в желудочно-кишечный тракт используют метод микрокапсулирования, который заключается в образовании оболочки из желирующего вещества вокруг микроорганизмов, что способствует сохранению жизнеспособности последних. Технология получения микрокапсул основана на пяти основных этапах: подготовка исходного сырья; взвешивание и загрузка в реактор-гомогенизатор; приготовление суспензии микроорганизмов; распылительная сушка; фасовка, упаковка, маркировка, хранение, и используется во многих исследованиях. Штаммы бактерий, защищенных микрокапсулой, устойчивы к антибактериальным препаратам широкого спектра действия, к пищеварительным ферментам, обладают высокой антагонистической активностью к различным видам патогенных микроорганизмов. [237]

Так, в статье [238] для стабилизации лекарственных агентов от неблагоприятных факторов, витамины защищали легко растворимыми желатиновыми оболочками с добавлением различных наполнителей: сахара, лактозы, декстрина, смесь лактозы с сорбитом, яичным порошком, крахмалом. Таким образом, продолжительность действия данных образующихся микрогранул зависело от толщины оболочки и типа полимера в ее составе, и не зависело от кислотности желудочного сока, перистальтики ЖКТ, физической активности и времени приема лекарственного средства.

В работе [237] микрокапсулированию подвергалась смесь концентратов ацидобактерий, бифидобактерий, лактобактерий. В качестве основы для получения оболочки, устойчивой к кислой среде, использовали гуммиарабик. В качестве наполнителя был выбран сироп лактулозы.

Лактулоза, в отличие от лактозы, не расщепляется в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, и является питательной средой для пробиотиков. Выделяемые при этом метаболиты подавляют патогенную и протеолитическую микрофлору. В следствии чего уменьшается образование токсичных продуктов белкового распада, предотвращается отравление организма, повышается сопротивляемость к различным заболеваниям [239].

В исследовании был разработан производственный процесс высушивания суспензии методом распылительной сушки при следующих параметрах: температура субстрата 16-18°C, температура теплоносителя на выходе из сушилки 68-72°C, расход выпариваемого раствора 168-180 мл/мин [237].

Для большинства термочувствительных пробиотических штаммов таких, как *L. acidophilus* и *Lactobacillus rhamnosus* температура воздуха на выходе при распылительной сушке рекомендована в диапазоне от 70 до 80°C во избежание потери жизнеспособных клеток в готовом продукте [224, 226]. Solmaz Behboudi-Jobbehdar [224] предложили способ высушивания штамма *L. acidophilus*, микрокапсулированного в тройной несущей системе, состоящей из мальтодекстрина (12 г), концентрата сывороточного белка (4 г) и D-глюкозы (4 г), для получения максимально жизнеспособных порошков с приемлемыми физико-химическими и структурными характеристиками. По полученным данным были подобраны следующие условия сушки штамма *L. acidophilus* NCIMB 701748: температура на входе 134 °C, температура на выходе 73-74°C, скорость подачи сушильного агента 7,2 мл/мин. Полученные в данных условиях микрокапсулы характеризовались приемлемыми физико-химическими свойствами (общий цвет, температура стеклования, гигроскопичность) и низкой скоростью инактивации при хранении в условиях охлаждения и комнатной температуры.

При сравнении выживаемости бифидобактерий, высушенных методом распылительной сушки, было замечено, что на жизнеспособность сильно влияют тип носителя и его концентрация. В исследованиях Lian et al. [240] наибольшая выживаемость бактериальных культур отмечена при добавлении к сушильному агенту желатина, арабской камеди или растворимого крахмала в концентрации 10 мас.%, в то время, как увеличение концентрации до 20% (об/об) приводило к уменьшению их выживаемости.

Авторы работ Espina и Packard [241] также отметили сокращении жизнеспособности *Lactobacillus acidophilus* после увеличения концентрации обезжиренного сухого молока с 25 до 40% (об/об) при высушивании в распылительной сушилке. Однако содержание твердых веществ в носителе

приводило к образованию крупных частиц, требующих больше времени на сушку, что увеличивало воздействие высоких температур на бактерии [242, 243].

Ananta et al. [226] высушивали *Lactobacillus rhamnosus GG* с добавлением 20% (об/об) восстановленного обезжиренного молока. Было показано, что при температуре на выходе равной 80°C выживаемость микроорганизмов составила 60%. Добавление рафтилозы и полидекстрозы приводило к увеличению уровня выживаемости. Устойчивость при хранении полученного продукта снижалась при уменьшении количества носителя. По полученным данным для обеспечения высокой остаточной жизнеспособности различных штаммов молочнокислых бактерий оптимальное содержание твердых веществ отмечено при добавлении восстановленного обезжиренного молока в концентрации 20% (об/об) [226].

Состав питательной среды и условия роста также влияют на жизнеспособность микроорганизмов во время сушки и дальнейшего хранения. [244] В условиях осмотического стресса, вызванного в процессе сушки, на стабилизацию клеточной мембраны и белков оказывают воздействие совместимые растворенные вещества (аминокислоты, четвертичные амины и сахара). В своем исследовании Kets et al. [245] на примере молочнокислых микроорганизмов, не синтезирующих данные вещества, показали положительное влияние последних на жизнеспособность бактерий.

Сравнительный анализ добавления сахаров в питательную среду и в сушильный агент представлен в работе [246]. Добавление глюкозы в питательную среду значительно увеличивало термостойкость клеток *Lactobacillus bulgaricus*. Фруктоза, лактоза, манноза или сорбит, добавленные в качестве протекторов в сушильный агент, усиливали защиту до степени, средне-зависимой от роста. Также увеличение выживаемости клеток отмечено при добавлении в питательную среду и сушильный агент сахарозы и NaCl.

При хранении *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans* значительное влияние на выживаемость оказывают сорбит и глутамат натрия [247].

Таким образом, в одних и тех же условиях сушки и хранения жизнеспособность отдельных штаммов различна. А оптимальная защитная среда для процесса сушки может оказаться не оптимальной для защиты микробных клеток во время хранения [243, 248].

Несмотря на большой интерес исследователей к галофильным микроорганизмам и их БАВ, остается невыясненными ряд положений. В литературе представлены работы по изучению влияния света, хлорида натрия, аминокислот на рост галобактериальных культур, но не встречаются данные о культивировании галобактерий *H. salinarum* на альтернативных источниках питания, богатых аминокислотным составом - растительных гидролизатах. Также нет сведений о высушивании биомассы галобактерий при распылительной сушке.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования.

В качестве объектов исследования использовали штамм *Halobacterium salinarum* 353 Пущинский (ВКПМ В-1739) (ранее известный как *Halobacterium halobium* 353П). Данный штамм был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России (ВКПМ). Регистрационный номер штамма В-1739. Клетки *Halobacterium salinarum* 353П представляют собой одиночные подвижные палочки 2-5*0,5-0,9 мкм, иногда объединены по 2-3 палочки, спор не образуют, газовых вакуолей не содержат, колонии на агаризованной среде выпуклые полупрозрачные красного цвета с гладким краем, легко снимаются петлей, в среду не вырастают. Данный штамм является факультативным аэробом, желатину не разжижает, сахарозу, мальтозу, лактозу, фруктозу не подкисляет. [249]

В результате работы был выделен непатогенный галобактериальный штамм *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ В-12794), полученный на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева многоступенчатой селекцией исходного штамма *Halobacterium salinarum* 353 Пущинский без использования методов генетической модификации и обработки химическими или физическими мутагенными агентами. Штамм *Halobacterium salinarum* ВКПМ-12794 превосходит исходный по выходу биомассы, каротиноидов, важнейших ненасыщенных жирных кислот, обладает повышенной устойчивостью к вирусному поражению. Штамм может быть использован при производстве высокоактивных бактериальных препаратов для применения в различных областях. Прототипом заявляемого штамма является штамм *Halobacterium salinarum* ВКПМ В-1739.

Клетки *Halobacterium salinarum* ВКПМ-12794 представляют собой одиночные подвижные палочки 3-7*0,5-0,8 мкм, спор не образуют, газовых вакуолей не содержат, колонии на агаризованной среде полупрозрачные, гладкие с гладким краем, выпуклые, насыщенного красного цвета, в среду не вырастают,

легко снимаются петлей. Факультативный аэроб, сахарозу, мальтозу, лактозу, фруктозу не потребляет. Экстремальный галофил, для поддержания жизнедеятельности и нормальной формы клеток требует присутствия в среде 250 г/л NaCl, ионов Mg, K, при попадании в среду с содержанием NaCl менее 1М клетки лизируют. Рост наблюдается в диапазоне температур 34-48 °С, оптимальная температура для роста 38,5 °С, для лучшего синтеза каротиноидов, бактериородопсина и прироста биомассы требуется дополнительное освещение. Среди синтезируемых каротиноидов присутствуют, в основном, C₅₀-каротиноиды группы бактериоруберина (до 90-95% от общего количества), ликопин и β-каротин. Бактериородопсин - ретиналь-содержащий белок находится в пурпурных мембранах (липопротеиновый комплекс) и обеспечивает клетку энергией при освещении и недостатке кислорода. Штамм синтезирует ненасыщенные жирные кислоты (омега-3,6,9). Результаты 16S рРНК анализа показывают 100%-ную идентичность с видами *Halobacterium salinarum*.

Процесс культивирования заявляемого штамма полностью идентичен процессу культивирования штамма-прототипа.

Штамм хранится во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России (ВКПМ) [250].

2.2. Питательные среды для культивирования галобактерий.

Глубинное культивирование *H. salinarum* проводили в течение 7 суток при температуре 37,5-38,5°С в конических колбах общим объемом 250 мл, рабочий объем составлял 150 мл, при перемешивании 150 об/мин на орбитальной платформе New Brunswick G10 (New Brunswick, USA). Постоянное освещение поддерживали с помощью лампы PHILIPS TL-D 18W/33-640 (500 Лк на уровне колб). Состав среды для культивирования, г/л: NaCl – 250, MgSO₄*7H₂O – 20, цитрат натрия – 3, KCl – 2, глицерин – 2,5, триптон (пептон) – 5, дрожжевой экстракт – 2, вода водопроводная. Стерилизацию проводили 20 минут при 0,7 ати.

Твердофазное культивирование галобактерий на чашках Петри.

Галобактерии культивировали на агаризованной среде следующего состава, г/л: NaCl – 250, MgSO₄*7H₂O – 20, цитрат натрия – 3, KCl – 2, дрожжевой экстракт – 2, триптон – 5, агар-агар – 20, глицерин – 2,5, вода водопроводная. Чашки находились в закрытой прозрачной емкости с постоянной влажностью во избежание преждевременного высыхания среды и образования на поверхности кристаллов соли. Влажность поддерживалась при помощи открытого сосуда с водой, помещенного рядом с чашками Петри. Время культивирования составляло 10-14 суток при температуре 37,5-38,5°C и постоянном освещении лампой PHILIPS TL-D 18W/33-640 (500 Лк).

Культивирование галобактерий по методике с внесением и без внесения адсорбента [13].

Для оценки влияния метаболитов на хранение культуры *H. salinarum* культивирование проводили по методике с внесением и без внесения адсорбента. В качестве адсорбента был взят активированный уголь АГЗ, инкапсулированный в агаризованную оболочку. [13] Подготовку питательной среды проводили следующим образом. В колбы общим объемом 250 мл вносили 1,5 г гранулированного активированного угля. Для фиксации адсорбента на дне в колбы добавляли 25 мл питательной среды следующего состава, г/л: NaCl – 250, MgSO₄*7H₂O – 20, цитрат натрия – 3, KCl – 2, агар-агар – 20, вода водопроводная. Колбы стерилизовали при 0,7 ати в течение 20 минут, охлаждали до застывания агара. Отдельно готовили питательную среду, состоящую из, г/л: NaCl – 250, MgSO₄*7H₂O – 20, цитрат натрия – 3, KCl – 2, глицерин – 2,5, триптон (пептон) – 5, дрожжевой экстракт – 2, вода водопроводная, стерилизовали при тех же условиях. После охлаждения питательную среду в количестве 100 мл стерильно заливали в колбы с адсорбентом и засеивали клетками *H. salinarum*. Посевной материал составлял 5% об. Время экспозиции 7 суток при постоянном перемешивании при 150 об/мин на орбитальной платформе New Brunswick G10

(New Brunswick, USA), температуре 37-40 °С и постоянном освещении лампой PHILIPS TL-D 18W/33-640 (500 Лк).

2.3. Культивирование *H. salinarum* на ферментолизатах зерновых.

Для получения ферментолизатов использовали крупы: кукурузная (ООО «Компания «Ангстрем Трейдинг»»), ячневая (ООО «Аксиома») и пшеничная (ООО «Аксиома»). Ориентировочные значения пищевой ценности круп на 100 г продукта представлены в таблице 1.

Таблица 1. Ориентировочные значения пищевой ценности круп на 100 г продукта, заявленные производителями

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

Крупы разводились водопроводной водой. Гидромодуль был выбран в интервале 1:5 – 1:20, значения рН смеси доводили до необходимого 10% растворами NaOH и HCl. Полученная смесь подвергалась тепловой обработке в автоклаве при изменении давления в пределах 0,7-1,5 ати, время тепловой обработки варьировали от 10 до 40 минут. Охлажденная смесь помещалась на водяную баню для последующего гидролиза.

Для ферментативного гидролиза использовали следующие ферменты: Protex40E в концентрациях 1-4% от массы протеина в субстрате и 0,5-1% от массы крупы; Протосубтилин ГЗх в интервале 1-4% от массы крупы (концентрации подобраны в ходе экспериментов). Время гидролиза 1,5-2 часа (Таблица 2).

Таблица 2. Характеристики используемых ферментных препаратов

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

Для очистки от сгустков крупы, полученные ферментоллизаты центрифугировали 12,000 об/мин, при 20 °C, в течение 20 минут (Eppendorf 5010R, Germany). Супернатант профильтровывали с помощью вакуумной фильтрации, pH питательной среды регулировали до 7,0-7,2.

В питательную среду для *H. salinarum* на основе ферментоллизатов добавляли следующие компоненты, г/л: NaCl – 250, MgSO₄*7H₂O – 20, цитрат натрия – 3, KCl – 2, глицерин – 2,5. Готовую среду стерилизовали в течение 30 минут при 0,7 ати. Посевной материал составлял 5% об. Время экспозиции 7 суток при постоянном перемешивании при 150 об/мин на орбитальной платформе New Brunswick G10 (New Brunswick, USA), температуре 37-40 °C и освещении лампой PHILIPS TL-D 18W/33-640 (500 Лк).

2.4. Культивирование галобактерий в биореакторе.

Культивирование галобактерий в стеклянных лабораторных биореакторах Minifors (Infors, Швейцария) с рабочим объемом 3 л (общий объемом 5 л) и Фермус (Нижний Новгород) с рабочим объемом 7 л (общий объем 10 л) осуществляли в течение 7 суток в стерильных условиях с автоматическим контролем pH в диапазоне 7,5 – 7,8, pO₂, с температурой в интервале 37,5 – 38,5 °C при освещении лампами PHILIPS TL-D 18W/33-640 через биореакторное стекло. Культивирование проводилось на ферментоллизатах пшеничной и ячневой круп (выбрано в ходе исследования) с добавлением следующих компонентов, г/л:

NaCl – 250, MgSO₄*7H₂O – 20, цитрат натрия – 3, KCl – 2, глицерин – 2,5.
Посевной материал составлял 10 % об.

Для получения высокоплотной культуры культивирование сопровождалось прокачиванием питательной среды через реактор и отбором бесклеточной культуральной жидкости через мембранный модуль (NFY-4021S). Прокачивание среды проводилось с использованием перистальтических насосов (Longer Pump BT100-2J). Аппаратная схема представлена на рисунке 7.

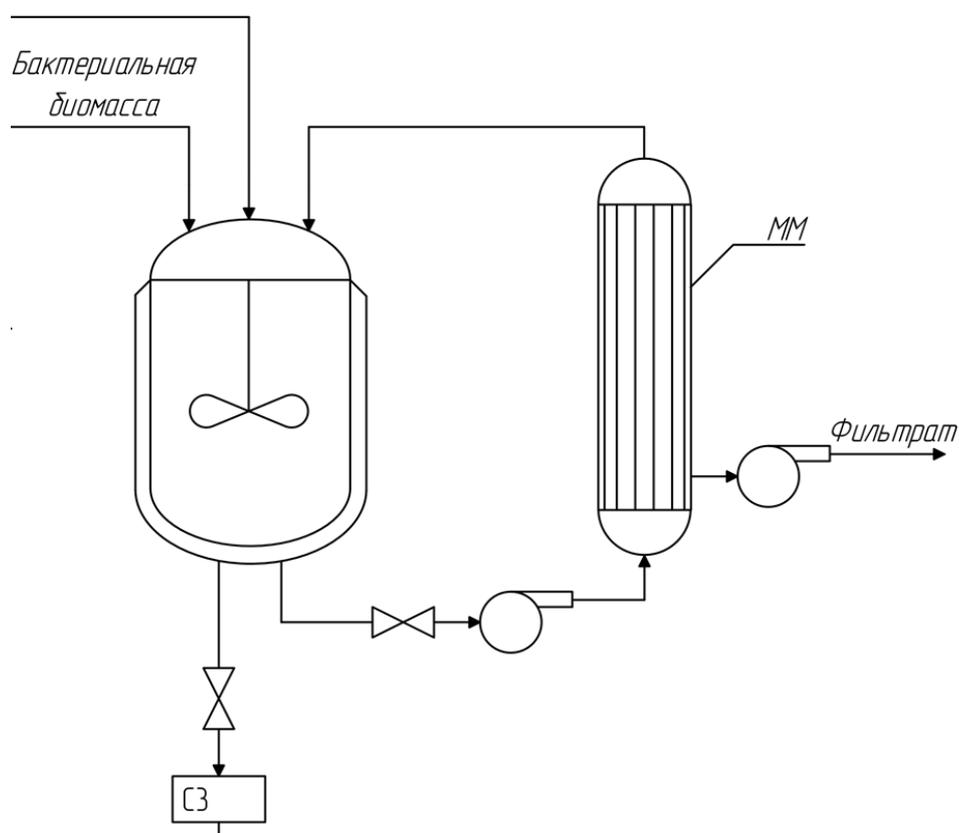


Рис. 7. Аппаратная схема получения высокоплотной культуры на ферментолизатах зерновых. СЗ – сборник, ММ – мембранный модуль.

2.5. Критерии оценки активности культуры галобактерий.

В качестве критериев оценки активности культуры *Halobacterium salinarum* в процессе культивирования использовали активность роста, определяли оптическую плотность культуральной жидкости измеренную при 660 нм, изменение рН, отмечали изменение цвета среды. Факт роста определяли по

количеству выросших колоний на твердой питательной среде (состав и условия описаны выше), измеряли содержание каротиноидов.

Определение содержания каротиноидов в биомассе галобактерий.

Содержание каротиноидов определяли при экстракции из биомассы галобактерий. Биомассу отфуговывали при 7500 об/мин в течение 15 минут. Супернатант сливали. К осажденным клеткам добавляли ацетон объемом, равным объему супернатанта. Размешивали смесь стеклянной палочкой до полного обесцвечивания осадка. Смесь отфильтровывали через фильтровальную бумагу [22].

Полученные экстракты каротиноидов анализировали на спектрофотометре Shimadzu UV-260. Оптическую плотность экстракта каротиноидов измеряли при 494 нм.

Расчет проводили по следующей формуле:

$$X = (D_{494} \times V_{\text{пробы}}) / (m \times 1,9)$$

D_{494} – оптическая плотность анализируемой пробы при 494 нм;

V пробы – общий объем ацетона, мл;

m – навеска образца, г. [11].

Для уточнения результатов ацетоновые экстракты каротиноидов анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖХ) по разработанной методике. [251]

Определение сухого веса галобактериальной биомассы.

Определение сухого веса биомассы галобактерий проводили по специально разработанной методике. Клетки галобактерий, полученные при глубинном культивировании, отделяли от супернатанта путем центрифугирования. Полученную биомассу разделяли на две равные по массе части. Одну часть подвергали высушиванию в термостатируемом шкафу при температуре 105°C. Вторую часть ресуспендировали в минеральной среде и определяли оптическую плотность методом фотоэлектроколориметрии.

Полученные значения сухого веса биомассы и оптической плотности суспензий сопоставляли и вычисляли коэффициент соответствия этих двух величин.

2.6. Определение аминокислотного состава образцов.

Количественный анализ аминокислот проводили при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием колонок, заполненных сульфополистирольным катионитом. Детекцию аминокислот осуществляли реагентом, действующим компонентом которого является нингидрин. В результате взаимодействия α -аминокислоты с нингидрином образуется Шиффово основание, которое перегруппировывается, декарбоксилируется и расщепляется на альдегид и аминодикетогидринден. Образовавшийся аминодикетогидринден конденсируется еще с одной молекулой нингидрина. Образовавшееся соединение превращается в окрашенную енольную форму, получившую название «сине-фиолетовый комплекс Руэмана». Регистрацию оптической плотности раствора, вытекающего из реакционной бани, проводили при двух длинах волн – 570 и 440 нм, что позволяло детектировать любые аминокислоты.

Обсчет и интерпретация хроматограмм производили при помощи программы МультиХром ЗАО «Амперсенд» (Россия). Программа автоматически осуществляла коррекцию небольших разбросов во времени выхода аминокислот, которые имеют место из-за собственных небольших вариаций в условиях работы анализатора. Такая коррекция гарантирует правильность сравнения следовых количеств аминокислот.

Приготовление испытуемых растворов и стандартной смеси аминокислот:

В пластиковую пробирку объемом 1,5 мл (фирма «Eppendorf», Germany) было помещено 40 мкл концентрированной стандартной смеси 18 аминокислот (Amino Acid Standard, AA-S-18 -5ML analytical standard, SIGMA, pcode

1001357972, lot SLBC0408V) и 960 мкл 0,1 н соляной кислоты. Смесь была тщательно перемешана.

Проведение аминокислотного анализа.

Калибровку прибора и проведение анализов образцов проводили в следующих условиях:

прибор: аминокислотный анализатор, модель L-8800 (Hitachi, Ltd.), колонка: Hitachi Ion-Exchange Column 2622SC (PH) (Hitachi, Ltd., P/N 855-3508), стальная, 4,6*80 мм, температура колонки: 57 °С;

подвижная фаза:

элюент А: цитрат натрия 117мМ (рН 3,3), хлорид натрия 97 мМ, 0,5% тиодигликоль, 0,4 % Brij-35, 0,01 % каприловая кислота, смесь вода/этанол в соотношении 87: 13; (Merck Hitachi, AAA PH-1 Buffer - AN0-8706)

элюент В: цитрат натрия 136 мМ (рН 3,2), хлорид натрия 121 мМ, 0,5 % тиодигликоль, 0,4 % Brij-35, 0, 01 % каприловая кислота, смесь вода/этанол в соотношении 98: 2; (Merck Hitachi, AAA PH-2 Buffer - AN0-8707)

элюент С: цитрат натрия 114 мМ (рН 4,0), хлорид натрия 64 мМ, 0,5 % тиодигликоль, 0,4 % Brij-35, 0,01 % каприловая кислота, смесь вода/этанол в соотношении 99,6 : 0,4; (Merck Hitachi, AAA PH-3 Buffer - AN0-8708)

элюент D: цитрат натрия 228мМ (рН 4,9), хлорид натрия 930 мМ, 0,5 % бензиловый спирт, 0,4 % Brij-35, 0,01 % каприловая кислота, вода; (Merck Hitachi, AAA PH-4 Buffer - AN0-8709)

элюент Е: 0,2 н раствор NaOH;

- скорость потока: 0,4 мл/мин;

- объем инъекции: 50 мкл для испытуемого раствора, для РСО – 20 мкл;

- режим элюирования: ступенчатый градиент элюентов А, В, С, D и Е

(Таблица 3):

- постколоночная дериватизация: нингидриновый буфер R2 и раствор нингидрина R1 (1:1) (Ninhydrin Reagent Wako Amino Acid Automated Analyzer Kit for Hitachi, Wako Pure Chemical Industries, P/N 298-69601 или аналогичный)

скорость потока: 0,35 мл/температура: 136 °С детекция: 570 нм и 440 нм
(для пролина)

Таблица 3. Программа подачи буферных растворов

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %	Элюент С, %	Элюент D, %	Элюент Е, %
0	100	0	0	0	0
3,99	100	0	0	0	0
4	0	100	0	0	0
9,39	0	100	0	0	0
9,4	0	0	100	0	0
19,99	0	0	100	0	0
20	0	0	0	100	0
39,99	0	0	0	100	0
40	0	0	0	0	100
44,99	0	0	0	0	100
45	0	100	0	0	0
49,99	0	100	0	0	0
50	100	0	0	0	0
60	100	0	0	0	0

Пробоподготовка.

Тотальный кислотный гидролиз образцов проводили по следующей методике. Образец помещали в стеклянную ампулу и добавляли 300 мкл (0,3мл) свежеприготовленной гидролизующей смеси (концентрированные соляная и трифторуксусная кислоты в соотношении 2:1 с добавлением 0,1 % β-меркаптоэтанола). Затем замораживали в жидком азоте, вакуумировали и заплавляли. Гидролиз проводили при 155 °С в течение 1 часа. После гидролиза ампулу вскрывали, содержимое количественно переносили в пластиковую пробирку (фирма «Eppendorf», Germany) и досуха удаляли гидролизующую смесь. Сухой остаток растворяли в 1 мл смеси следующего состава: 0,1 мл 0,1н соляной

кислоты и 0,9 мл аликвоты, перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 8000 об/мин на центрифуге Microfuge 22R (Beckman- Coulter, US). Для анализа было взято 60 мкл полученной пробы. [252]

Определения триптофана. Был проведен отдельный гидролиз образцов бн соляной кислотой, содержащей 4% тиогликолевой кислоты. Условия гидролиза: аликвоты растворов, взятые для гидролиза, концентрировали на вакуум концентраторе досуха и добавляли по 125 мкл гидролизующей смеси. Гидролиз проводили в стеклянных микроампулах под вакуумом в течение суток при 105 °С. По окончании гидролиза ампулы вскрывали, досуха удаляли гидролизующую смесь.

Определение цистина (метод окислительного гидролиза).

А. Приготовление надмуравьиной кислоты: к 900 мкл 98 % муравьиной кислоты добавляли 100 мкл воды при перемешивании. Из полученного раствора брали 900 мкл и добавляли 100 мкл 30 % перекиси водорода при перемешивании. Смесь выдерживали во льду 1 час.

Б. Гидролиз образца: в пластиковую пробирку помещали навеску, добавляли 100 мкл надмуравьиной кислоты и полученную смесь выдерживали во льду 1 час. Далее упаривали на Centri Var Concentrator LABCONCO (US) при 30°C. Затем добавляли 100 мкл воды и упаривали досуха. Далее двумя порциями (по 100 мкл) гидролизной смеси растворяли осадок и переносили раствор в ампулу для гидролиза. Гидролиз и последующую обработку гидролизата проводили стандартным образом.

Определение триптофана (метод щелочного гидролиза).

А. Навеску белка помещали в ампулу, растворяли в 4N растворе едкого натра и продували азотом. Ампулу запаивают и выдерживают при 105 °С в течение 5 часов. [253]

Б. Навеску белка (20 мг) в присутствии 30-тикратного количества $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, крахмала и 0,5мл воды запаивали в ампуле из термостойкого стекла и кипятили при 120 °С в течение 15 часов. Можно проводить гидролиз в атмосфере азота. [254]

2.7. Определение амилолитической активности ферментных препаратов по крахмалу. [255]

Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

В пробирки заливали по 0,5 мл 1 % раствора растворимого крахмала и 1/15М фосфатный буфер (рН-6,2) и ставили в водяной ультратермостат при 37 °С на 10 мин. В рабочие пробирки добавляли раствор фермента до суммарного объема 1,0 мл ($V_{\text{ФБ}} + V_{\text{фермента}} = 0,5$ мл), а в контрольную пробу добавляли воду по объему равную $V_{\text{фермента}}$, смеси перемешивали и выдерживали в термостате 30 минут. Затем из каждой пробирки отбирали по 0,5 мл раствора и переносили в пробирки с предварительно налитыми туда 1,0 мл цветного раствора, пробирки закрывали пробками и ставили на водяную баню с температурой 100 °С. Через 10 минут содержимое пробирок быстро охлаждали водопроводной водой со льдом до комнатной температуры, после чего в каждую пробирку добавляли по 2,5 мл воды. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и измеряли оптические плотности растворов на спектрофотометре Shimadzu UV-260 при 546 нм. Спектрофотометр настраивали по раствору, содержащему буферный раствор, цветной реактив и воду в соотношении 1:2:5.

Количество редуцирующих сахаров рассчитывали с использованием калибровочной кривой $D_{546} = f$ (концентрация глюкозамина гидрохлорида). Смесь цветного раствора готовили следующим образом: 10 г ДНСК растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды (не содержащей CO_2), затем добавляли 15 г гидроксида натрия и около 250 мл дистиллированной воды, после полного растворения добавляли 300 г К-На тартрата и доводили объем до 1 л. После полного растворения раствор фильтровали (при наличии осадка) и хранили в склянке темного цвета. Раствор имеет рН 10 и хранится в течение 1 года.

Амилолитическую активность рассчитывали по формуле:

$$A = (D_{\text{оп}} - D_{\text{к}}) * \Sigma V * V_{\text{к}} / (g * K_{\text{п}} * V_{\text{ф}} * t); \text{ (мМ глюкозы/мг*мин)},$$

Доп – оптическая плотность опытной пробы,

D_k – оптическая плотность контрольной пробы,

$\Sigma V = 1$ мл – сумма объемов растворов ($V_{\text{фермента}} + V_{\text{буфера}} + V_{\text{крахмала}}$) (мл),

V_k – объем колбы (мл), в которой растворяли навеску фермента массой g мг,

T – время инкубации в минутах,

$K_p = 0,0485$ (опт.ед_{546нм}*мл/мм глюкозы) – коэффициент пересчета от оптической плотности раствора к мм глюкозы в мл раствора.

2.8. Определение протеолитической активности по казеину.

Данная методика является модификацией метода Kunitz M. et. al. [256]

Исследуемый раствор фермента объемом 2,0 мл добавляли в стеклянную пробирку и оставляли на водяной бане (Janke & Kunkel) с многоточечной мешалкой (IKAMAG EOA 9) в течение 10 минут при температуре 37 °С. Реакция протеолиза была инициирована добавлением 2,0 мл 2 % раствора казеина Гаммерштейна в фосфатном буфере (рН 8,0). Реакция протекала в течение 20-50 минут при той же температуре. Во время реакции протеолиза пробирку встряхивали с постоянной периодичностью. Реакция была остановлена путем добавления 4,0 мл 10 % трихлоруксусной кислоты. Через 15 минут реакционную смесь отфильтровывали. Спектральную поглощательную способность измеряли при 280 нм.

Расчет проводили по следующей формуле:

$$ПА = D_{280} * \Sigma V$$

$$ПА = D_{280} * \Sigma V * Ge / \tau * 1,2 * Ve * g,$$

D_{280} – спектральная поглощательная способность при длине волны 280 нм;

ΣV – общий объем анализируемого раствора, мл;

Ge – масса растворителя, г;

τ – время реакции, мин;

Ve – объем анализируемого раствора фермента, мл;

g – масса фермента, г;

1,2 – коэффициент пересчета спектральной поглощательной способности в мМ тирозина.

Для определения внутриклеточной протеиназной активности клетки объемом 10 мл отфуговывали при 7500 об/мин в течение 15 минут (Eppendorf 5010R, Germany). Отфугованные клетки лизировали в 8 мл дистиллированной воды с добавлением ДНКазы.

2.9. Распылительная сушка галобактерий.

Для сушки использовали культуру галобактерий, выращенную глубинным способом по методике с внесением и без внесения адсорбента [13]. Суспензии галобактерий центрифугировали при 7500 об / мин в течение 15 мин (Eppendorf 5010R, Германия). Супернатант использовали для приготовления высококонцентрированной суспензии галобактерий (в соотношении 1 объем биомассы, собранной центрифугированием: 1 объем супернатанта).

Образцы суспензии сушили в мини-распылительной сушилке В-290 (Buchi, Flawil, Switzerland) (Рисунок 8), используя следующие параметры: температура сушильного агента на входе в аппарат от 120 до 150 °С; расход сушильного агента от 30 до 34 м³/ч; расход сжатого воздуха, подаваемого на форсунку (давление 5 бар) от 667 до 1052 л/ч; расход суспензии биомассы, подаваемой на сушку от 3,45 до 5,7 г/мин (Таблица 4).

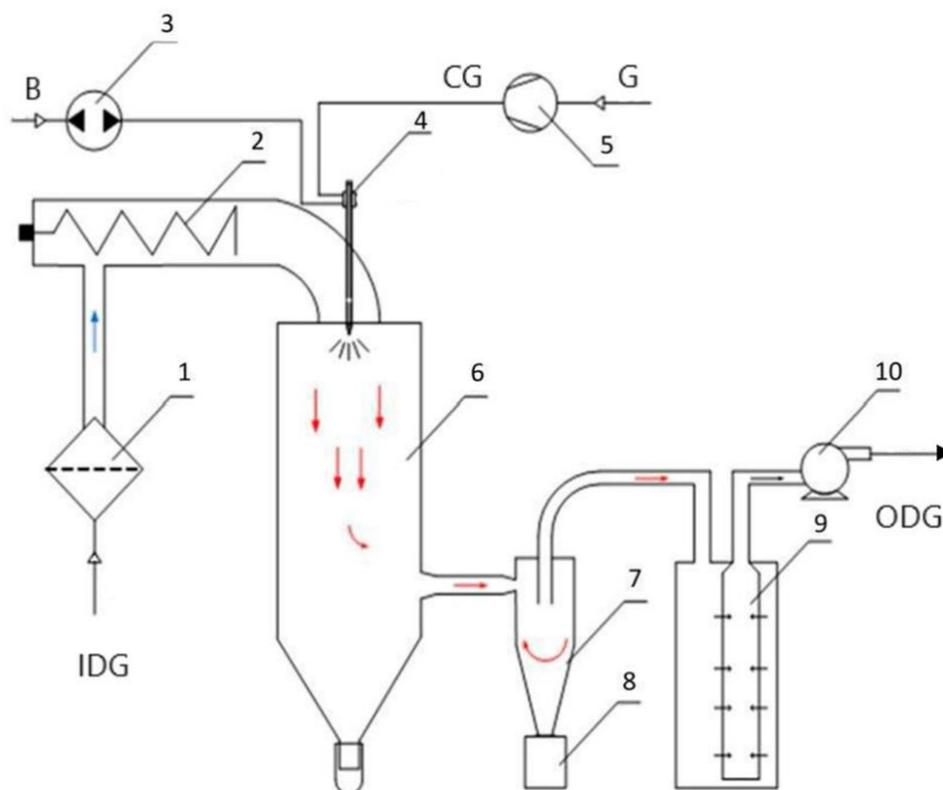


Рисунок 8. Схема мини-распылительной сушилки В-290: 1 – входной газовый фильтр, 2 – электрический нагреватель, 3 – перистальтический насос, 4 – пневматическая форсунка, 5 – компрессор, 6 – распылительная камера, 7 – циклон, 8 – сосуд для сбора продукта, 9 – выходной газовый фильтр, 10 – аспиратор для прокачивания газов через систему; В – суспензия биомассы, IDG - вход сушильного газа, ODG - выход сушильного газа, CG - сжатый газ [257]

Высушивание производили в трех режимах, соответствующих максимальному, минимальному и среднему времени контакта клеточной суспензии с горячим сушильным агентом. Высушенные образцы были получены в виде сыпучих порошков розового цвета с остаточным влагосодержанием от 2 до 5 %. Полученные образцы хранились в плотно закрытых контейнерах при температуре 4 °С.

Критериями эффективности процесса сушки являлась выживаемость микроорганизмов, оценка лаг-фазы и каротиноидов, поскольку при гибели возможна окислительная трансформация компонентов клетки.

Таблица 4. Параметры распылительной сушки

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

2.10. Лиофильная сушка галобактерий.

Клетки галобактерий, полученные глубинным методом, были сконцентрированы путем центрифугирования при 7500 об/мин в течение 15 минут. Для лиофилизации образец концентрированной биомассы предварительно замораживали при температуре -53 °С. Замороженные образцы сушили на лабораторной сублимационной сушилке (Lyph-Lock 6L) при пониженном давлении 900 Па и температуре -53 °С в течение 24 часов. Полученные образцы хранились в плотно закрытых контейнерах при температуре 4 °С.

2.11. Хранение высушенных образцов.

Полученные образцы, высушенные распылением и лиофилизацией, хранились в плотно закрытых контейнерах без доступа воздуха и света при температуре 4 °С. Хранение длилось 12 месяцев. С целью определения микробиологических и биохимических характеристик образцов, в процессе хранения осуществляли отбор проб: непосредственно после высушивания, спустя 6 и 12 месяцев.

2.12. Методы определения микробиологических и биохимических характеристик высушенных образцов.

Определение каротиноидов высушенных образцов.

Определение каротиноидов проводили по разработанной методике путем экстракции из высушенных образцов. В стеклянные пробирки добавлялись навески высушенных образцов массой 0,02 г. Для растворения кристаллов соли и разрушения клеточной стенки культуры к навескам добавляли 0,1 мл воды. Экстракцию каротиноидов осуществляли добавлением в пробирки 1 мл ацетона. Пробирки встряхивались механически в течение 10 минут. По окончании экстракции осадок отфуговывали на центрифуге Eppendorf 5010R при 10000 об/мин 10 минут. 100 мкл полученного экстракта разбавляли 1 мл смеси, поступающей на колонку: 10% этилацетат + 90% смесь (90% ацетонитрил, 9,9 % вода, 0,1% триэтиламин).

Полученные экстракты каротиноидов анализировались методом ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с УФ детектированием с аналитической колонкой для обращеннофазной хроматографии Диасфер-110-С18 (4,6 на 250 мм, диаметр частиц 5 мкм). Анализ проводили при: температура термостата колонки 25 °С, элюент: 10% этилацетат + 90% смесь (90% ацетонитрил, 9,9 % вода, 0,1% триэтиламин), расход элюента 1 мл/мин, длина волны 475 нм, вкалывали 20 мкл.

Каротиноиды измеряли по первому пику бактериоруберин, отмеченного на 9 минуте [251].

Определение остаточной жизнеспособности высушенных галобактерий.

Для определения жизнеспособности микроорганизмов в высушенных образцах и сохранности их клеточных структур, проводили высев высушенной биомассы на жидкую и твердую питательные среды (состав описан выше).

Навески высушенных образцов массой 0,068 г культивировали глубинным методом при температуре 37,5-38,5 °С в течение 7 суток на горизонтальной платформе New Brunswick G10 при 180 об/мин, постоянной освещенности 500 Лк лампами дневного света PHILIPS TL-D 18W/33-640. В процессе культивирования с частотой раз в 24 часа проводили отбор пробы объемом 1 мл для определения оптической плотности. По полученным данным были построены кривые роста и определены кинетические параметры роста высушенных образцов.

Культивирование на твердой среде проводили на чашках Петри. Пробы для посева отбирали из колб, в которых проводили глубинно культивировали высушенные образцы (описано выше). Фиксировали факт образования колоний на 14 сутки после посева.

Микроскопия высушенных образцов.

Микроскопию высушенных образцов галобактерий проводили при помощи фазово-контрастной световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии.

Для микроскопирования на световом микроскопе марки Hund V350 Wilomed, оснащенном фазово-контрастным устройством ФАТЕК М6-7, высушенные образцы готовили следующим образом: образец разводили глутаровым альдегидом состава: 0,05 М какодилатный буфер (pH 7,2), 25 % NaCl, 0,2 % MgCl₂, 2 % глутаровый альдегид; далее выдерживали 1 час при температуре 4 °С; затем образец микроскопировали в фазовом контрасте.

Сканирующая электронная микроскопия выполнялась на микроскопе марки JSM-6510LV (Jeol, Japan; центр коллективного пользования им. Д.И. Менделеева) во вторичных электронах под ускоряющим напряжением 15 кВ.

Распределение частиц по размерам.

Средний гидродинамический радиус и распределение частиц по размерам определяли с помощью фотон-корреляционной спектроскопии на анализаторе Photocor Compact C-3 (Photocor, Россия). Образцы были диспергированы в изопропанол 99,9% (Panreac, Испания) при смешивании на магнитной мешалке. Распределение контролировали в течение пяти последовательных измерений.

Статистический анализ.

Для статистического дисперсионного анализа была использована программа MatLab R2014a (ANOVA) на уровне значимости $p \leq 0,05$. Все образцы были подготовлены и проанализированы в трех повторностях.

2.13. Разработка нейросетевой модели.

При разработке нейросетевой модели в качестве входных параметров (входных нейронов) задавались: 1 – температура сушильного агента на входе в камеру; 2 – расход сушильного агента; 3 – расход сжатого воздуха, подаваемого на двухпотокую форсунку; 4 – расход биосуспензии, подаваемой на сушилку; 5 – способ культивирования (уровень «-1» соответствовал случаю, когда адсорбент не применялся; уровень «+1» – случаю, когда адсорбент применялся). Для оптимизации распылительного высушивания биомассы культивирование *H. salinarum* проводили по методике с внесением и без внесения адсорбента. [13] Были рассмотрены нейронные сети с одним выходным нейроном, соответствующим концентрации каротиноидов в биомассе в какой-то один определенный период времени, и нейронные сети с тремя выходными нейронами, которые соответствовали концентрации каротиноидов в биомассе сразу после сушки, через 4, 6 месяцев и через год. Были взяты нейронные сети с одним и

двумя скрытыми слоями. Основные характеристики выбранных нейронных сетей приведены в таблице 5.

Таблица 5. Основные характеристики рассмотренных нейронных сетей

Количество нейронов на входе	Количество нейронов в скрытых слоях		Количество нейронов на выходе	Число весовых коэффициентов
	Скрытый слой 1	Скрытый слой 2		
5	1	3	1	16
	1	4		19
	2	3		25
	3	2		29
	1	-	3	12
	2	-		21
	1	2		19
	2	1		21
	2	2		27

Расчет количества весовых коэффициентов для сети с одним или двумя скрытыми слоями проводится согласно следующим соотношениям:

$$N = (N_{in} + 1) \cdot N_{HL1} + (N_{HL1} + 1) \cdot N_{out}$$

$$N = (N_{in} + 1) \cdot N_{HL1} + (N_{HL1} + 1) \cdot N_{HL2} + (N_{HL2} + 1) \cdot N_{out}$$

Использованный в работе массив данных был разделен на обучающее множество и тестовую выборку. Массивы данных предварительно шкалировались в диапазон значений от [-1,+1].

Одним из важнейших этапов работы модели на основе нейронной сети является обучение на выборке данных. В качестве алгоритма обучения использовался алгоритм обратного распространения ошибки, успешно применяющийся для многослойных перцептронов. В качестве функции активации нейронов использовался гиперболический тангенс.

Целью обучения сети при помощи алгоритма обратного распространения ошибки является такая подстройка ее весов, чтобы приложение некоторого множества входов приводило к требуемому множеству выходов. При обучении предполагается, что для каждого входного вектора существует парный ему целевой вектор, задающий требуемый выход. Вместе они называются обучающей парой.

Все приведенные в таблице 5 сети были обучены на обучающей выборке и протестированы на тестовой. Расчеты показали, что в случае использования сетей с одним выходным нейроном, такие сети не могут с одинаковой точностью предсказывать концентрацию каротиноидов в биомассе в разные моменты времени, т.е. для каждого из временных диапазонов необходимо использовать отдельную нейронную сеть, что неудобно. Поэтому для прогнозирования и оптимизации процесса была выбрана искусственная нейронная сеть с тремя нейронами в выходном слое, имеющая наименьшую ошибку, равную 0,953. Выбранная нейронная сеть имеет два скрытых слоя, первый из которых содержит 2 нейрона, второй – 1 нейрон. В сети использованы нейроны со смещением. Данная сеть схематично отражена на рисунке 9.

Нейронная сеть была использована для расчета неизвестных значений на всем диапазоне исследуемых параметров.

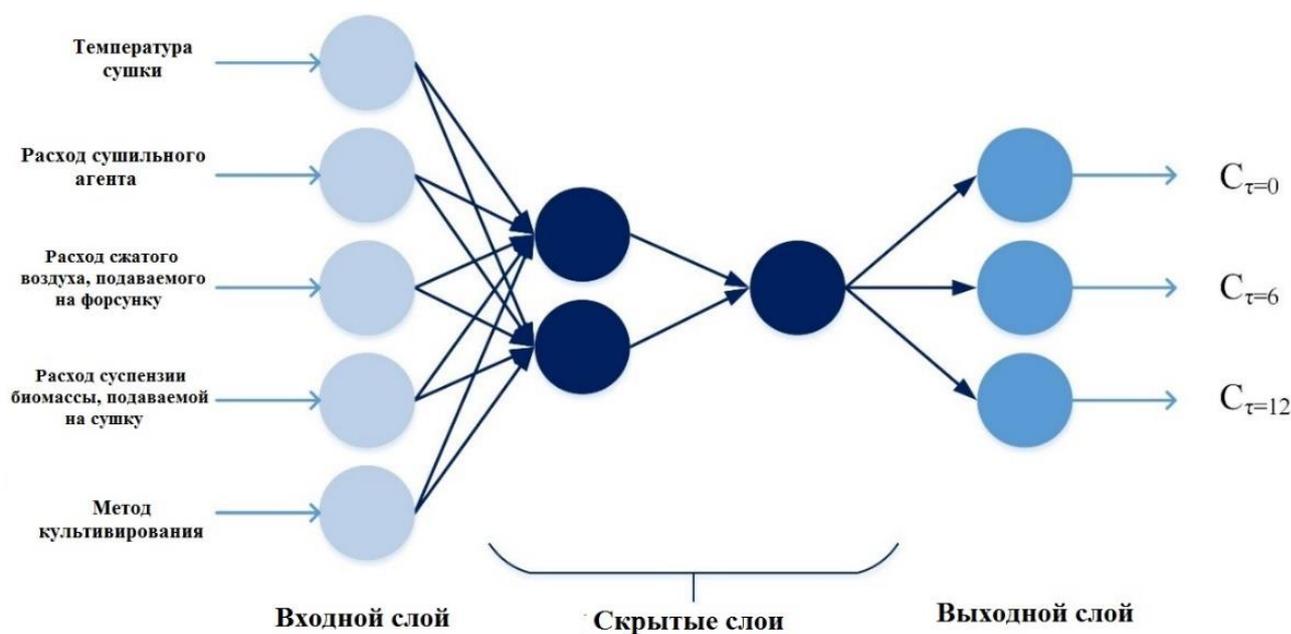


Рисунок 9. Выбранная нейронная сеть [257]

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Культивирование галобактерий на ферментолизатах зерновых

Разработка технологии получения биомассы галофилов путем импортозамещения основных компонентов питательной среды в настоящее время является важной практической задачей. [14]

В биотехнологическом производстве в качестве основной составляющей питательной среды для выращивания разных культур микроорганизмов используют ферментативные гидролизаты зерновых. [15 – 20] Получение таких продуктов, как аминокислоты, крахмалы из зерна путем его глубокой переработки решает сразу два вопроса: импортозамещения и хранения излишек зерна. К тому же для биотехнологической переработки подходит зерно любого класса и качества. [21]

В Российской Федерации урожайность хлебных зерновых культур по показателям за период с 1985 по 2010 года была наибольшей для пшеницы до 33,7 ц/га, ячменя – до 45,4 ц/га и кукурузы – до 40,3 ц/га [258]. Вопрос хранения таких объемов зерна является особенно актуальным. Для исследования были использованы кукурузная, пшеничная и ячневая крупы (характеристики представлены на стр. 58). (Использование готовой муки нецелесообразно, так как дополнительная очистка ведет к сокращению питательных компонентов в среде, а также в процессе предобработки образуется тестообразная смесь, затрудняющая дальнейшую работу).

3.1.1. Выбор ферментных препаратов

Для повышения доступности компонентов зерновых в питательных средах для культивирования галобактерий *H. salinarum*, не способных усваивать углеводы, были использованы широко используемые нейтральные и щелочные протеазы бактерий рода *Bacillus*, обладающие низкой стоимостью, что является предпочтительным для промышленного применения. На основании предварительных экспериментов сравнительной оценки ферментных препаратов

по критериям условий их использования и ферментативной активности для дальнейшей работы были выбраны ферментные препараты Protex 40E и Протосубтилин ГЗх.

Определение активности ферментных препаратов проводили по модифицированному методу с применением субстрата казеина (Таблица 6) [259].

Таблица 6. Значения ферментативной активности комплексных ферментных препаратов

Ферментный препарат	Субстрат		
		Условия (рН, температура)	Активность по субстрату, ПЕ*/мг
Протосубтилин ГЗх	Казеин	8,0; 37°C	0,160±0,020
	Крахмал	8,0; 37°C	0,970±0,030
	КМЦ Na**	8,0; 37°C	–
Protex 40E	Казеин	8,0; 37°C	1,400±0,100
	Крахмал	8,0; 37°C	0,025±0,009
	КМЦ Na	8,0; 37°C	0,006±0,001

*ПЕ – протеолитические единицы (мкМ тирозина) при 37°C

**КМЦ Na – карбоксиметилцеллюлоза натрия

3.1.2. Получение ферментоллизатов зерновых

На первом этапе работы проводили исследование влияния на рост *H. salinarum* состава среды, содержащей ферментоллизаты зерновых в качестве источника углерода.

При получении ферментоллизатов (методика приведена на стр. 59) определяли продолжительность и интервалы давления, определяющие температуру обработки зерновых круп, при различных концентрациях вносимого

фермента. Интервал времени тепловой обработки зерновых круп был выбран в пределах от 10 до 40 минут, интервал давления – 0,7 – 1,5 ати для каждого фермента. Гидромодуль оптимизировали в интервале 5:1 – 20:1. Критерием оценки исследования режимов являлась концентрация сырого протеина в ферментоллизате после проведения гидролиза, измеренная методом Къельдаля (Таблица 7) [260].

В таблице 7 представлены результаты концентрации белка в полученных ферментоллизатах в зависимости от выбора концентрации ферментных препаратов, круп и их тепловой обработки.

Дозировка ферментного препарата Protex 40E была выбрана согласно статье [261] в пределах 1 – 4 % от количества белка в субстрате. Однако, вязкая структура полученных при данных условиях гидролизатов затрудняла дальнейшие исследования. В ходе работы, количество вносимого фермента при ферментоллизе вносилось в пределах 1 – 4 % от массы субстрата. Для препарата Протосубтилин ГЗх количество также варьировалось от 1 до 4 % от массы субстрата.

Оптимальное соотношения растворителя (водопроводной воды) к зерну (далее гидромодуль) составило 5:1, при этом получалась чрезмерно вязкая субстанция, с которой было трудно осуществлять дальнейшие исследования. С учетом этого был выбран гидромодуль 10:1, дальнейшее увеличение гидромодуля не приводило к положительным результатам.

Для дальнейшей работы были выбраны ферментоллизаты с наибольшим количеством сырого протеина в среде: гидролизаты пшеничной и ячневой круп при использовании ферментного препарата Протосубтилин ГЗх в концентрации 2 % об. от субстрата и гидролизат кукурузной крупы при использовании препарата Protex 40E в концентрации 1% об. от субстрата при тепловой предобработке круп в течение 20 минут при избыточном давлении 1 ати.

Таблица 7. Значения концентрации сырого протеина в ферментолизатах

Крупа	Фермент	Условия предобработки крупы		Концентрация сырого протеина в ферментолизате, г/л
		Время, мин	Давление, ати	
Пшеничная	Протосубтилин ГЗх, 2 % от субстрата	40	1,5	10,8±1,8
		20	1,5	10,6±1,7
		10	1,5	7,9±0,6
		40	1	10,5±1,7
		20	1	10,3±1,0
		10	1	6,5±0,8
		40	0,7	8,9±1,3
		20	0,7	8,1±0,9
		10	0,7	8,0±0,9
Ячневая	Протосубтилин ГЗх, 2 % от субстрата	40	1,5	8,0±1,0
		20	1,5	7,6±0,6
		10	1,5	5,3±0,3
		40	1	7,7±1,2
		20	1	7,5±0,7
		10	1	5,5±0,4
		40	0,7	6,4±0,7
		20	0,7	6,2±0,5
		10	0,7	5,8±0,4
Кукурузная	Protex 40E, 1% от субстрата	40	1,5	5,9±1,3
		20	1,5	5,6±1,0
		10	1,5	4,7±1,1
		40	1	5,8±1,3
		20	1	5,4±1,1
		10	1	4,6±0,4
		40	0,7	5,2±0,9
		20	0,7	5,0±0,6
		10	0,7	4,5±0,4

В стандартной среде для культивирования галобактерий (стр. 57) в качестве источника углерода добавляли дрожжевой экстракт и триптон в количестве 2 и 5 г/л соответственно. Концентрация сырого протеина в компонентах питательной среды варьирует от качества исходного сырья и способа получения. Согласно паспортам продуктов (Приложение 1 и 2), концентрация сырого протеина в триптоне примерно равна 83 г/ 100 г продукта, в дрожжевом экстракте – 67 г/ 100 г продукта. Общее количество сырого протеина в стандартной среде культивирования галобактерий составляет около 5,5 г/л.

Для сравнения, в таблице 8 представлены значения концентрации сырого протеина в выбранных ранее ферментолізатах пшеничной, ячневой и кукурузной круп и среде для культивирования галобактерий, содержащей триптон и дрожжевой экстракт.

Таблица 8. Значения концентрации сырого протеина в ферментолізатах и стандартной среде для культивирования галобактерий

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

Из полученных данных следует, что концентрация основного источника углерода для галобактерий выше в ферментолізатах пшеничной и ячневой круп, чем в стандартной среде для культивирования.

На полученных ферментолізатах зерновых было проведено культивирование *H. salinarum* и получены концентрации биомассы и каротиноидов на 7 сутки после культивирования при 38,5 °С. (Таблица 9)

Из литературных данных известно, что внутриклеточные или мембран-ассоциированные протеазы галобактерий являются металлозависимыми. Добавление солей марганца, цинка, железа оказывало существенное влияние на внутриклеточную протеолитическую активность и выход биомассы (Таблица 9).

Протеолитическая активность галобактерий при культивировании на полученных ферментативных гидролизатах была максимальна через сутки после начала эксперимента. В супернатанте активность практически не обнаруживалась.

Таблица 9. Сводная таблица основных значений, полученных в процессе культивирования *H. salinarum* на ферментализатах зерновых

Фермент	Крупа	Концентрация биомассы, г/л	Концентрация каротиноидов, мл/100 г биомассы	Протеазная активность на 24 час, ед/г биомассы
Протосубтилин ГЗх	Пшеничная	2,7 – 3,1	17	7,7
	Ячневая	2,5 – 2,8	11	12,0
Protex 40E	Кукурузная	2,2 – 2,4	11	-
Стандартная среда		2,8 – 3,0	15	4,6
При добавлении в среду солей металлов (ZnSO ₄ *7H ₂ O, MnSO ₄ *H ₂ O, FeSO ₄ *7 H ₂ O)				
Протосубтилин ГЗх	Пшеничная	4,3 – 4,4	23	11,2
	Ячневая	4,1 – 4,2	19	14,2
Protex 40E	Кукурузная	3,2 – 3,3	13	3,0

Оптимальные концентрации солей ZnSO₄*7H₂O, MnSO₄*H₂O, FeSO₄*7 H₂O в среде культивирования составили 1, 0,3, 25 мг/л питательной среды соответственно.

Таблица 10. Значения концентрации биомассы *H. salinarum* при добавлении солей металлов при культивировании на ферментолізатах

Ферментные гидролизаты зерновых	Концентрация биомассы, г/л	Концентрация солей металлов в среде культивирования, мг/л		
		ZnSO ₄ *7H ₂ O	MnSO ₄ *H ₂ O	FeSO ₄ *7H ₂ O
Пшеничная крупа Протосубтилин ГЗх (2% об.)	3,5-3,8	5	0,3	75
	3,5-3,7	1	1,7	75
	4,0-4,3	1	0,3	25
Ячневая крупа Протосубтилин ГЗх (2% об.)	3,0-3,3	5	0,3	75
	2,8-3,2	1	1,7	75
	3,5-3,8	1	0,3	25
Кукурузная крупа Protex 40E (1% об.)	2,5-2,7	5	0,3	75
	2,9-3,0	1	1,7	75
	3,2-3,3	1	0,3	25

Анализ аминокислотного (АК) состава ферментолізатов до и после культивирования был проведен на аминокислотном анализаторе фирмы “Hitachi”L-8800 (Япония). На анализ были отобраны следующие образцы:

№1 – среда для культивирования галобактерий *H. salinarum*, состоящая из гидролизата пшеничной крупы и минеральных солей, фермент Протосубтилин ГЗх;

№2 – культуральная жидкость, после культивирования галобактерий *H. salinarum* на среде, состоящей из гидролизата пшеничной крупы и минеральных солей, фермент Протосубтилин ГЗх;

№3 – среда для культивирования галобактерий *H. salinarum*, состоящая из гидролизата кукурузной крупы и минеральных солей, фермент Protex 40E;

№4 – культуральная жидкость, после культивирования галобактерий *H. salinarum* на среде, состоящей из гидролизата кукурузной крупы и минеральных солей, фермент Protex 40E.

Все образцы были подвергнуты тотальному кислотному гидролизу по методикам, приведенным в соответствующем разделе.

Процентное содержание аминокислот от суммы в пробах представлен на рисунке 10.

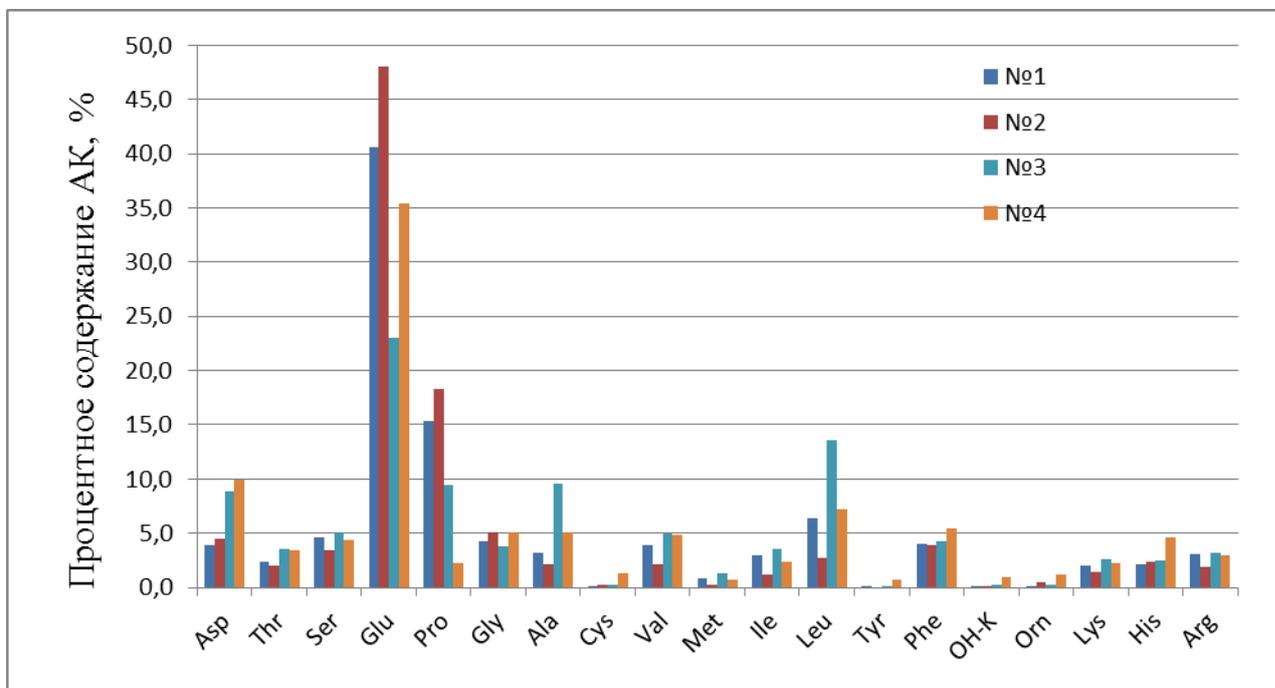


Рисунок 10. Процентное содержание аминокислот в образцах от суммы

Сравнение аминокислотного состава образцов указывает на большой процент содержания глутаминовой кислоты до 2 мг/мл, а также высокое содержание лейцина и пролина по сравнению с другими АК (Приложение 3). Наибольшее потребление серина, отмечено в ферментолизатах пшеничной крупы, аспарагиновой кислоты – в ферментолизатах кукурузной крупы.

Согласно полученным данным концентрация АК в среде была снижена с 8,3 до 3,7 г/л (для гидролизата пшеничной крупы, фермент Протосубтилин Г3х) и с 4,4 до 1,2 г/л (для гидролизата кукурузной крупы, фермент Protex 40Е) при этом концентрация биомассы составила 3,4 и 3,0 г/л соответственно. Данные по АК анализу ячневой крупы не представлены, так как являются схожими с данными для пшеничной крупы (ферментный препарат Протосубтилин Г3х).

При внесении в среды солей металлов, влияющих на собственную протеолитическую активность галобактерий, потребление АК увеличивалось на

1,5 – 2 г/л. Концентрация полученной биомассы составила 4,4 и 3,3 г/л для гидролизата пшеничной крупы, фермент Протосубтилилин ГЗх и кукурузной крупы, фермент Protex 40Е).

По полученным результатам можно сделать вывод, что замена дрожжевого экстракта и триптона в среде культивирования галобактерий *H. salinarum* на ферментоллизаты зерновых культур является выгодным и соответствует политике импортозамещения в России на 2019 год.

3.1.3. Высокоплотностное культивирование в мембранном биореакторе

Для получения высокоплотностной культуры проводилось культивирование с мембранным модулем в ферментере при использовании ферментативного гидролизата пшеницы, так как на кукурузном ферментоллизате культура быстро лизировала (Рисунок 11). В качестве модельной культуры использовали штамм *Halobacterium salinarum* 353П (номер ВКПМ В-1739) и *Halobacterium salinarum* 353П-1 (номер ВКПМ В-12794) (стр. 56). На первой стадии в ферментер вносился инокулят (10% об.) и культивирование проводилось до накопления биомассы около 3 г/л биомассы. 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 галобактерий около 20-21 г/л скорость протока фиксировали на уровне 0,175 ч⁻¹, концентрацию растворенного кислорода поднимали до уровня 15-20%, и через некоторое время биомасса начинала интенсивнее накапливать каротиноиды. 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 (номер ВКПМ В-1739) и от 27 до 35 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П-1

(номер ВКПМ В-12794). На этом этапе можно было часть протока, который шел исключительно через мембранный модуль направлять на слив биомассы с $D=0,011-0,012 \text{ ч}^{-1}$ и ее накоплением в резервуаре для последующей переработки. Однако, характеристики биомассы с высокой концентрацией ухудшаются при длительном простое, и более целесообразным методом являлся слив и переработка половины рабочего объема суспензии из биореактора примерно каждые двое суток. Показатели при высокоплотном культивировании штамма *Halobacterium salinarum* 353П-1 (номер ВКПМ В-12794) были аналогичны при культивировании штамма 353П (номер ВКПМ В-1739), но из-за устойчивости последнего к вирусному поражению культивирование возможно проводить в нестерильных условиях. При нестерильном высокоплотном культивировании штамма 353П (номер ВКПМ В-1739) около пятой части ферментаций проходили нестабильно или заканчивались лизисом. Вирусы, которые предположительно находились в NaCl, выделены и первично охарактеризованы в работе [261].



Рисунок 11. Комплекс для высокоплотного культивирования галобактерий.

3.2. Распылительное высушивание биомассы галобактерий.

С целью длительного сохранения в нативном состоянии биомассы *H. salinarum* и содержащихся в ней компонентов клеток в данной работе предложена технология распылительного высушивания в сравнении с лиофильной сушкой, используемой для консервирования различных микроорганизмов.

Выбор диапазона параметров распылительной сушки галобактерий зависел от характеристик, требуемых для получаемого на выходе продукта: уровень влажности не более 5%, минимальная деградация каротиноидов, максимальное сохранение жизнеспособности клеток.

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

Предельно допустимая скорость подачи биосуспензии на сушку определялась минимальной скоростью подачи сушильного агента и сжатого воздуха таким образом, чтобы температура сушильного газа на выходе из камеры не опускалась ниже 55 °С, а при минимально допустимой скорости подачи биомассы на сушку температура выходного сушильного агента не превышала 80°С при максимальной скорости сушки.

После сушки на установке (Рисунок 12) были получены мелкодисперсные порошки розового цвета (Рисунок 13).

В предварительных опытах по подбору режимов распылительной сушки в ряде случаев часть клеток после сушки реактивировали на агаризованных и в жидких питательных средах. Однако концентрация каротиноидов в некоторых режимах снижалась до 65%, что является недопустимым, как и высокое содержание влаги в высушенных образцах.



Рисунок 12. Установка распылительной сушки, фирма BUCHI



Рисунок 13. Образцы биомассы, полученные после распылительного высушивания

3.2.1. Оптимизация параметров распылительного высушивания методом искусственных нейронных сетей

Дальнейшая оптимизация параметров распылительной сушки проводилась с использованием искусственных нейронных сетей для режимов распылительной сушки, приведенных в таблице 4 (стр. 71). Режимы обеспечивали минимальное разрушение каротиноидов и приемлемое содержание влаги в образцах. Модель ANN также учитывала некоторые изменения содержания каротиноидов при хранении и влияние метода культивирования.

В результате высушивания были получены образцы с влажностью от 1,7 до 5% и содержанием биомассы от 51% до 54%. Снижение содержания каротиноидов составило от 5 до 29% для образцов, культивируемых на среде без адсорбента – активированного угля АГЗ (варианты А) и от 3 до 35% для образцов, культивируемых с адсорбентом (варианты Б) (стр.). Исходное содержание каротиноидов в биомассе составило $29 \pm 2,3$ мг/100 г биомассы при культивировании без адсорбента (вариант А) и $17 \pm 1,3$ мг/100 г биомассы при культивировании с адсорбентом (вариант Б).

3.2.2. Микробиологические и биохимические характеристики высушенных образцов

В процессе распылительной сушки в режимах, выбранных для оптимизации (таблица 4, стр. 71), формировались сферические частицы с инкапсулированными галобактериями. Морфология частиц сильно варьировала. Структуры, показанные на рисунке 14, присутствуют во всех вариантах. Рыхлые и полые частицы в больших количествах были получены при более высокой температуре сушильного газа на входе в камеру. Более низкие температурные режимы приводили к образованию более плотных и гладких частиц. На поверхности образцов можно различить высушенные галобактериальные клетки палочкообразных и сферических форм. Размеры сублимированных клеток были в 2-3 раза меньше, чем у образцов, полученных после распылительного высушивания.

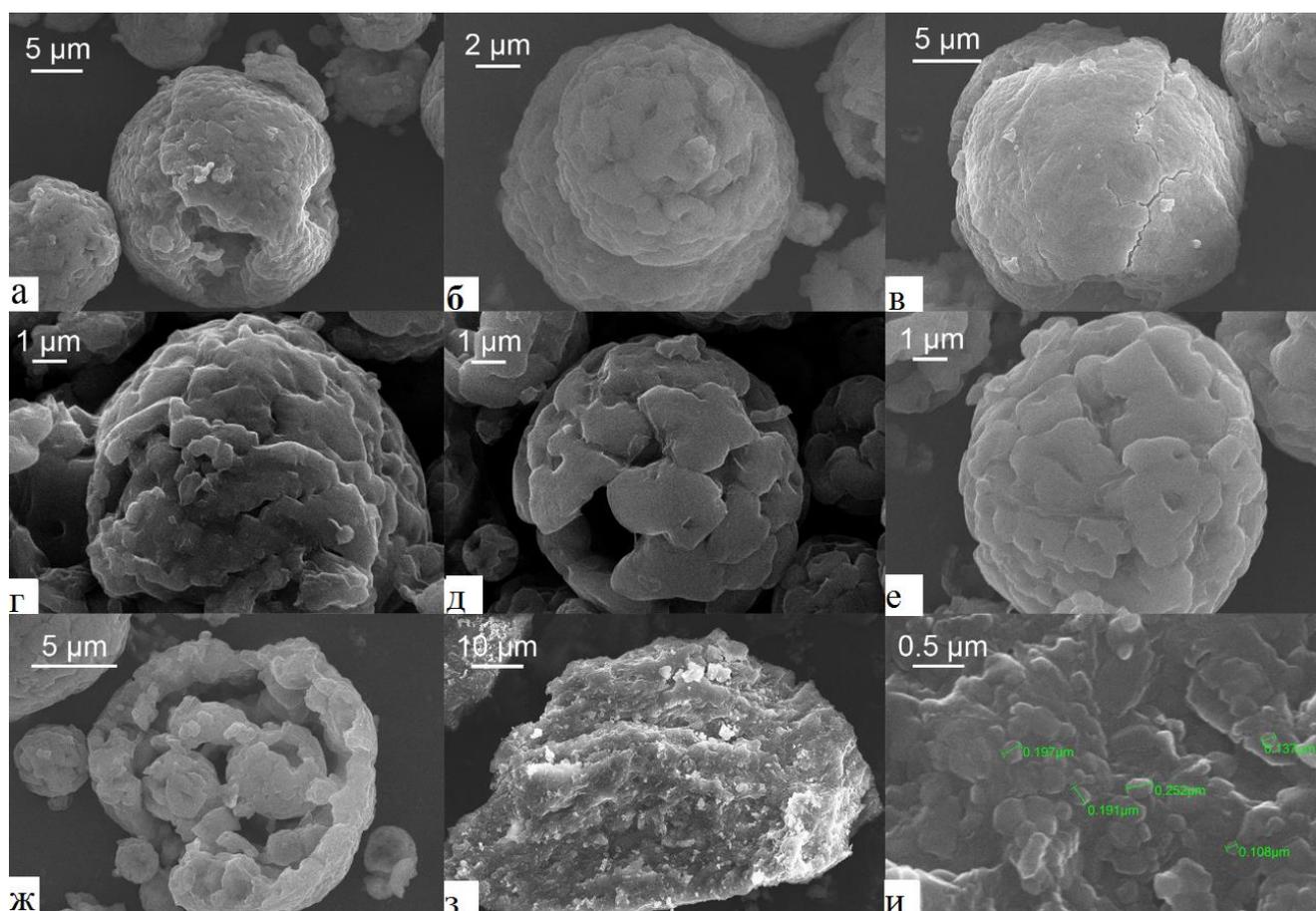


Рисунок 14. Фотографии частиц, полученных после высушивания на распылительной сушилке (а-ж) и высушенных методом лиофилизации (з-и), выполненные при помощи СЭМ

Расход сжатого воздуха и скорость подачи биомассы оказывали значительное 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 форсунку, и минимальной скорости подачи биомассы.

При формировании мелких капель значительно увеличивалась площадь контакта жидкой фазы и сушильного агента, при этом скорость сушки и интенсивность ее протекания возрастали. Это 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. В таблицах 11 и 12 представлены образцы, подвергшиеся воздействию стресса в различных режимах распылительной сушки.

Таблица 11. Сводная таблица характеристик, высушенных на распылительной сушилке образцов, прокультивированных на среде без адсорбента (вариант А)

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

Таблица 12. Сводная таблица характеристик, высушенных на распылительной сушилке образцов, прокультивированных на среде с адсорбентом (вариант Б)

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

Образцы режимов сушки 5 и 13 подвергались наибольшему стрессированию, 4 и 12 – наименьшему. Остальные варианты испытывали промежуточные воздействия температуры и баростресса. Средние диаметры частиц в режимах распылительной сушки 5 и 13 составляли 11-14 мкм. Частицы со средним диаметром 22-26 мкм были получены в режимах 4 и 12 (Рисунок 15).

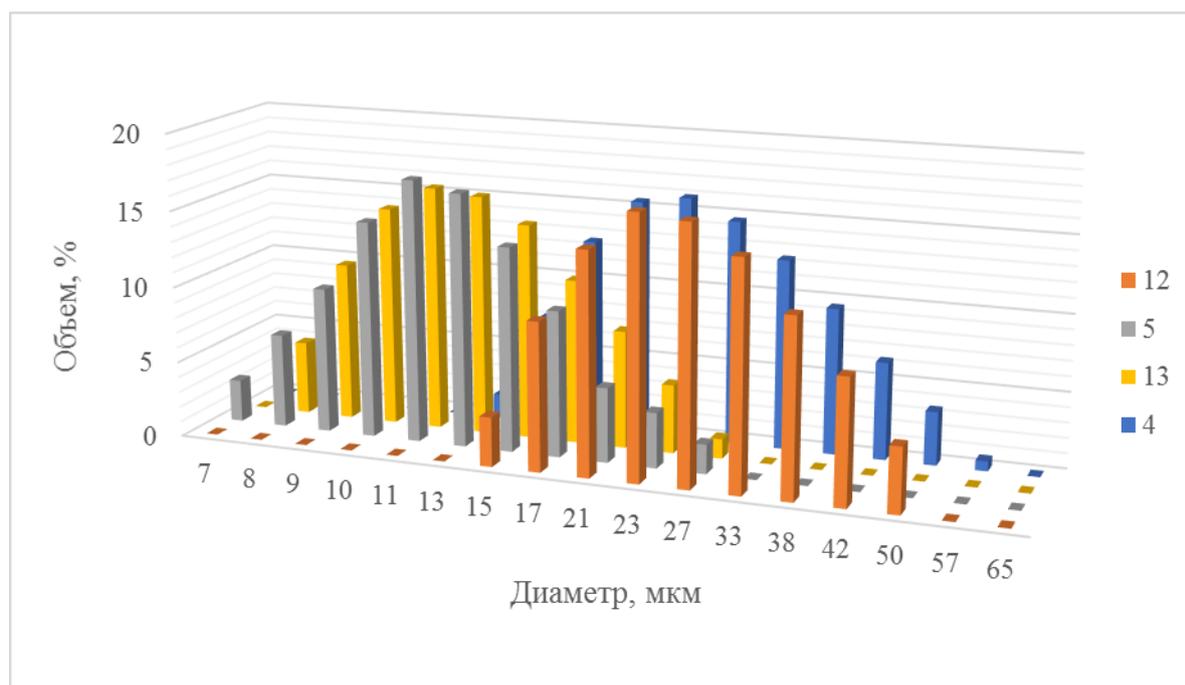


Рисунок 15. Диаграмма распределения частиц по размерам для образцов 4, 5, 12, 13, полученных после распылительной сушки.

Полученные образцы регидратировали в минеральном растворе питательной среды и культивировались на агаризованной и в жидкой средах.

Даже в одной серии высевок на агаризованную среду образцов, подвергшихся температурной обработке (при распылительной сушке) не удавалось подсчитать точное количество выросших колоний, т.к. результаты отличались на несколько порядков или рост колоний отсутствовал. Использование LIVE/DEAD BacLight kit также не давало корректных, сходящихся результатов, возможно, из-за мешающих фрагментов клеток, разрушенных после регидратации. В таком случае в таблицах 11 и 12 отмечены варианты, показывающие хотя бы факт роста колоний в серии опытов без количественной

оценки. Следует отметить, что эти колонии могли вырасти через 2-3 месяца после начала культивирования, а расчетное КОЕ/г биомассы варьировало от 103 до 107. Клетки, выросшие без использования адсорбента (вариант А) и распылительно высушенные, сразу после сушки практически не показывали рост на агаризованной среде. У лиофильно высушенных образцов возможно было подсчитать КОЕ.

Характерные кривые роста распылительно высушенных образцов в жидкой среде приведены на рисунке 16 и имеют ряд особенностей: нарастание оптической плотности и резкое ее падение с последующим возобновлением роста. Это было основным отличием их от лиофильно высушенных образцов.

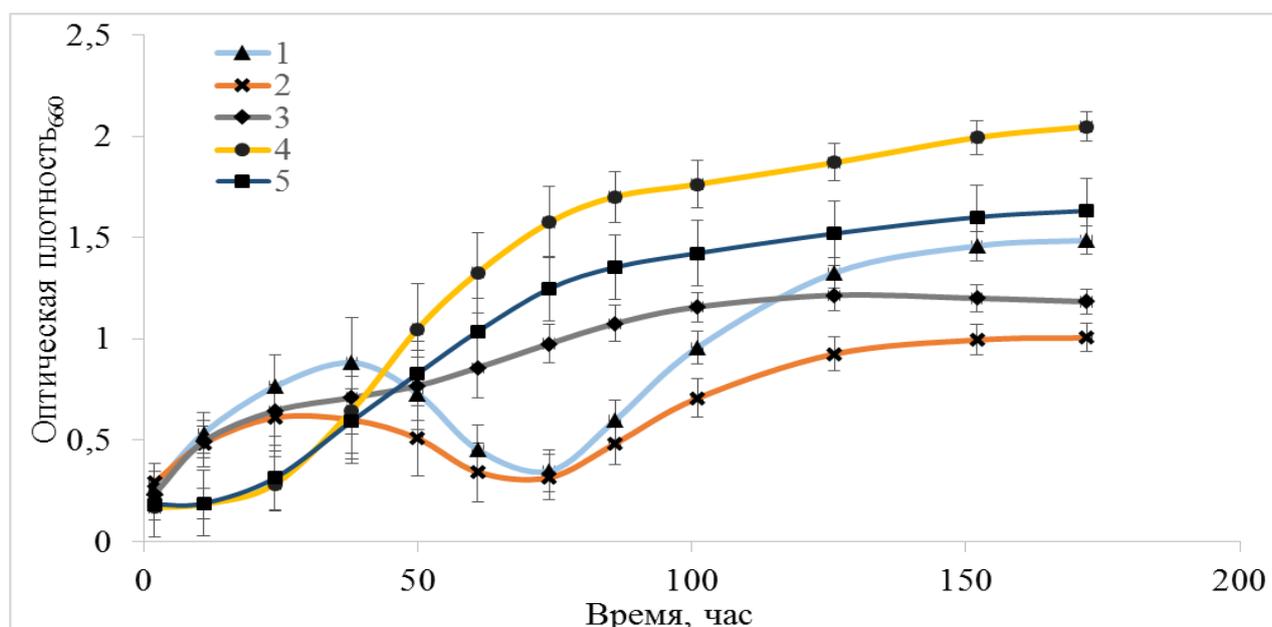


Рисунок 16. Кривые роста для образцов: 1 – образцы, высушенные на распылительной сушке, после культивирования на среде с адсорбентом (вариант Б), 2 – образцы, высушенные на распылительной сушке, после культивирования на среде без адсорбента (вариант А), 3 – лиофильно высушенные образцы, 4 – образцы суспензии жизнеспособных галобактерий после культивирования на среде с адсорбентом (вариант Б), 5 – образцы суспензии жизнеспособных галобактерий после культивирования на среде без адсорбента (вариант А).

Микроскопирование в процессе культивирования показало, что изначально клетки сферической формы делились, а через некоторое время преобразовывались

в палочки. Снижение оптической плотности связано именно с этим процессом. Нарастание оптической плотности на втором участке рисунка связано с делением палочковидных галобактерий, а также с делением и скоростью преобразования оставшихся сферопластов в палочки. В таблицах 11 и 12 (стр 91, 92) приведены значения максимальной удельной скорости роста после наблюдаемого падения оптической плотности. Можно предположить, что эта величина, зависящая также от концентрации метаболитов-ингибиторов в среде, в некоторой мере отражает скорость реактивации культуры. Время локального минимума на кривой оптической плотности также может являться характеристикой реактивации культуры.

3.2.3. Анализ клеточной структуры образцов, высушенных на распылительной сушилке

Фазово-контрастная микроскопия проводилась с фиксацией растворенных в минеральной среде образцов глутаровым альдегидом. Галобактерии в этих условиях не изменяют форму. На рисунке 17 отражена реальная форма клеток в кристалле.

Для представления в настоящей работе здесь и далее выбраны характерные варианты сушки: 4 – мягкий режим сушки, 13 – жесткий среди режимов таблицы 4 (стр. 71). Образцы 4А (сразу после сушки) и 13А (1 год хранения), полученные после распылительной сушки (Таблица 11, стр. 91), прокультивированных без адсорбента галобактерий, содержат как палочки, так и агломераты, и кокки. Лиофильно высушенный образец и 13В (оба – 1 год хранения), полученные после распылительной сушки галобактерий, прокультивированных с адсорбентом (Таблица 12, стр. 92), содержат, в основном, палочки и после 2-х лет хранения при 4⁰С (Рисунок 17).

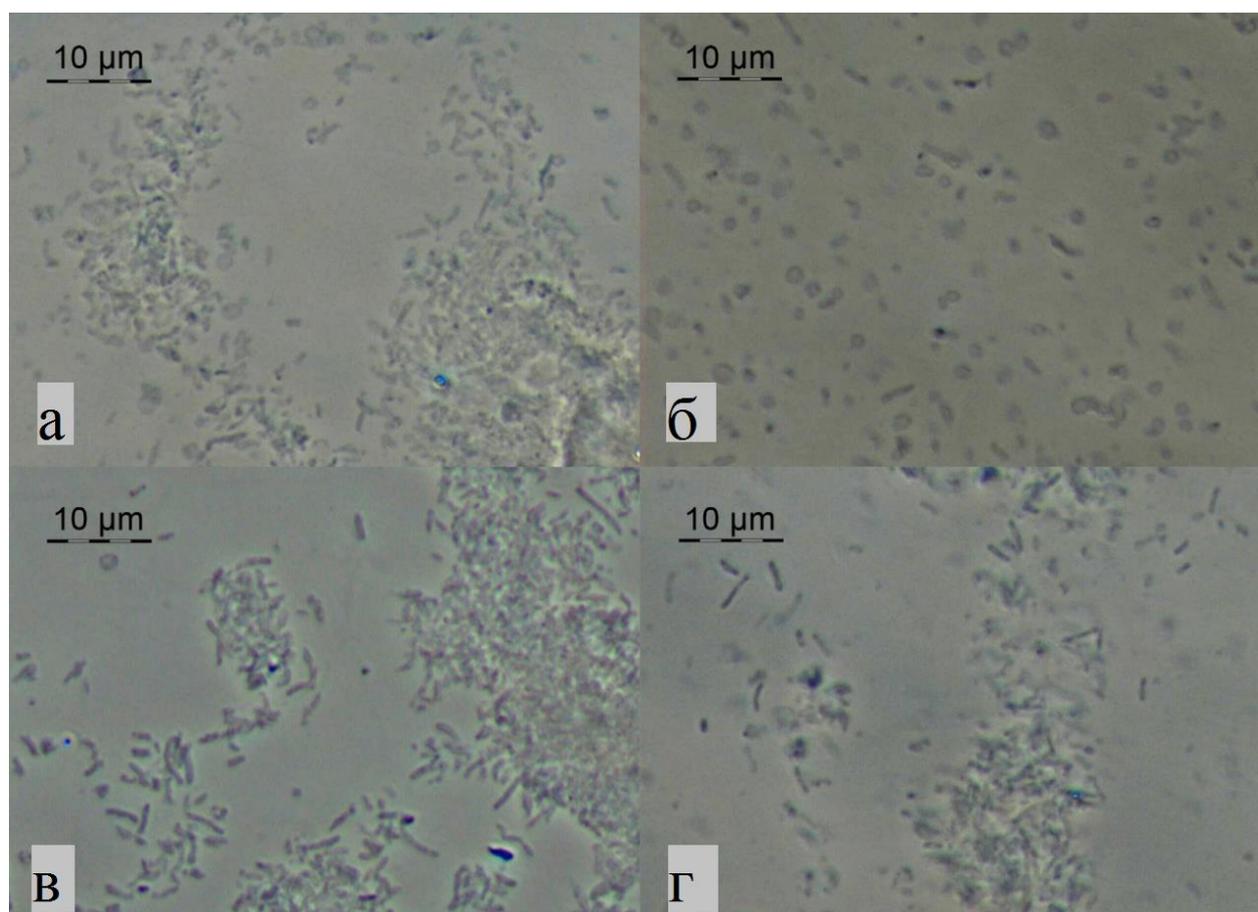


Рисунок 17. Фазово-контрастная микроскопия с фиксацией образцов глутаровым альдегидом: а) 4А – сразу после распылительной сушки; б) 13А – после одного года хранения; в) 13Б – после года хранения; г) сублимационно высушенный образец (культивирование с адсорбентом) – после одного года хранения

При сравнении образцов зафиксированных глутаровым альдегидом сразу после распылительной сушки и хранения значимых изменений в морфологии клеток не отмечено, в то время как клетки без фиксации распадались в минеральной среде для культивирования галобактерий или приобретали сферическую форму.

Сохранность и целостность клеточной цитоплазматической мембраны являлись определяющими факторами жизнеспособности клеток. Механические повреждения, такие как локальный разрыв цитоплазматической мембраны, приводили к гибели микробной клетки. Электронная микроскопия ультратонких срезов клеток, подвергшихся физическим воздействиям при распылительной или

сублимационной сушке, позволила обнаружить повреждения и оценить степень их значимости для каждого способа сушки (Рисунок 18).

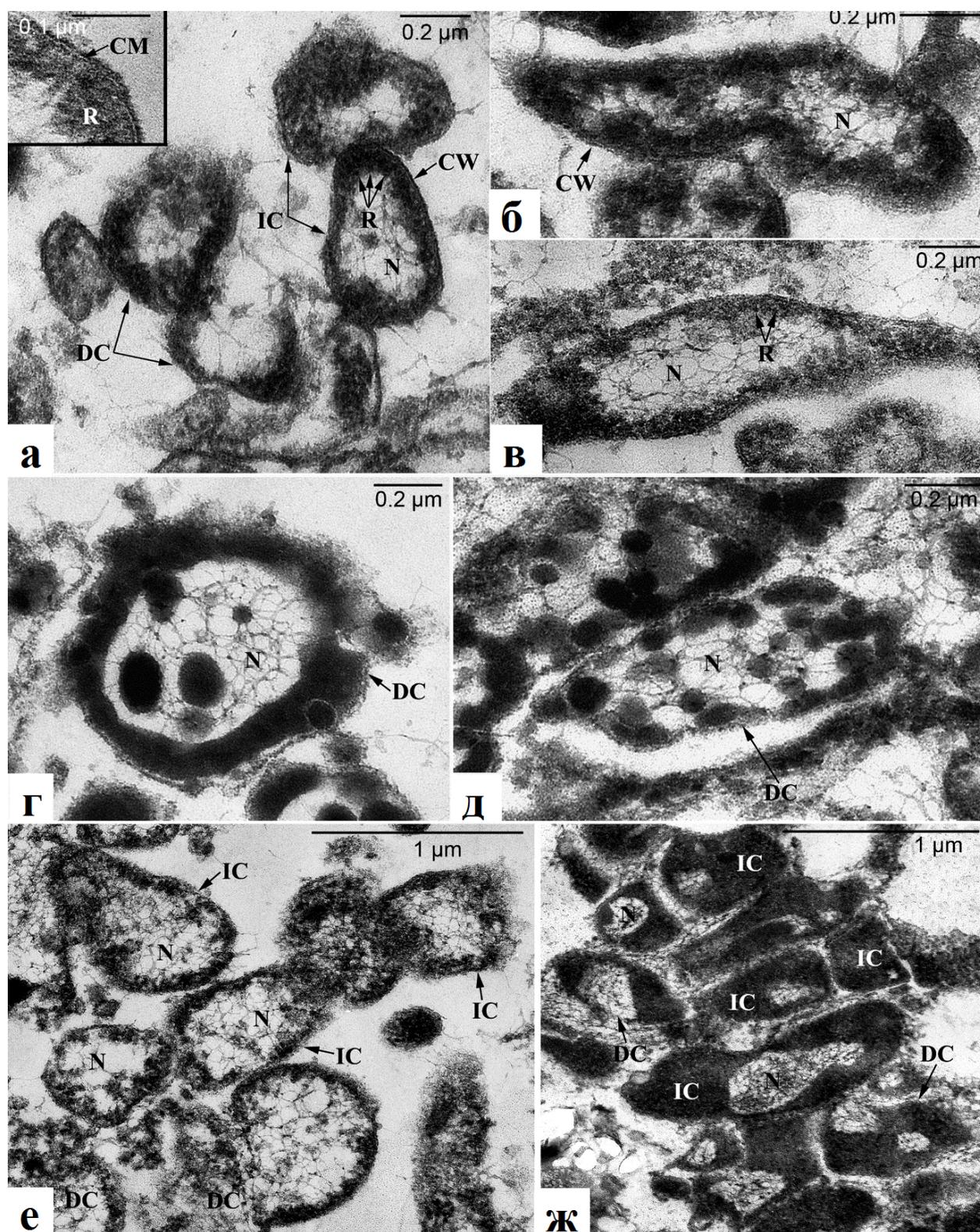


Рисунок 18. Ультратонкие срезы клеток: а-в) 4А – сразу после распылительной сушки; г-д) 13Б – через год хранения; е) 13А – через год хранения; ж) лиофильно высушенный образец (культивирование с адсорбентом) после года хранения. DC – нарушенные клетки, IC –

интактные клетки, N – нуклеоид, CM – цитоплазматическая мембрана, CW – клеточная стенка, R – рибосомы.

Краткая характеристика образцов с рисунка 18.

- Образец 4А непосредственно после распылительной сушки

Интактные клетки характеризовались хорошей сохранностью клеточных стенок (в отличие от всех остальных вариантов). Нуклеоид располагался в центральной части клеток и занимал значительный объем внутриклеточного пространства. Рибосомальный контент находился главным образом на периферии клетки.

Характер повреждений клеток: единичные или множественные разрывы оболочек, сопровождаемые частичным или полным выходом содержимого клетки в межклеточное пространство.

- Образцы 13 после 1 года хранения

Интактные клетки в варианте 13А и 13Б характеризовались истонченной оболочкой, главным образом из-за практически отсутствующей клеточной стенки. На ультратонких срезах редких интактных клеток отчетливо видна их цитоплазматическая мембрана, которая не была повреждена по всему периметру клетки; клеточная стенка практически не выявлялась.

Нуклеоид был расположен в центральной части клетки и занимал значительный объем внутриклеточного пространства. Рибосомальный контент находится главным образом на периферии клетки, как и в варианте 4А.

Характер повреждений клеток: клетки в основном разорваны пополам или на несколько частей, что сопровождалось выбросом содержимого клеток в межклеточное пространство. Значительная часть клеток этого варианта имели локальные единичные или множественные повреждения всей оболочки. Внутрицитоплазматическое содержимое таких клеток было представлено плотным гомогенным слоем на периферии цитоплазмы и/или единичными сферическими, схожими по плотности образованиями в зоне нуклеоида. Таким образом, рибосомальный контент был практически сжат в однородную массу (по-

видимому, в результате воздействия высокого давления направленного изнутри клетки).

- Лиофильно высушенный образец (культивирование с адсорбентом) после 1 года хранения

Клетки находились в конгломератах, внутри которых тесно примыкали друг к другу. Интактные клетки этого варианта в отличие от интактных клеток вариантов 4А и 13 характеризовались значительно меньшим по объему нуклеоидом и обширной, плотной цитоплазмой. Клеточная стенка интактных клеток была очень тонкой и неравномерной по толщине (по сравнению с вариантом 4А).

Характер повреждений клеток: часть клеток в конгломератах имели локальные разрывы в оболочках. В отличие от вариантов 4А и 13 эти повреждения сопровождались выходом ДНК из клеток (аналогично сдавливанию) в узкое (вследствие плотной упаковки клеток в конгломераты) межклеточное пространство.

3.2.4. Хранение высушенных образцов

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, что видно из данных по высевам на агаризованную среду и максимальной удельной скорости роста (μ_{\max}), которая наблюдалась после минимума оптической плотности, приходящегося на 100-110 час. Через 4 месяца хранения при 4⁰С содержание каротиноидов снизилось в образцах А (культивирование на среде без адсорбента) на 14-32%, в образцах Б (культивирование на среде с адсорбентом) на 24-40%, минимум оптической плотности сместился к 65-75 часам, а μ_{\max} выросла на порядок и была больше в образцах Б, достигая в варианте 10Б значения $\mu_{\max}=0,105 \text{ ч}^{-1}$ (Таблицы 11, 12, стр. 91, 92). В целом, реактивация образцов Б происходила лучше; на агаризованной среде высевалось больше А и Б образцов. Хранение в течение 6 приводили к ухудшению характеристик на 10-15%.

При хранении образцов в течение года содержание каротиноидов снизилось на 64-75% в образцах А и на 58-89% в образцах Б. Также на порядок снизились показатели μ_{\max} и высеваемости на агаризованной среде, а минимум оптической плотности варьировался в интервале от 90 до 150 часов культивирования.

Для всех распылительно высушенных в изученных режимах (таблица 4, стр. 71) образцов галобактерий, хранившихся при минимальном содержании влаги и температуре 4⁰С, отмечено улучшение характеристик реактивации после 4 месяцев хранения и ухудшение характеристик реактивации при последующем хранении. Такие данные, с одной стороны, свидетельствуют о процессах репарации повреждений, которые происходят при низкой температуре в кристаллах и малом влагосодержании. С другой стороны, в течение длительного хранения клетки могут отравляться метаболитами.

Прооксидантные свойства среды культивирования [264] заметно повлияли на выработку каротиноидов, и в то же время ухудшили показатели реактивации галобактерий после распылительной сушки и хранения. Галобактерии в распылительно высушенных образцах Б (культивирование на среде с адсорбентом) лучше сохраняли свою структуру при внедрении в кристалл и в некоторых случаях реактивировались на агаризованной среде после 2-х лет хранения.

Можно предположить, что даже при первоначальном устранении метаболитов (при культивировании с адсорбентом) поврежденные и окислившиеся компоненты клеток после распылительной сушки в кристалле негативно влияют на жизнеспособные клетки. Большая концентрация клеток в нашем случае и минимальная, но присутствующая, влажность способствовали контакту метаболитов с клетками. Уменьшение концентрации клеток во всех режимах распылительной сушки (таблица 4, стр. 71) приводило к увеличению срока жизнеспособности галобактерий. В дальнейшем предстоит выяснить, связано это с уменьшением контакта метаболитов с клетками или защитной ролью солей.

Еще одним фактором сохранения жизнеспособности может являться пигментация клеток. С одной стороны, каротиноиды устраняют активные формы кислорода в процессе культивирования, но продукты деградации каротиноидов и других липидов, обладающие прооксидантными свойствами, могут являться одними из метаболитов, негативно влияющими на клетки в кристалле.

Сравнение режимов распылительной сушки также показало важную роль температуры входного сушильного агента, скорости потока сжатого воздуха, скорости подачи биомассы галобактерий и варианта культивирования (А или Б) на выживаемость клеток.

При повторной активации в жидкой среде после 4 месяцев хранения наилучшие характеристиками были отмечены у образцов Б (с удалением метаболитов) при температуре 120 °С (Таблица 12, стр. 92). Пробы 4Б и 12Б были жизнеспособны по факту роста на агаризованных питательных средах после 2 лет хранения при 4 °С со временем реактивации до нескольких месяцев.

Анализ поверхностного отклика, полученного при моделировании искусственной нейронной сети (ИНС), позволил определить следующие оптимальные условия сушки для двух случаев:

1. в случае сушки биомассы, полученной при культивировании на питательной среде без адсорбента (варианты А): температура входного сушильного газа варьировала от 120 до 130 °С; расход сушильного газа от 30 до 31 м³ / ч; расход сжатого воздуха 831 л/час; скорость подачи биомассы 5,7 г/мин;

2. в случае сушки биомассы, полученной при культивировании на питательной среде с адсорбентом (варианты Б): температура входного сушильного газа варьировала от 120 до 135 °С; расход сушильного газа был в пределах от 30 до 31 м³/час; скорость потока сжатого воздуха 831 л/час; скорость подачи биомассы 5 г/мин.

Лиофильная сушка имела, безусловно, менее разрушительное воздействие на каротиноиды, чем распылительная сушка. Содержание каротиноидов в сублимированных образцах после года хранения было аналогично содержанию их в распылительно-высушенном образце после четырех месяцев хранения. Проход

форсунки, распыление частиц, напряжение сдвига и высокие температуры создали набор стрессовых условий, подавляющих клетки и разрушающих биоактивные вещества в распылительно высушенных образцах во время хранения. Для уменьшения механических напряжения сдвига можно использовать дисковую распылительную сушилку. Хранение образцов в темноте в течение всего промежутка времени может также оказать влияние на компенсацию повреждений, причиненных галобактериям. и так как был механизм для легких компенсаций, хранение могло быть оптимизировано. Поскольку у галобактерий существует механизм световой репараций, хранение может быть оптимизировано.

3.2.5 Влияние протекторов на выживаемость галобактерий, высушенных на распылительной сушке

Из литературных данных известно, что добавление различных протекторов при высушивании положительно влияет на выживаемость микроорганизмов. В данной работе для сравнения в качестве протекторов были взяты мальтодекстрин, глюкоза и крахмал в количестве 7% от высушиваемой биомассы. [233, 238]

Продукт, полученный на ферментализатах круп, отличается от продукта, полученного на среде с триптоном, дрожжевым экстрактом и глицерином, большим количеством остаточных углеводов. Причем можно говорить о том, что в случае обработки Протосубтилином ГЗх углеводы в большей мере деполимеризованы, так как данный ферментный препарат обладает соответствующими активностями. Подобная активность не должна наблюдаться у чистой протеазы Protex 40E, соответственно углеводы присутствуют в конечном продукте и могут выступать в качестве протекторов при распылительной сушке.

Полученные результаты показали, что внесение протекторных агентов не оказывало существенного влияния на процесс высушивания и хранения биомассы. Разница в значениях сушки лежит в пределах погрешности. Изменения концентрации протекторов не влияло на сушку.

На основе полученных результатов разработана аппаратная технологическая схема получения готового препарата – биомассы галобактерий *H. salinarum* на ферментолизатах зерновых. (Рисунок 19)

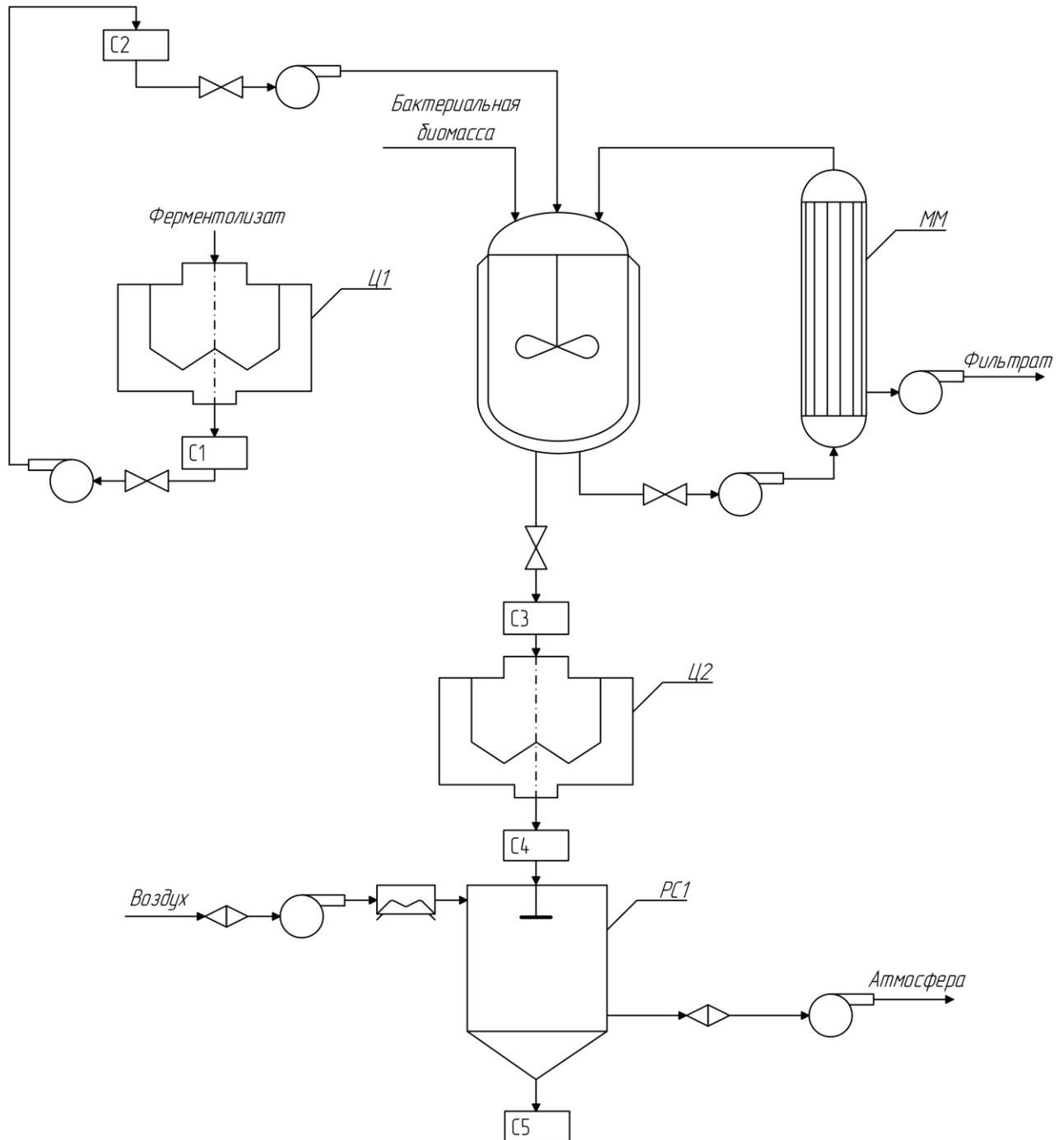


Рисунок 19. Аппаратная схема получения готового продукта - биомассы галобактерий *H. salinarum* на ферментолизатах зерновых. С – сборник, Ц – центрифуга, ММ – мембранный модуль, РС – установка распылительной сушки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе зерна пшеницы, ячменя и кукурузы, предварительно прошедших тепловую обработку, а также обработку ферментными препаратами Протосубтилин ГЗх и Protex 40Е, получены ферментативные гидролизаты, при культивировании на которых галобактерии накапливают биомассу и каротиноиды вдвое лучше, чем на комплексных субстратах, включающих дорогостоящие триптон, пептон, дрожжевой экстракт.

В работе показана роль микроэлементов в собственной протеолитической активности галобактерий, которая способствует более полному усвоению белка зерновых и высокому выходу биомассы.

Культивирование в ферментере с мембранным модулем на ферментативных гидролизатах зерновых с добавлением микроэлементов проходит практически с аналогичными характеристиками, что и при культивировании в колбах. На полученных средах отмечено меньшее ингибирование роста галобактерий, чем на традиционных комплексных субстратах. При экспериментальных условиях предел прироста биомассы составляет 45-48 г/л.

Высушивание биомассы галобактерий *Halobacterium salinarum* было проведено на распылительной сушилке, определены условия распылительной сушки, выявлены диапазоны параметров, приемлемых для сохранения биомассы галобактерий и их биоактивных веществ в солевых гранулах при температуре 4 °С в течение 4-6 месяцев после сушки. В процессе длительного хранения были изучены характеристики клеток галобактерий, инкапсулированных в высушенные частицы.

Установлен факт сохранения активности и восстановления жизнеспособности галобактериальных клеток для высушенных гранул с низким содержанием остаточной влаги до 5% и низкой температурой. Для комплексного описания высушенных образцов предложено использовать биологические характеристики глубинного культивирования, отражающие скорость реактивации клеток. Исследование показало разницу скоростей реактивации при длительном

хранении после сушки образцов, полученных при культивировании с использованием и без использования адсорбента – активированного угля АГЗ, инкапсулированного в агар.

Получены новые данные при сушке клеток галобактерий в критическом и повреждающем режимах при высоких скоростях испарения воды и кристаллизации соли, высоких температурах, механических и окислительных нагрузках.

ВЫВОДЫ

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

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

3. Разработаны режимы культивирования галобактерий в мембранном биореакторе при использовании питательных сред на ферментоллизатах пшеницы и ячменя. За 7 суток культивирования содержание биомассы достигало 46-48 г/л при содержании каротиноидов 29 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П (ВКПМ В-1739) и до 35 мг/ 100 г биомассы для штамма 353П-1 (ВКПМ В-12794).

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

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

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

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

8. Разработаны способ и стадии получения продукта – биомассы галобактерий *Hbt. salinarum* на ферментализатах зерновых.

9. На штамм бактерий *Hbt. salinarum*, используемый для получения бактериальных препаратов, получен патент № РФ 2662996.

10. Получен акт о внедрении разработок на производство.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Michael C. Flickinger. Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. Raleigh, 2010.
2. Oren A. Halophilic microorganisms and their environments. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic Publishers, 2002.
3. Rodriguez-Valera F. Halophilic bacteria. Florida: CRC Press. Boca Raton., 1988.
4. Muthu Manikandan, Lejla Pašić, Vijayaraghavan Kannan. Optimization of growth media for obtaining high-cell density cultures of halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) by response surface methodology // Bioresource Technology. 2009. № 100. P. 3107-3112.
5. Hampp N. A. Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into an optoelectronic material // Appl Microbiol Biotechnol. 2000. №53. P. 633-639.
6. Mohammad Faezi Ghasemi, Abolfath Shodjai-Arani, Nasrin Moazami. Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarium* PTCC 1685 // Process Biochemistry. 2008. № 43. P. 1077–1082.
7. Kevin J. Wise, Nathan B. Gillespie, Jeffrey A. Stuart, Mark P. Krebs, Robert R. Birge. Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic devices // TRENDS in Biotechnology. 2002. № 20. P. 387-394.
8. Thierry Benvegna, Loïc Lemiègre, Sandrine Cammas-Marion. New generation of liposomes called archaeosomes based on natural or synthetic archaeal lipids as innovative formulations for drug delivery // Recent patents on drug delivery & formulation. 2009. № 3. P. 206-220.
9. Babu Prasanti, Chandel Anuj K., Singh Om V. Extremophiles and their applications in medical processes. NY.: Springer, 2014. P. 43.
10. El-Agamey Ali. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties // Archives of biochemistry and biophysics. 2004. № 430. P. 37–48.
11. Современные проблемы химической технологии биологически активных веществ: сб. тр. науч.-практич. конф. / М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2016. № 188. 249-252 с.

12. Калёнов С.В. Культивирование дрожжей и галобактерий в условиях контролируемого окислительного стресса: дис. ... канд. тех. наук. М., 2007. 200 с.
13. Способ получения биомассы галобактерий: пат. 2323226 Рос. Федерация. №2006118729/13; заявл. 30.05.06; опубл. 27.04.08, Бюл. №12. 5 с.
14. Развитие промышленности и повышение её конкурентоспособности [Электронный ресурс]: государственная программа №328 от 15.04.2014. Доступ из Zimport.ru (официальный сайт импортозамещения в России).
15. Gibreel A., Sandercock J. R., Lan J., Goonewardene L. A., Zijlstra R. T., Curtis J. M., Bressler Gibreel D. C. Fermentation of barley by using *Saccharomyces cerevisiae*: examination of barley as a feedstock for bioethanol production and value-added products // Applied and environmental microbiology. 2009. № 75. P. 1363-1372.
16. Kedia G., Wang R., Patel H., Pandiella S. S. Use of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties // Process biochemistry. 2007. № 42. P. 65-70.
17. De Valdez G. F., Gerez C. L., Torino M. I., Rollán G. New trends in cereal-based products using lactic acid bacteria // Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications. – NY.: Wiley-Blackwell, 2010. P. 352.
18. Goldberg I. Single cell protein. NY.: Springer science & business media, 2013. P. 190.
19. Evers A. D., O'Brien L., Blakeney A. B. Cereal structure and composition // Australian journal of agricultural research. 1999. № 50. P. 629-650.
20. Protein concentrate and an aqueous stream containing water-soluble carbohydrates: pat. US9226515B2 USA; priority date 03.02.2004; publication 05.01.2016.
21. Дашковский И. Зерно на пользу // Агротехника и технологии. 2012. № 5.
22. Wang Y. Hydrothermally generated aromatic compounds are consumed by bacteria colonizing in Atlantis II Deep of the Red Sea // ISME J. 2011. №5. P. 1652-1659.
23. Quillaguaman J., Hatti-Kaul R., Mattiasson B., Alvarez M. T., Delgado O. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkaliotolerant, moderate halophile isolated from

- soil around a Bolivian hypersaline lake // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2004. №54. P. 721.
24. Javor B. Hypersaline Environments. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
 25. DasSarma S., DasSarma P. Halophiles. Baltimore: University of Maryland, 2012. P. 1-11.
 26. Gwynn, J.W. Great Salt Lake: An Overview of Change// Utah: Utah Department of Natural Resources. – 2002.
 27. Abu Ghazleh S., Abed A.M., Kempe S. The dramatic drop of the dead sea: background, rates, impacts and solutions In: Badescu V and Cathcart RB (eds) // Macro-engineering Sea- water in Unique Environments. 2011. P. 77–105.
 28. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity // Aquatic Biosystems. 2008. № 4. P. 2.
 29. Ник Лейн. Вопрос жизни. Энергия, эволюция и происхождение сложности. М.: АСТ: CORPUS, 2018.
 30. DasSarma S., Coker J.A., DasSarma P. // Encyclopedia of Microbiology, 2Ed. Oxford, UK.: Elsevier, 2008. P. 118.
 31. Oren A. Salts and brines // Ecology of cyanobacteria II. – Durham: Springer, 2012. – P. 401-427.
 32. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2002. № 28(1). P. 56–63.
 33. Widdel F. The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Springer, 1992.
 34. Rainey F., Zhilina T., Boulygina E. The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of *Haloanaerobiales* ord. nov., *Halobacteroidaceae* fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level // Anaerobe. 1995. № 1. P. 185-199.
 35. Arahall D., Ventosa A. The family *Halomonadaceae* // The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria – 3rd edition. – NY.: Springer, 2006. - Vol. 6. P. 811-835.

36. Gonzalez N. A., Va'zquez A., Ortiz Zuazaga H. G. Genome-wide expression profiling of the osmoadaptation response of *Debaryomyces hansenii* // *Yeast*. 2009. № 26. P.111–124.
37. Lenassi M., Vaupotic T., Gunde-Cimerman N., Plemenitas A. The MAP kinase HwHog1 from the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*: coping with stresses in solar salterns // *Saline Systems*. 2007. № 3. P. 3.
38. Woese C. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990. № 87. P. 4576-4579.
39. Larson C., Belovsky G. Salinity and nutrients influence species richness and evenness of phytoplankton communities in microcosm experiments from Great Salt Lake, Utah, USA // *Journal of plankton research*. 2013. № 5. P. 1154 – 1166.
40. Khomyakova M., Bu'kmez O., Thomas L. K., Erb T.J., Berg I. A. A methylaspartate cycle in haloarchaea // *Science*. 2011. №331. P.334–337.
41. Sato T., Atomi H. Novel metabolic pathways in Archaea // *Current opinion in microbiology*. 2011. №14. P.307–314.
42. Ng W. V. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. № 97. P 12176-12181.
43. Muller J. A., DasSarma S. Genomic analysis of anaerobic respiration in the archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: dimethyl sulfoxide and trimethylamine Noxide as terminal electron acceptors // *Journal of Bacteriology*. 2005. №187. P. 1659-1667.
44. Лобырева Л. Б., Фельдман Р. С., Плакунов В. К. // *Микробиология*. 1987. № 56. Вып. 1. С. 16-20.
45. Roberts M.F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // *Saline Systems*. 2005. № 1. P. 5-30.
46. Crowley D.J., Boubriak I., Berquist B.R. The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Halobacterium* sp. NRC-1 // *Saline Systems*. 2006. №2. P. 1-11.
47. Dundas I., Larsen H. A study on the killing by light of photosensitized cells of *Halobacterium salinarium* // *Archiv für Mikrobiologie*. 1963. № 1. P. 19-28.

48. Rivera S., Canela-Garayoa R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials // *Journal of Chromatography A*. 2012. № 1224. P. 1-8.
49. Rodrigo-Banos M. Carotenoids from *Haloarchaea* and their potential in biotechnology // *Marine Drugs*. 2015. № 9. P. 5508–5532.
50. Jehlicka J., Oren A. Raman spectroscopy in halophile research // *The Proceedings from Halophiles*. 2013. № 4. – P. 6.
51. Tanaka T., Shnimizu M., Moriwaki H. Cancer chemoprevention by carotenoids // *Molecules*. 2012. № 3. P. 3202-3242.
52. Kelly M., Norgard S., Liaaen-Jensen S. Bacterial carotenoids. XXXI. C₅₀-carotenoids. Carotenoids of *Halobacterium salinarium*, especially bacterioruberin // *Acta Chemica Scandinavica*. 1970. № 2. P. 2169-2182.
53. Kushwaha S., Kramer J., Kates M. Isolation and characterization of C₅₀-carotenoid pigments and other polar isoprenoids from *Halobacterium cutirubrum* // *BBA*. 1975. № 398. P. 303-314.
54. Dummer M., Jessica C. Bonsall, Jacob B. Cihla, Stephanie M. Lawry, Gabriela C. Johnson, Ronald F. Peck. Bacterioopsin-mediated regulation of bacterioruberin biosynthesis in *Halobacterium salinarum* // *Journal of bacteriology*. 2011. P. 5658–5667.
55. Скулачев В.П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии. М.: Высшая школа, 1989. 564 с.
56. Altoè P., Cembran A., Olivucci M., Garavelli M. Aborted double bicycle-pedal isomerization with hydrogen bond breaking is the primary event of bacteriorhodopsin proton pumping // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2010. № 23. P. 20172-20177.
57. Kamikubo H., Kataoka M. Can the low-resolution structures of photointermediates of bacteriorhodopsin explain their crystal structures? // *Biophysical journal*. 2005. № 88. P. 1925-1931.
58. Кошкарева К. А., Каленов С.В. Характеристика основного компонента экстремального галофильного сообщества из кристаллов соли озера Аликес –

перспективного продуцента каротиноидов // Успехи в химии и химической технологии. 2016. №9. С. 23-24.

59. Bestvater T., Louis P., Galinski E.A. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: bypassing the metabolic bottleneck // Saline Systems. 2008. V. 4. № 12. P. 1-12.

60. Edge R., McGarvey D., Truscott T. The carotenoids as anti-oxidants—a review // Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology. 1997. V. 41. № 3. P. 189-200.

61. Madigan M., Oren A. Thermophilic and halophilic extremophiles // Current opinion in microbiology. 1999. P. 265-269.

62. Gulik A. Tetraether lipid components from a thermoacidophilic archaeobacterium: chemical structure and physical polymorphism // Journal of molecular biology. 1988. № 201. P. 429-435.

63. Lanyi J.K. Bacteriorhodopsin // Annual review of physiology. 2004. № 66. P. 665–688.

64. Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка: курс лекций М.: КДУ, 2012. 524 с.

65. Henderson R., Unwin P.N. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy // Nature. 1975. № 257. P.28–32.

66. Bibikov S. I., Grishanin R. N., Kaulen A. D., Marwan W., Oesterhelt D., Skulachev V. P. Bacteriorhodopsin is involved in halobacterial photoreception // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1993. № 90. P. 9446–9450.

67. Бесхлорофилльный фотосинтез. Принцип работы бактериородопсина. [Электронный ресурс] // Wikimedia commons: [сайт]. [2014]. URL: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Бактериородопсин.gif> (дата обращения: 15.09.2018).

68. Иваницкий Г.Р. Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации: сборник научных трудов / Пушино: ИЦБИ, 1985. 209 с.

69. Hough D. W., Dough M. J. Extremozymes // Current opinion in chemical biology. 1999. № 3. P. 39-46.
70. Van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes // Current opinion in microbiology. 2003. № 6. P. 213–218.
71. Robinson J. L., Pyzyna B., Atrasz R. G., Henderson C. A., Morrill K. L., Burd A. M., Desoucy E., Fogleman R. E., Naylor J. B., Steele S. M., Elliott D. R., Leyva K. J., Shand R. F. Growth kinetics of extremely halophilic archaea (family *Halobacteriaceae*) as revealed by Arrhenius plots // J. Bacteriol. 2005. № 187. P. 923–929.
72. Vijayanand S., Hemapriya J., Selvin J, Kiran S. Operational stability and reusability of *Halobacterium* sp. JS1 cells immobilized in various matrices for haloalkaliphilic protease production // International Journal of Microbiological Research. 2012. № 3. P. 1-6.
73. Balasubramanian S., Pal S., Bagchi B. Hydrogen-bond dynamics near a micellar surface: origin of the universal slow relaxation at complex aqueous interfaces // Physical review letters. 2002. P. 12.
74. Dym O., Mavaerech M., Sussman J. L. Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an *Archaeobacterium* // Science. 1995. № 267. P. 1344–1346.
75. Britton K. L., Baker P. J., Fisher M., Ruzheinikov S., Gilmour D. J., Bonete M. J., Ferrer J., Pire C., Esclapez J., Rice D. W. Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. № 103. P. 4846–4851.
76. Flam F. The chemistry of life at the margins // Science. 1994. №. 265. P. 471-472.
77. Lanyi J., Stevenson J. Effect of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase // Journal of bacteriology. 1969. №. 98. P. 611-616.
78. Usami R., Fukushima T., Mizuki T., Yoshida Y., Inoue A., Horikoshi K. Organic solvent tolerance of halophilic archaea, *Haloarcula* strains: effects of NaCl concentration on the tolerance and polar lipid composition // J. Biosci. Bioeng. 2005. № 99. P. 169–174.

79. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.* 1991. № 280. P. 309–316.
80. Henrissat B., Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases // *Biochem. J.* 1996. № 316. P. 695–696.
81. DasSarma P. Halophiles, Industrial Applications // *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. – Raleigh, 2010. – V. 7. P. 1–10.
82. Good W. A., Hartman P. A. Properties of the amylase from *Halobacterium halobium* // *J Bacteriol.* 1970. № 104. P. 601–603.
83. Kobayashi T., Kanai H., Hayashi T., Akiba T., Akaboshi R., Horikoshi K. Haloalkaliphilic maltotriose-forming α -amylase from the archaeobacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36 // *J. Bacteriol.* 1992. № 174. P. 3439–3444.
84. Pérez-Pomares F., Bautista V., Ferrer J., Pire C., Marhuenda-Egea F. C., Bonete M. J. α -amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* // *Extremophiles*. 2003. № 7. P. 299–306.
85. Fukushima T., Mizuki T., Echigo A., Inoue A., Usami R. Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a haloarcheon, *Haloarcula* sp. strain S-1 // *Extremophiles*. 2005. № 9. P. 85–89.
86. Giordano A., Andreotti G. Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides // *Biotechnology*. 2006. № 1. P. 511–530.
87. Agarase enzyme system from alteromonas strain 2–40: pat. 5,418,156 U.S.
88. Waino M., Ingvorsen K. Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis* // *Extremophiles*. 2003. № 7. P. 87–93.
89. Bhatnagar T., Boutaiba S., Hacene H., Cayol J.-L., Fardeau M.-L., Ollivier B., Baratti J. C. Lipolytic activity from halobacteria: screening and hydrolase production // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. № 248. P. 133–140.
90. Boutaiba S., Bhatnagar T., Hacene H., Mitchell D. A., Baratti J. C. Preliminary characterization of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. // *J. Mol. Cat. B.: Enzymatic*. 2006. № 41. P. 21–26.

91. Muller-Santos M., de Souza E. M., Pedrosa F. D., Mitchell D. A., Longhi S., Carriere F., Canaan S., Krieger N. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. № 1791. P. 719–729.
92. Camacho R. M., Mateos-Díaz J. C., Diaz-Montaña D. M., González-Reynoso O., Córdova J. (2010) Carboxyl ester hydrolases production and growth of a halophilic archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1 // *Extremophiles*. 2010. № 14. P. 99–106.
93. Rinaldi R., Pompa P. P., Maruccio G., Biasco A., Visconti P., Pisignano D., Blasi L., Sgarbi N., Krebs B., Cingolani R. Self-assembling of proteins and enzymes at nanoscale for biodevice applications // *Nanobiotechnology*. 2004. № 151. P. 101–108.
94. Engel P. C., Paradisi F. Novel enzymes for biotransformation and resolution of amino acids // *Comprehensive natural products chemistry II chemistry and biology*. – Oxford: Elsevier, 2010. – V. 5. P. 71–90.
95. Bolivar J. M., Cava F., Mateo C., Rocha-Martin J., Guisan J. M., Berenguer J., Fernandez-Lafuente R. Immobilization-stabilization of new recombinant glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophiles* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. № 80. P. 49–58.
96. Munawar N., Paul C. Engel overexpression in a non-native halophilic host and biotechnological potential of NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Halobacterium salinarum* strain NRC-36014 // *Extremophiles*. 2012. № 16. P. 463–476.
97. Amoozegar M.A., Fatemi Z.A., Karbalaei-Heidari H. R., Razavi M.R. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF- 2004 // *Microbial. Res.* 2007. № 162. P. 369-377.
98. Karbalaei-Heidari H.R., Amoozegar M.A., Ziaee A.A. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium // *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. № 36. P. 21-27.
99. Norberg P., Hofsten B. V. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria // *J. Gen. Microbiol.* 1969. № 55. P. 251–256.
100. Izotova L., Strongin A. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium* // *Journal of bacteriology*. 1983. V. 155. № 2. P. 826-830.

101. Ryu K., Kim J., Dordick J. S. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile // *Enz. Microbiol. Technol.* 1994. № 16. P. 266–275.
102. Kim J., Dordick J. S. Unusual salt and solvent dependence of a protease from an extreme halophile // *Biotechnol. Bioeng.* 1997. № 55. P. 471–479.
103. Kamekura M., Seno Y. A halophilic extracellular protease from a halophilic archaeobacterium strain 172 P1 // *BioChem. Cell. Biol.* 1990. № 68. P. 352–359.
104. Kamekura M., Seno Y., Dyall-Smith M. Halolysin R4, a serine proteinase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*; gene cloning, expression and structural studies // *Biochimica et Biophysica Acta.* 1996. № 1294. P. 159–167.
105. Stepanov V. M., Rudenskaya G. N., Revina L. P., Gryaznova Y. B., Lysogorskaya E. N., Filippova I. Y., Inova I. I. A serine proteinase of an archaeobacterium *Halobacterium mediterranei* // *Biochem. J.* 1992. № 285. P. 281–286.
106. Mevarech M., Frolow F., Gloss L. M. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt // *Biophys. Chem.* 2000. № 86. P. 155–164.
107. Vidyasagar M., Prakash S., Litchfield C. D, Sreeramulu K. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101 // *Archaea.* 2006. № 2. P. 51–57.
108. Shi W., Tang X.-F., Huang Y., Gan F., Tang B., Shen P. An extracellular halophilic protease SptA from a halophilic archaeon *Natrinema* sp. J7: gene cloning, expression and characterization // *Extremophiles.* 2006. № 10. P. 599–606.
109. Seitz K. H., Studdert C., Sanchez J., De Castro R. Intracellular proteolytic activity of the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. Effect of starvation // *J. Basic. Microbiol.* 1997. № 37. P. 313–322.
110. Antón J., Meseguer I., Rodríguez-Valera F. Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. № 54. P. 2381–2386.

111. Hezayen F. F., Rehm B.H., Eberhardt R., Steinbüchel A. Polymer production by two newly isolated extremely halophilic Archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. № 54. P. 319–325.
112. Fernandez-Castillo R., Rodriguez-Valera F., Gonzalez-Ramos J., Ruiz-Berraquero F. Accumulation of poly(β -hydroxybutyrate) by halobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 1986. № 51. P. 214–216.
113. Don T.-M., Chen C.W., Chan T.-H. Preparation and characterization of the poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei* // *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* 2006. № 17. P. 1425–1438.
114. Li Y., Xiang H., Liu J., Zhou M., Tan H. Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092 // *Extremophiles.* 2003. № 7. P. 401–407.
115. Stubbe J., Tian J., He A., Sinskey A. J., Lawrence A. G., Liu P. Non-template-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoates synthetases as a paradigm // *Ann. Rev. Biochem.* 2005. № 74. P. 433–480.
116. Lu Q., Han J., Zhou L., Zhou J., Xiang H. Genetic and biochemical characterization of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei* // *J. Bacteriol.* 2008. № 190. P. 4173–4180.
117. Han J., Lu Q., Zhou L., Zhou J., Xiang H. Molecular characterization of the phaECHm genes, required for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. № 73. P. 6058–6065.
118. Han J., Lu Q., Zhou L., Liu H., Xiang H. Identification of the polyhydroxyalkanoate (PHA)-specific acetoacetyl coenzyme A reductase among multiple FabG paralogues in *Haloarcula hispanica* and reconstruction of the PHA biosynthetic pathway in *Haloferax volcanii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. № 75. P. 6168–6175.
119. Rehm B. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles // *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2007. № 9. P. 41–62.

120. Cameotra S. S., Makkar R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998. № 50. P. 520–529.
121. Kebbouche-Gana S., Gana M. L., Khemili S., Fazouane-Naimi F., Bouanane N. A., Penninckx M., Hacene H. Isolation and characterization of halophilic archaea able to produce biosurfactants // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009. № 36. P. 727–738.
122. Formation of stable liposomes from lipid extract of archaeobacteria (archaea): patent US5,989,587 US. 1999.
123. Marhuenda-Egea F. C., Piera-Velázquez S., Cadenas C., Cadenas E. Reverse micells in organic solvents: a medium for the biotechnological use of extreme halophilic enzymes at low salt concentration // *Archaea.* 2002. № 1. P. 105–111.
124. D'Souza S. E., Altekar W., D'Souza S. F. Immobilization of *Haloferax mediterranei* aldolase by cross-linking in a proteinic matrix: stability and halophilic characteristics // *J. Microbiol. Biotechnol.* 1997. № 13. P. 561–564.
125. ATP synthesizing device: patent JP4088995 (A) Japanese. 1992.
126. Litchfield Carol D. Potential for industrial products from the halophilic Archaea // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011. № 38. P. 1635–1647.
127. Torreblanca M., Meseguer I., Ventosa A. Production of halocin is a practically universal feature of archaeal halophilic rods // *Lett. Appl. Microbiol.* 1994. № 19. P. 201–205.
128. Meseguer I., Torreblanca M., Konishi T. Specific inhibition of the halobacterial Na⁺/H⁺ antiporter in halosin H6 // *J. Biol. Chem.* 1995. № 270. P. 6450–6455.
129. Lequerica J. L., O'Connor J. E., Such L., Alberola A., Meseguer I., Dolz M., Torreblanca M., Moya A., Colom F., Soria B. A halocin acting on Na⁺/H⁺ exchanger of haloarchaea as a new type of inhibitor in NHE of mammals // *J. Physiol. Biochem.* 2006. № 62. P. 253–262.
130. O'Connor E. M., Shand R. F. Halocins and sulfolobicins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2002. № 28. P. 23–31.
131. Кирица Е. Направленный синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования: дис. ... доктора биологии. Кишинев, 2005. 129 с.

132. Беркер М.Е., Лиепиеньш Г.К., Райпулис Е.П. Биотехнология. Москва, 1990.
133. Wolfe G. R., Cunningham F. X., Durnford D., Green B. R., Gantt E. (1994) Evidence for a common origin of chloroplasts with light-harvesting complexes of different pigmentation // *Nature*. 1994. № 367. P. 566-568.
134. Азизова О. Галофильные бактерии - новый источник биологически активных веществ // *Косметика и медицина*. 2000. № 3. С. 33-37.
135. Бактион [Электронный ресурс]: Инструкция к применению / Электронные текстовые данные. [2017]. URL: https://n4.biz/products/-/products/item_details/83490789_БАКТИОН (дата обращения: 16.03.2018)
136. Socaciu C. Food colorants: chemical and functional properties // *Food colorants. Chemical and functional properties*. – CRC Press, 2007.
137. März U. The global market for carotenoids // *BCC Research*, 2008.
138. Rudic V., Gudumac V., Popovici M. Fotobiotehnologia - realizări noi în medicină. Chişinău, 1995. P. 206.
139. Букин В.Н. Природные антиоксиданты в профилактике рака желудка // *Врач*. 1997. № 5. С. 29-32.
140. Black H. Radical interception by carotenoids and effects on UV cancerogenesis // *Nutr. Cancer*. 1998. № 31. P. 212-217.
141. Fortes C., Forastiere F., Agabiti N. The effect of zinc and vitamin A supplementation on immune response in an older population // *J.Am. Geriatr. Soc*. 1998. № 46. P. 19-26.
142. Young Andrew J., Gordon M. Lowe. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids // *Arch. Biochem. And Biophys*. 2001. № 1. P. 20-27.
143. Patent US6936459B1 USA, Classification C12N1/12. Medium for the production of betacarotene and other carotenoids from *Dunaliella salina* (ARL 5) and a strain of *dunaliella salina* for production of carotenes using the novel media/ Nidamangala Srinivasa Venkatesh, Rajagopal Balaji, Parthasarathy Satnyamurthy; Priority date 11.11.1999; Publication 30.08.2005

144. Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma* method for their cultivation and their use in animal feeds: patent EP0708604A1 USA. Priority date 19.04.1993; Publication 14.11.1995.
145. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response // *Physiologia Plantarum*. 2000. № 108. P. 111-117.
146. Pelah D., Sintov A., Cohen E. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2004. № 20. P. 483–486.
147. Calo P., Miguel T. Ketocarotenoids in halobacteria: 3-hydroxy-echinenone and trans-astaxanthin // *Journal of Applied Microbiology*. 1995. № 79. P. 282-285.
148. Asker D., Ohta Y. Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria // *Journal of bioscience and bioengineering*. 1999. № 88. P. 617-621.
149. Asker D., Ohta Y. Production of canthaxanthin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction // *Applied microbiology and biotechnology*. 2002. № 58. P. 743-750.
150. Shand R. S., Betlach M. C. Expression of the bop gene cluster of *Halobacterium halobium* is induced by low oxygen tension and by light // *Journal Bacteriology*. 1991. № 173. P. 9.
151. Young S. U., Joon T. P., Sang Y. L., Ho N. C. The effects of glycerol and growth conditions on the production of bacteriorhodopsin by *Halobacterium halobium* R1 // *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 1997. № 3. P. 13.
152. Birge R. R. Photophysics and molecular electronic applications of the rhodopsins // *Annual Review of Physical Chemistry*. 1990. № 41. P.683-733.
153. I Межрегиональный семинар «Нанотехнологии и фотонные кристаллы»: материалы / Йошкар-Ола: Изд-во Техномаш, 2003. С. 166-177.
154. Popp A., Wolperdinger M., Hampp N., Bruchle C., Oesterhelt D. Photochemical conversion of the O-intemiediate to 9-cis-retinal- containing products in bacteriorhodopsin films // *Biophys. J.* 1993. № 65. T. 4. P. 1449-1459.

155. Skladnev D. A., Egorova T. A. Stable isotopes labeled bacteriorhodopsin for computers / Тезисы VII Международной Конференции по ретинальсодержащим белкам. Израиль: Зихрон Яков, 1997. P. 207.
156. Edited by Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health. Switzerland, 2009.
157. Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека. Российск. национальная научно-практ. конф. (Смоленск, 19-22 сентября 2001 г.): сб. трудов / Смоленск, 2001. С.30-32.
158. Kates M., Kushwaha S. C. Isoprenoids and polar lipids of extreme halophiles // Archaea: A Laboratory Manual – Halophiles. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1995 – P. 35–54.
159. Wiseman A. Topics in enzyme and fermentation biotechnology // Biochemical Education. 1985. V. 5. № 3. P. 65.
160. Oksanen T., Pere J., Paavilainen L. Treatment of recycled kraft pulps with *Trichoderma reesei* hemicellulases and cellulases // Journal of Biotechnology. 2000. № 78. P. 39–48.
161. Holmes M., Scopes R., Moritz R. Purification and analysis of an extremely halophilic β -galactosidase from *Haloferax alicantei* // Biochimica et Biophysica Acta. 1997. № 1337. P. 276–286.
162. Rose R., Brüser T. Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway // Molecular Microbiology. 2002. № 45. P. 943–950.
163. Schinzel R., Burger K. A site-specific endonuclease activity in *Halobacterium halobium* // FEMS microbiology letters. 1986. № 37. P. 325-329.
164. Qvist J., Ortega G., Tadeo X. Hydration dynamics of a halophilic protein in folded and unfolded states // The Journal of Physical Chemistry. 2012. № 116. P. 3436–3444.
165. Li X., Yu H. Halostable cellulase with organic solvent tolerance from *Haloarcula* sp. LLSG7 and its application in bioethanol fermentation using agricultural wastes // Journal of industrial microbiology & biotechnology. 2013. № 40. P. 1357–1365.

166. Lee S. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria // Trends in Biotechnology. 1996. № 14. P. 31-38.
167. Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants.// Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. № 53. P. 495–508.
168. Kulichevskya I. S., Milekhina E. I., Borzenkov I. A., Zvyagintseva I. S., Belyacv S. S. (1992) Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacterial // Microbiology. 1992. № 60. P. 596–601.
169. Nicholson C., Fathepure B. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions // Applied and environmental microbiology. 2004. № 70. P. 1222–1225.
170. DasSarma S., Arora P. Genetic analysis of the gas vesicle gene cluster in haloarchaea // FEMS Microbiology Letters. 1997. № 153. P. 1-10.
171. Bonete M. J. Nitrogen metabolism in haloarchaea // Saline systems. 2008. № 4. P.9.
172. Wael S. M. El-Sayed., Shinichi Takaichi, Haruo Saida, Masahiro Kamekura, Mohamed Abu-Shady, Humitake Seki, Tomohiko Kuwabara. Effects of light and low oxygen tension on pigment biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, revealed by a novel method to quantify both retinal and carotenoids // Plant and Cell Physiology. 2002. № 43. P. 379–383.
173. Larsen H. Biochemical aspects of extreme halophilism // Advan.Microbiol. 1967. № 1. P. 97-132.
174. Jnishi H., McCance M. E., Gibbons N. E. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria // Canad. J. Microbiol. 1965. № 1365. P. 365-373.
175. Мурзина Е. Д., Нагаева В. Е., Калёнов С. В. Культивирование галобактерий *Halobacterium salinarum* 353П на синтетических средах // Успехи в химии и химической технологии. 2016. № 30. С. 25-27.
176. Fendrich C. *Halovibrio variabilis* gen. nov. sp. nov., *Pseudomonas halophila* sp. nov. and a new halophilic aerobic coccoid *Eubacterium* from Great Salt Lake, Utah, USA // Systematic and Applied Microbiology. 1988. № 11. P. 36-43.

177. Brown K. J., Gibbons N. E. The effect of magnesium, potassium and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria // *Canad. J. Microbiol.* 1955. № 1. P. 486-494.
178. Katznelson H., Lochhead A. G. Growth factor requirement of halophilic bacteria // *Can. J. Research.* 1952. № 64. P. 97-103.
179. Второй Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 10-14 ноября 2003): материалы / М.: Изд-во ЗАО «ПИК "Максима», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2009. 536 с.
180. Grey V. L., Fitt P. S. An improved synthetic growth medium for *Halobacterium cutirubrum* // *Can. J. Microbiol.* 1976. № 22. P. 440-442.
181. Mosin O., Ignatov I. Biosynthesis of photochrome transmembrane protein bacteriorhodopsin of *Halobacterium halobium* labeled with deuterium at aromatic amino acids residues of 2,3,4,5,6-²H₅]Phe, [3,5-²H₂]Tyr and [2,4,5,6,7 -²H₅]Trp // *Chemistry and Materials Research.* 2014. № 6. P.
182. Rawal N., Kelkar S., Altekar W. Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacterial // *Indian J. Biochem. Biophys.* 1988. V. 6. № 25. P. 674-86.
183. Johnsen U., Selig M., Xavier K. Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus* // *Arch. Microbiol.* 2001. № 175. P. 52–61.
184. Johnsen U., Schönheit P. Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* // *Journal of bacteriology.* 2004. V. 186. № 18. P. 6198–6207.
185. Kalenov S. V., Baurina 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.
186. Huang T.-Y., Duan K.-J., Huang S.-Y., Chen C.W. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. № 33. P. 701–706.

187. Koller M., Hesse P., Bona R., Kutschera C., Atlit A., Braunegg G. Potential of various Archae- and Eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey // *Macromol. Biosci.* 2007. № 7. P. 218–226.
188. Gessesse A., Hatti-Kaul R., Gashe B. A., Mattiasson. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather // *Enz. Microbial. Technol.* 2003. № 32. P. 519–524.
189. Method for producing biodegradable polyester: patent US7410783B2 USA. Priority date 12.05.2006; publication 15.11.2007.
190. Peighamardoust S. H., Tafti A. G., Hesari Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review // *Trends in Food Science & Technology.* 2011. V. 22. №5. P. 215-224.
191. Production of a hydrolysate: patent US6383532B1 USA. Priority date 05.03.1998; publication 30.10.2001.
192. Cultured protein hydrolysate: patent US6838100B2 USA. Priority 07.04.2000; publication 04.01.2005.
193. Process for the preparation of a hydrolysate: patent US8728552B2 USA. Priority date 02.12.1999; publication 06.06.2001.
194. Charalampopoulos D., Pandiella S. S., Webb C. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates // *J. Appl. Microbiol.* 2002. V. 92. P. 851–859.
195. Szponar B., Pawlik K. J., Gamian A., Szwajcer E. Dey Protein fraction of barley spent grain as a new simple medium for growth and sporulation of soil *Actinobacteria* // *Biotechnol. Lett.* 2003. V. 25. P. 1717–1721.
196. Das H., Singh S. K. Useful byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry—a critical appraisal // *Crit. Rev. Food Scie Nut.* 2004. № 44. P. 77–89.
197. VIII Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (17-20 марта 2015 г.): материалы / М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015. С. 302–303.

198. Novik G. I., Wawrzynczyk J., Norrlof O., Szwajcer-Dey E. Fractions of barley spent grain as media for growth of probiotic bacteria // *Microbiology*. 2007. V.76. № 6. P. 902–907.
199. Corn active peptide additive for cell culture medium: patent US9534026B2 USA. Priority 31.10.2013; publication 03.01.2017.
200. Charalampopoulos D., Wang R., Pandiella S. S., Webb C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review // *Int. J. Food Microbiol.* 2002. № 15. P.131–141.
201. Хромова Н.Ю., Кузьмин И. М., Кареткин Б. А. Предварительная ферментативная обработка различных типов пшеничной муки для культивирования лактобактерий // *Актуальные проблемы естественных и математических наук в России и за рубежом*. 2017. С. 26–30.
202. Vioque J., Sanchez-Vioque R., Clemente A., Pedrockt J., Bautiste J., Milan F. Production and characterization of an extensive rapessed protein haydrolysate // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1999. V. 76. №7. P. 819-823.
203. Способ получения гидролизата белка из рисовой муки: пат. 2604197 Рос. Федерация. № 201214711/14, заявл. 20.05.2014; опубл. 10.12.2016.
204. Способ производства высокобелковой основы из зерна пшеницы для приготовления пищевого продукта: пат. 2453126 Рос. Федерация. № 2010141619/10; заявл. 11.10.2010; опубл. 20.06.2012, Бюл. № 17.
205. Способ изготовления концентрата зернового: пат. 2344609 Рос. Федерация. № 2007126499/13; заявл. 11.07.2007; опубл. 27.01.2009, Бюл. № 3.
206. Method for preparing corn peptide by using corn gluten water: pat. CN103710415A China. Priority date 19.06.2008; Publication 23.12.2009.
207. Войнов Н. А., Волова Т. Г., Зобова Н. В., Маркова С. В., Франк Л. А., Шишацкая Е. И. *Современные проблемы и методы биотехнологии: учеб. Пособие*. Красноярск: ИПК СФУ, 2009.
208. Tindall B., Balows A., Truper H. The family *Halobacteriaceae* // *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. – NY.: Springer-Verlag, 1992. – P. 768–808.

209. Sakane T., Fukuda I., Itoh T., Yokota A. Long-term preservation of halophilic archaeobacteria and thermoacidophilic archaeobacteria by liquid drying // *Journal of microbiological methods*. 1992. V. 16. № 4. P. 281-287.
210. Коростелева Н. И., Громова Т. В., Жукова И. Г. Биотехнология: учеб. пособие. Барнаул: Издательство АГАУ, 2006.
211. Лыков А. В. Теория сушки. М.: Энергия, 1968. 472 с.
212. Ермолаев В. А., Масленникова Г. А., Комарова Н. А., Федоров Д. Е. Исследование процессов сублимационной сушки ягод // *Техника и технология пищевых производств*. 2011. № 1.
213. Семенов Г. В., Шабетник Г. Д. Интенсификация процессов вакуумной сушки жидких и пастообразных материалов // *Известия ВУЗов. Пищевая технология*. 2002. № 4. С. 39-43.
214. Michael J. K. Spray drying and spray congealing of pharmaceuticals // *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. – NY.: Marcel Dekker INC, 2001. P. 207-221.
215. Keey R. B., Pham Q. T. Behavior of spray driers with nozzle atomizers. *Chem. Engg*, 1976. P. 311.
216. Patel R. P., Patel M. P., Suthar A. M. Spray drying technology: an overview // *Indian Journal of Science and Technology*. 2009. V. 2. № 10. P. 44.
217. Wan-Yin Fu, Mark R. Etzel. Spray drying of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 and cellular injury // *Journal of food science*. 1995. V. 60. № 1. P. 195 – 200.
218. Brian C. S. To, Mark R. Etzel. Survival of *Brevibacterium linens* (ATCC 9174) after spray drying, freeze drying, or freezing // *Journal of food science*. 1997. V. 62. № 1. P. 167 – 189.
219. Samborska K., Witrowa-Rajchert D., Gonçalves A. Spray-drying of α -amylase—the effect of process variables on the enzyme inactivation // *Drying Technology*. 2005. V. 23. P. 941 – 953.
220. Broadhead J., Edmond Rouan S. K., Hau I., Rhodes C. T. The effect of process and formulation variables on the properties of spray-dried β -galactosidase // *J. Pharm. Pharmacol.* 1994. V. 46. P. 458 – 467.

221. Bhosale P., Jogdand V. V., Gadre R. V. Stability of β -carotene in spray dried preparation of *Rhodotorula glutinis* mutant 32 // Journal of Applied Microbiology. 2003. V. 95. P. 584 – 590.
222. Reinhold M., Horst C., Hoffmann U. Experimental and theoretical investigations of a spray dryer with simultaneous chemical reaction // Chem Eng Sci. 2001. № 56. P. 1657–1665.
223. Behboudi-Jobbehdar S., Soukoulis C., Yonekura L., Fisk I. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748 // Drying Technology. 2013. № 31. P. 1274-1283.
224. Fu N., Chen X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes // Food Research International. 2011. № 44. P. 1127–1149.
225. Gardiner G. E., O’Sullivan E., Kelly J., Auty M. A. E., Fitzgerald G. F., Collins J. K., Ross R. P., Stanton C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L.salivarius* strains during heat treatment and spray drying // Applied and Environmental Microbiology. 2000. № 66. P. 2605–2615.
226. Ananta E., Volkert M., Knorr D. Cellular injuries and storage stability of spray dried *Lactobacillus rhamnosus* GG // International Dairy Journal. 2005. № 15. P. 399–409.
227. Sunny-Roberts E. O., Knorr D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders // International Dairy Journal. 2009. № 19. P. 209–214.
228. Fritzen-Freire C. B., Prudencio E. S., Amboni R. D. M. C., Pinto S. S., Negrao-Murakami A. N., Murakami F. S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics // Food Research International. 2012. № 45. P. 306–312.
229. Riveros B., Ferrer J., Borquez R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus* // Drying Technology. 2009. V. 27. № 1. P. 123–132.
230. Жуйкова Н. Н., Саблина О. С., Штокарева Е. А., Гаврилов А. С. Комплексный наполнитель для прямого прессования на основе лактозы и

- микрористаллической целлюлозы // Химико-фармацевтический журнал. 2010. Т. 44. № 4. С. 53-56.
231. Шубина О. Г., Кочеткова А. А. Пищевые ингредиенты как замена сахара // Пищевые ингредиенты. 2006. № 2. С. 23-25.
232. Bolhuis O. K., Lerk Ñ. F. Comparative evaluation of excipients for direct compression. IV. The formulation of a high dosage range drug // Pharm. Weekbl. 1979. № 114. P. 1473 – 1482.
233. Chavez B. E., Ledebouer A. M. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival // Drying Technology. 2007. № 25. P. 1193-1201.
234. Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures // Food Microbiology. 2008. № 25. P. 429-441.
235. Desmond C., Ross R. P., O'Callaghan E., Fitzgerald G., Stanton C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia // Journal of Applied Microbiology. 2002. № 93. P. 1003-1011.
236. Аванесова А. А., Маковская Ю. В., Гордиенко М. Г., Меньшутина Н. В. Разработка математического описания для анализа выживаемости микроорганизмов в процессе распылительной сушки // Успехи в химии и химической технологии. Том XXI. 2007. №2. С. 7-11.
237. Ердакова В. П., Позняковский В. М., Вековцев А. А. Перспективный подход к созданию новой биологически активной добавки «Пробинорм» для профилактики кожных заболеваний // Техника и технология пищевых производств. 2009. № 1. С. 35-39.
238. Максимова Т. В., Быков В. А., Калмыкова Т. П., Бухаров А. В., Попов П. И., Сыроешкин А. В. Зависимость гранулометрического состава микрогранул с витаминами от способа их получения // Вестник РУДН. Сер. Медицина. 2004. № 4. С. 209-215.
239. Рябцева С. А. Технология лактулозы: настоящее и будущее // Известия ВУЗов. Пищевая технология. 1998. № 4. С. 45-47.

240. Lian W. C., Hsiao H. C., Chou C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying // International Journal of Food Microbiology. 2002. № 74. P. 79-86.
241. Espina F., Packard V. S. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray-drying process // Journal of Food Protection. 1979. № 42. P. 149-152.
242. Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures // Biotechnology Progress. 2007. № 23. P. 302-315.
243. Lievens L. C., Riet K. Convective drying of bacteria. II. Factors influencing survival // Advances in Biochemical Engineering/biotechnology. 1994. № 51. P. 71-89.
244. Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; a review // Journal of Microbiological Methods. 2006. № 66. P. 183-193.
245. Kets E. P. W., Teunissen P. J. M., DeBont J. A. M. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying // Applied and Environmental Microbiology. 1996. № 62. P. 259-261.
246. Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P. Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* // Biotechnology Progress. 2004. № 20. P. 248-254.
247. Carvalho A. S., Silva J., Ho P., Teixeira P., Malcata F. X., Gibbs P. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants // Biotechnology Letters. 2002. № 24. P. 1587-1591.
248. Simpson P. J., Stanton C., Fitzgerald G. F., Ross R. P. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage // Journal of Applied Microbiology. 2006. № 99. P. 493-501.
249. Штамм *Halobacterium halobium* 353 Пущинский производитель бактериородопсина: пат. 770184 СССР. № 02631669/13; заяв. 19.06.78; опубл. 15.12.93, Бюл. № 45-46.

250. Штамм *Halobacterium salinarum*, используемый для получения бактериальных препаратов: пат. 2662996 Рос. Федерация. № 0002662996; опубл. 31.07.2018.
251. 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.
252. Trofimova L., Ksenofontov A., Mkrtchyan G., Graf A., Baratova L., Bunik V. Quantification of rat brain amino acids: analysis of the data consistency // Current Analytical Chemistry. 2016. № 12. P. 1-8.
253. Баратова Л.А., Белякова Л.П. Определение аминокислотного состава белков. Методы биохимического эксперимента. М.: МГУ, 1974. 36 с.
254. Бэйли Дж. Методы химии белков. М.: Мир, 1965. 284 с.
255. ГОСТ Р 54330-2011. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности. М.: Стандартиформ, 2018.
256. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties // J. Gen. Physiol. 1946. Vol. 30. P. 291–310.
257. Kalenov S. V., Gordienko M. G., Murzina E. D., Poberezhniy D. Y., Baurin D. V., Suzina N. E., Morozov A. N., Yakubovich L. M., Belov A. A., Panfilov V. I., Yarovaya O. V., Il'in M. M., Sorokin V. V., Skladnev D. A. *Halobacterium salinarum* storage and rehydration after spray drying and optimization of the processes for preservation of carotenoids // Extremophiles. 2018. Vol. 22. № 3. P. 511–523.
258. Урожайность зерновых культур [Электронный ресурс]: овощные – технология возделывания: [сайт]. URL: <https://www.agroxxi.ru/ovoschnye/ovoschnye-tehnologija-vozdelyvaniya/urozhainost-zernovyh-kultur.html> (дата обращения: 01.02.2019).
259. ГОСТ 20264.2-88. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности. М.: ИПК Издательство стандартов, 2005.

260. Актуальные проблемы естественных и математических наук в России и за рубежом: сб. науч. тр. / По итогам международной научно-практической конференции. № 2. Новосибирск, 2015. 128 с.
261. 17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2017/ Vienna, Austria, 2017. Vol. 17.
262. Биохимические методы исследования в клинике / под ред. А. А. Покровского. М., 1969.
263. 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2018 / Vienna, Austria, 2018. том 17.
264. 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.

Паспорт продукта

Бренд: Conda, Испания**Экстракт дрожжевой Кат. № 1702**

Фасовка 500 г. Срок годности 4 года.

Хранить при температуре 20°C

Фактор роста для большинства микроорганизмов

ОПИСАНИЕ

Дрожжевой экстракт представляет собой растворимый в воде автолизат клеток *Saccharomyces cerevisiae* и является богатым источником витаминов, особенно группы В, аминокислот и других факторов роста. Используется для приготовления большого числа культуральных сред в качестве отличного источника питательных веществ для роста микроорганизмов.

ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

	Спецификация	Среднее значение
Амино-азот (AN)	Минимум 4,5%	5,40%
Общий азот (TN)	Минимум 10%	10,70%
Отношение AN/TN	N/A	50,46%
Сухое вещество	> 95%	96,70%
Зольность	Максимум 15%	9,50%
pH [2% раствор]	6,0–7,2	6,8

СОДЕРЖАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ

	Типичное содержание
Кальций	0,10%
Магний	0,10%
Калий	5,70%
Натрий	0,30%

АМИНОКИСЛОТЫ

	Всего (г/100 г)		Всего (г/100 г)		Всего (г/100 г)
Аланин	8,70	Гистидин	2,0	Пролин	4,0
Аргинин	5,00	Изолейцин	5,60	Серин	4,70
Аспарагиновая кислота	9,70	Лейцин	7,60	Треонин	4,40
Цистин	0,80	Лизин	8,0	Триптофан	1,20
Глутаминовая кислота	16,10	Метионин	1,30	Тирозин	2,30
Глицин	4,90	Фенилаланин	3,80	Валин	5,80

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕСТ

Аэробный мезофильный счет	< 5000 КОЕ/г
Дрожжи и плесневые грибы	< 100 КОЕ/г
Колиформы	Отсутствует
Сальмонеллы	Отсутствует

Паспорт продукта

Бренд: Conda, Испания**Триптон Кат. № 1612**

Фасовка 500 г. Срок годности 4 года.

Хранить при температуре 20°C

Источник азота для изучения сбраживания углеводов и образования индола

ОПИСАНИЕ

Триптон является панкреатическим гидролизатом казеина, который содержит все аминокислоты, входящие в состав казеина, а также фракции более крупных пептидов. Это прекрасный питательный компонент, который используется в культуральных средах для получения антибиотиков, токсинов, ферментов и прочих биологических веществ. Также используется в качестве источника азота для роста микроорганизмов. Из-за отсутствия обнаруживаемых количеств углеводов данный пептон – прекрасный выбор для исследований, основанных на реакциях сбраживания. Высокое содержание триптофана делает его полезным при исследованиях биосинтеза индола. Рекомендуется при использовании всех типов культуральных сред. Широко используется в фармацевтической и ветеринарной промышленности, а также при производстве диагностических культуральных сред.

ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

	Спецификация	Среднее значение
Амино-азот (AN)	Минимум 3,9%	4,20%
Общий азот (TN)	Минимум 10%	13,31%
Отношение AN/TN	N/A	31,70%
Сухое вещество	> 94%	96,70%
Зольность	Максимум 15%	6,00%
pH [2% раствор]	6,5–7,5	6,8

СОДЕРЖАНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ

	Среднее содержание
Кальций	0,019%
Магний	0,0065%
Калий	0,95%
Натрий	2,10%

АМИНОКИСЛОТЫ

	Всего (г/100 г)		Всего (г/100 г)		Всего (г/100 г)
Аланин	2,87	Гистидин	2,29	Пролин	8,65
Аргинин	3,31	Изолейцин	4,48	Серин	5,08
Аспарагиновая кислота	6,52	Лейцин	7,63	Треонин	3,91
Цистин	0,40	Лизин	6,51	Триптофан	1,05
Глутаминовая кислота	18,70	Метионин	2,35	Тирозин	1,86
Глицин	1,79	Фенилаланин	4,09	Валин	5,51

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ТЕСТ

Аэробный мезофильный счет	< 5000 КОЕ/г
Дрожжи и плесневые грибы	< 100 КОЕ/г
Колиформы	Отсутствует
Сальмонеллы	Отсутствует

Таблица 13. Аминокислотный состав ферментолитатов до и после культивирования *H. salinarum* (без добавления в среду солей металлов)

Название АК	нМ в пробе				Количественный состав АК в пробе, мкг/ мкл аликвоты			
	№1	№2	№3	№4	№1	№2	№3	№4
Asp	1,44	0,75	1,74	0,54	0,19	0,10	0,23	0,07
Thr	1,01	0,39	0,79	0,20	0,12	0,05	0,09	0,02
Ser	2,18	0,72	1,28	0,30	0,23	0,08	0,13	0,03
Glu	13,73	7,24	4,09	1,73	2,02	1,06	0,60	0,26
Pro	6,60	3,53	2,16	0,14	0,76	0,41	0,25	0,02
Gly	2,81	1,51	1,32	0,49	0,21	0,11	0,10	0,04
Ala	1,76	0,52	2,80	0,41	0,16	0,05	0,25	0,04
Cys	0,03	0,02	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01
Val	1,63	0,39	1,10	0,30	0,19	0,05	0,13	0,03
Met	0,26	0,03	0,24	0,03	0,04	0,00	0,04	0,00
Ile	1,10	0,20	0,71	0,13	0,14	0,03	0,09	0,02
Leu	2,44	0,45	2,70	0,40	0,32	0,06	0,35	0,05
Tyr	0,03	0,00	0,01	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00
Phe	1,22	0,53	0,68	0,23	0,20	0,09	0,11	0,04
OH-K	0,01	0,02	0,03	0,04	0,00	0,00	0,00	0,01
Orn	0,05	0,06	0,05	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01
Lys	0,70	0,22	0,48	0,11	0,10	0,03	0,07	0,02
His	0,67	0,34	0,41	0,22	0,10	0,05	0,06	0,03
Arg	0,89	0,24	0,48	0,12	0,16	0,04	0,08	0,02
Сумма	38,55	17,14	21,07	5,52	4,97	2,22	2,62	0,72

*Объем взятой аликвоты равен 0,6 мкл

Таблица 14. Аминокислотный состав ферментолитатов до и после культивирования *H. salinarum* (с добавлением в среду солей металлов)

Название АК	нМ в пробе				Количественный состав АК в пробе, мкг/ мкл аликвоты			
	№1	№2	№3	№4	№1	№2	№3	№4
Asp	1,44	0,53	1,74	0,38	0,19	0,09	0,23	0,05
Thr	1,01	0,31	0,79	0,16	0,12	0,04	0,09	0,02
Ser	2,18	0,58	1,28	0,24	0,23	0,06	0,13	0,02
Glu	13,73	6,15	4,09	1,47	2,02	0,90	0,60	0,22
Pro	6,60	2,93	2,16	0,12	0,76	0,34	0,25	0,02
Gly	2,81	1,28	1,32	0,42	0,21	0,09	0,10	0,03
Ala	1,76	0,42	2,80	0,33	0,16	0,04	0,25	0,03
Cys	0,03	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
Val	1,63	0,31	1,10	0,24	0,19	0,04	0,13	0,02
Met	0,26	0,03	0,24	0,03	0,04	0,00	0,04	0,00
Ile	1,10	0,16	0,71	0,10	0,14	0,02	0,09	0,02
Leu	2,44	0,34	2,70	0,30	0,32	0,05	0,35	0,04
Tyr	0,03	0,00	0,01	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00
Phe	1,22	0,45	0,68	0,20	0,20	0,08	0,11	0,03
OH-K	0,01	0,02	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,01
Orn	0,05	0,05	0,05	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01
Lys	0,70	0,19	0,48	0,09	0,10	0,03	0,07	0,02
His	0,67	0,29	0,41	0,19	0,10	0,04	0,06	0,03
Arg	0,89	0,20	0,48	0,10	0,16	0,03	0,08	0,02
Сумма	38,55	14,25	21,07	4,49	4,97	1,87	2,62	0,59

*Объем взятой аликвоты равен 0,6 мкл

Представленные в таблице данные соответствуют образцам:

№1 – среда для культивирования галобактерий *H. salinarum*, состоящая из гидролизата пшеничной крупы и минеральных солей, фермент Протосубтилин ГЗх;

№2 – культуральная жидкость, после культивирования галобактерий *H. salinarum* на среде, состоящей из гидролизата пшеничной крупы и минеральных солей, фермент Протосубтилин ГЗх;

№3 – среда для культивирования галобактерий *H. salinarum*, состоящая из гидролизата кукурузной крупы и минеральных солей, фермент Protex 40E;

№4 – культуральная жидкость, после культивирования галобактерий *H. salinarum* на среде, состоящей из гидролизата кукурузной крупы и минеральных солей, фермент Protex 40E.

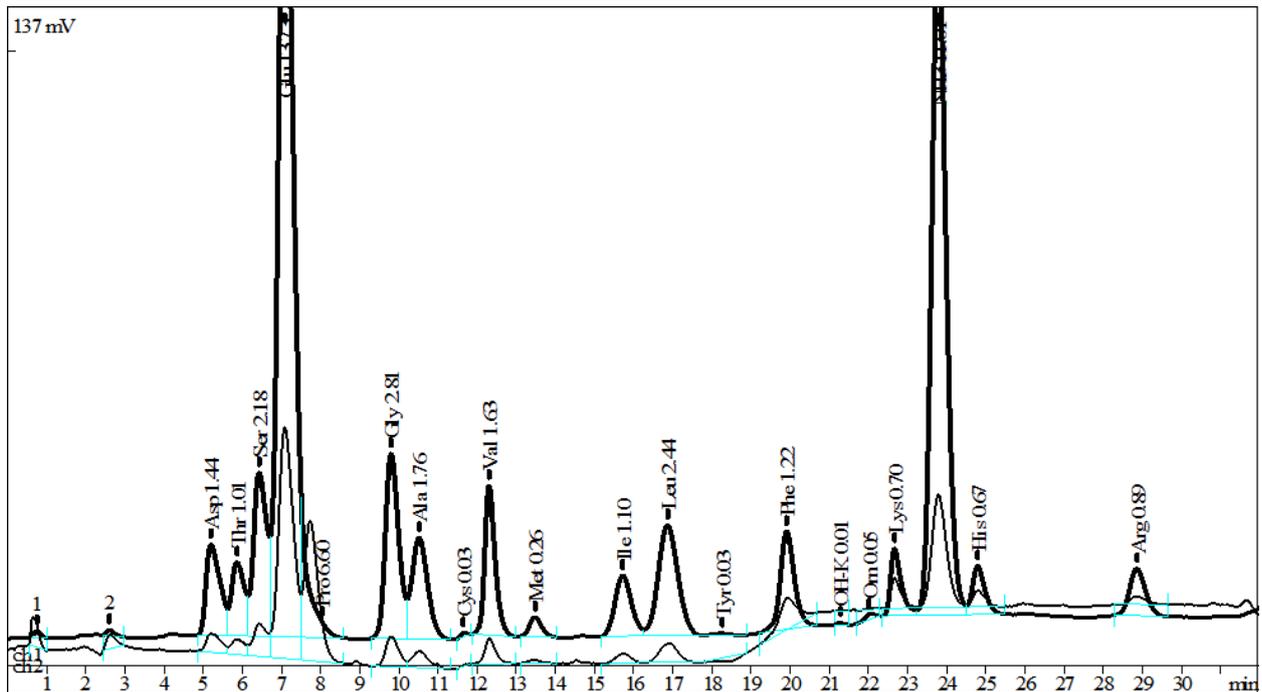


Рисунок 20. Аминокислотный анализ среды для культивирования галобактерий *H. salinarum*, состоящей из гидролизата пшеничной крупы и минеральных солей

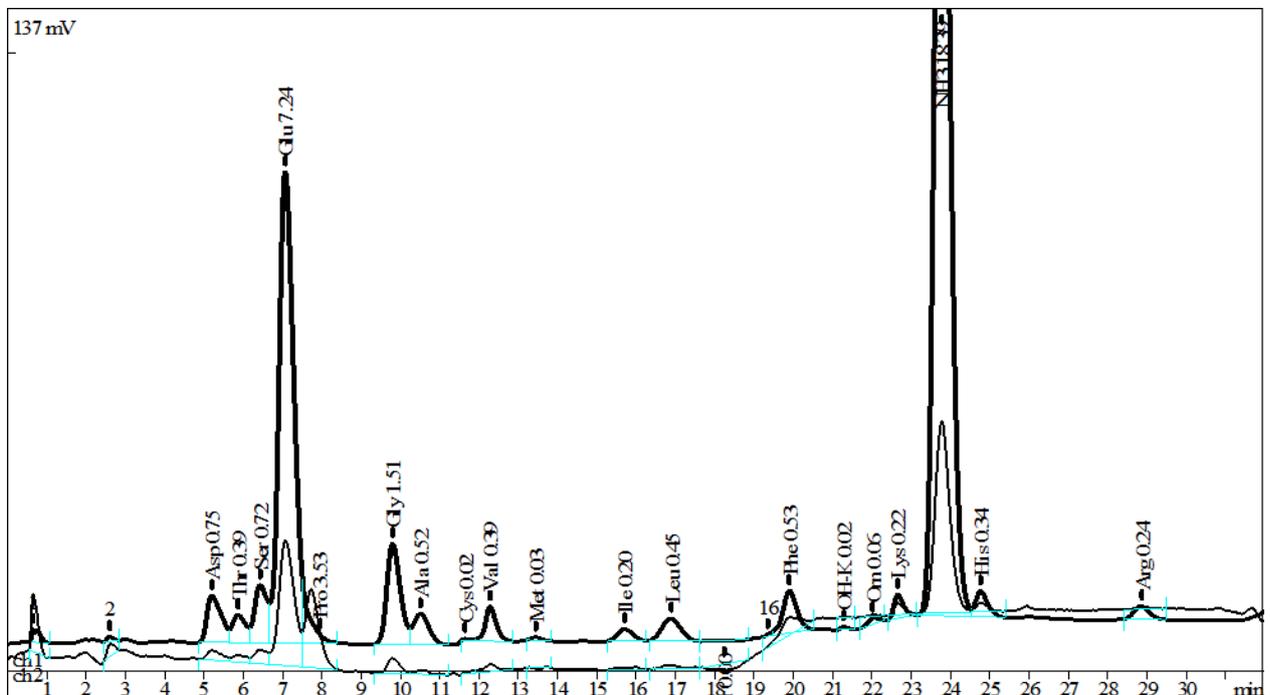


Рисунок 21. Аминокислотный анализ культуральной жидкости, после культивирования галобактерий *H. salinarum* на среде, состоящей из гидролизата пшеничной крупы и минеральных солей

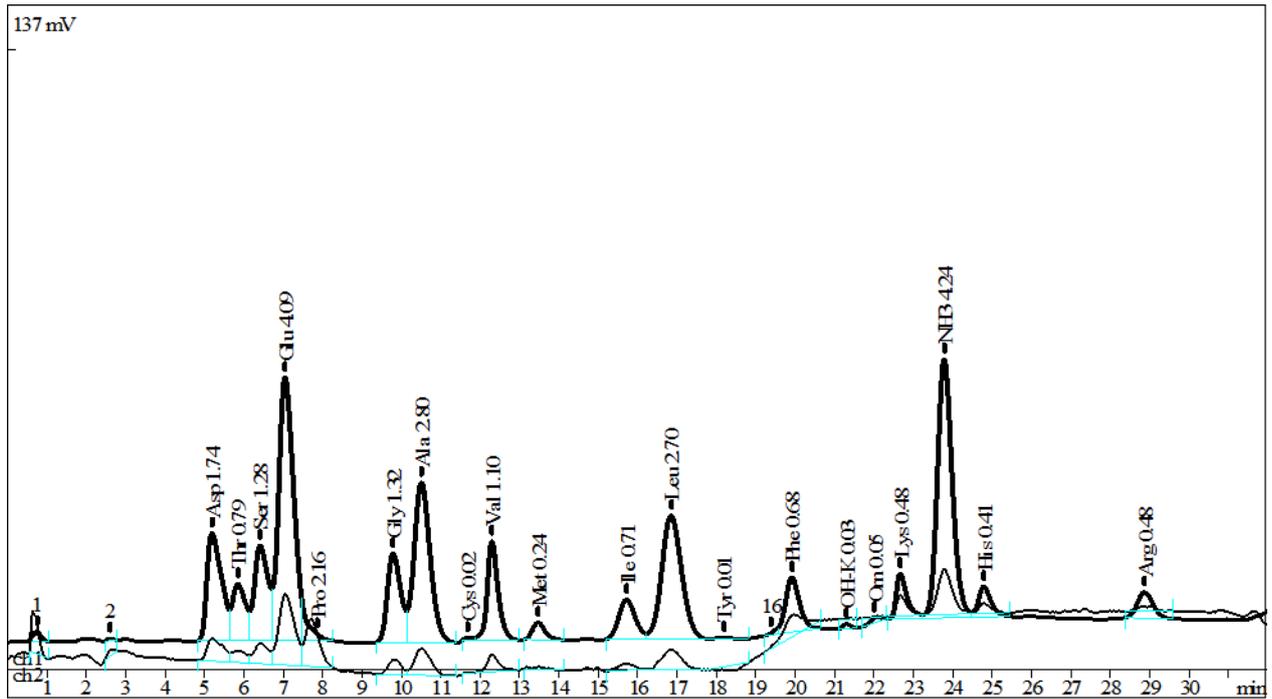


Рисунок 22. Аминокислотный анализ среды для культивирования галобактерий *H. salinarum*, состоящей из гидролизата кукурузной крупы и минеральных солей

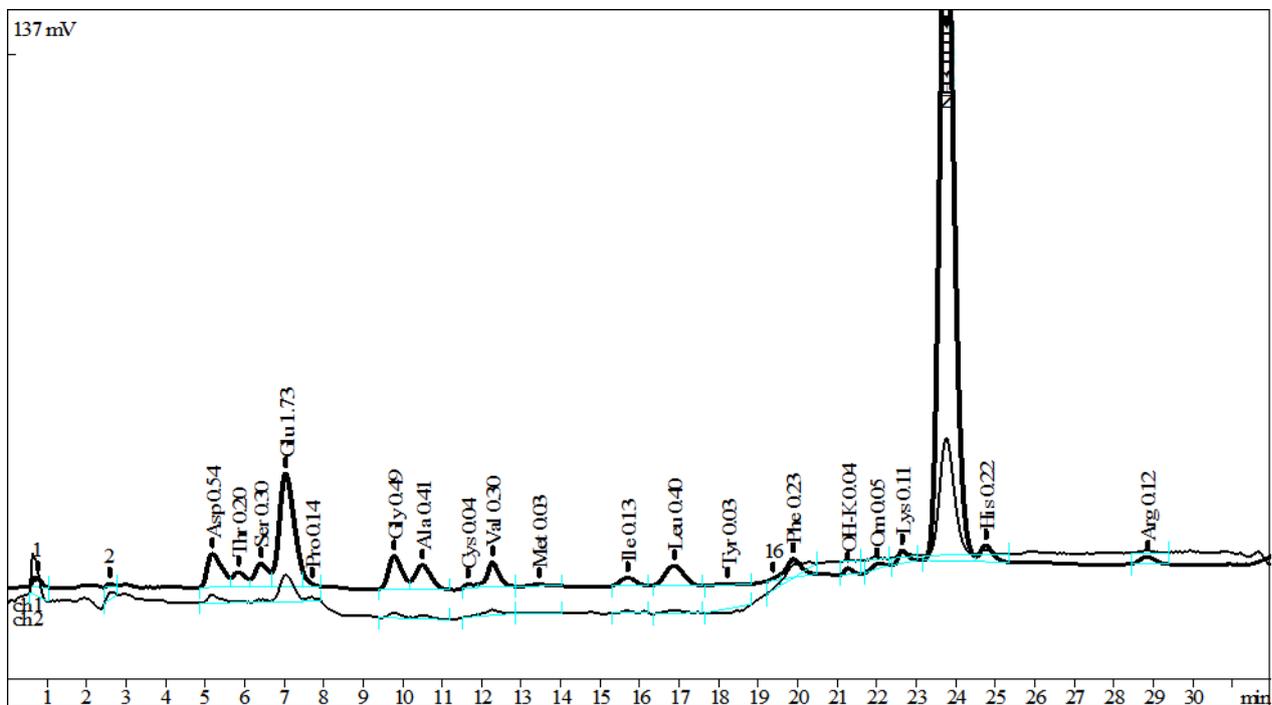
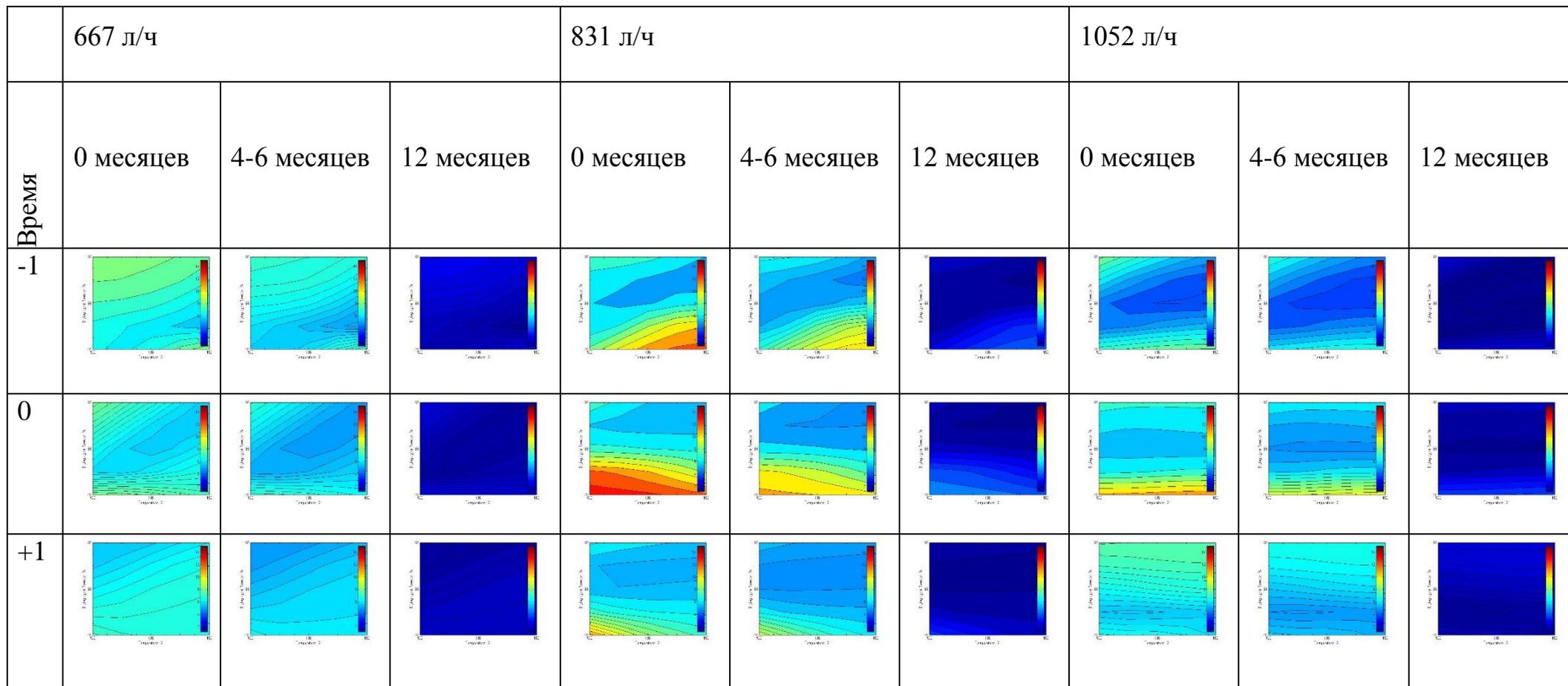


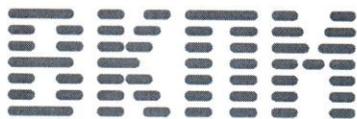
Рисунок 23. Аминокислотный анализ культуральной жидкости после культивирования галобактерий *H. salinarum* на среде, состоящей из гидролизата кукурузной крупы и минеральных солей

Таблица 15. Результаты расчета концентрации каротиноидов в биомассе с использованием нейросетевой модели для варианта культивирования А

	667 л/ч			831 л/ч			1052 л/ч		
время	0 месяцев	4-6 месяцев	12 месяцев	0 месяцев	4-6 месяцев	12 месяцев	0 месяцев	4-6 месяцев	12 месяцев
	-1								
0									
+1									

Таблица 16. Результаты расчета концентрации каротиноидов в биомассе с использованием нейросетевой модели для варианта культивирования В





НАЦИОНАЛЬНЫЙ БИОРЕСУРСНЫЙ ЦЕНТР
Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов
ФГБУ «ГосНИИгенетика» Минобрнауки России

117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, ФГБУ «ГосНИИгенетика» тел: (495) 315-12-10 e-mail: vkpm@genetika.ru

12794

НАЦИОНАЛЬНОЕ ПАТЕНТНОЕ ДЕПОНИРОВАНИЕ

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ

Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ)
ФГБУ ГосНИИгенетика приняла на национальное патентное депонирование культуру:

Halobacterium salinarum 353П-1

Дата депонирования: 30 января 2017 г.

Депозитор: ООО «Никофарм»

Продукты, продуцируемый штаммом (область применения штамма): C₅₀-каротиноиды группы бактериоруберина, бактериородопсин, ненасыщенные жирные кислоты.

РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР ВКПМ: В-12794

Директор ВКПМ



Синеокий С.П.

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель от Управляющей организации
ООО «НИКОФАРМ»

Каракулько К.А.

«24» мая 2017 г.

АКТ

о внедрении результатов кандидатской диссертационной работы
Мурзиной Екатерины Дмитриевны

Комиссия в составе:

председатель: Каракулько Константин Александрович – Руководитель от Управляющей организации;

члены комиссии: Силкин Игорь Владимирович – Коммерческий директор,

составили настоящий акт о том, что штамм *Halobacterium salinarum* 353П-1 (ВКПМ-12794) и результаты диссертационной работы Мурзиной Е.А. “Основы технологии получения биомассы *Halobacterium salinarum* на ферментативных гидролизатах зерновых” использованы в опытно-промышленном производстве ООО «НИКОФАРМ”.

Внедрение результатов диссертационной работы позволило:

Улучшить показатели культивирования на участке опытно-промышленного производства, получить биомассу *Halobacterium salinarum* с более высоким содержанием биологически активных веществ, а также оптимизировать условия высушивания и хранения биомассы.

Полученные результаты важны для производства бактериальных препаратов с высокой биологической активностью для применения в медицине, ветеринарии, животноводстве, птицеводстве, косметологии в различных лекарственных формах.

Председатель комиссии:

Руководитель от Управляющей организации

Каракулько К. А.

Члены комиссии:

Коммерческий директор

Силкин И. В.