

На правах рукописи



МАМЕДОВА ФАХРИЯ ТАХИР КЫЗЫ

**РАЗЛИЧНЫЕ ПОДХОДЫ К НАКОПЛЕНИЮ БИОМАССЫ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA VULGARIS*
И К ПРОЦЕССАМ ЕЁ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ
ТРАНСФОРМАЦИИ**

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Ефременко Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,
Марквичева Елена Арнольдовна,
ведущий научный сотрудник, руководитель группы биокапсулирования
лаборатории полимеров для биологии Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук

доктор биологических наук, профессор,
Василов Раиф Гаянович,
начальник научно-технического комплекса
Биоэнергетики Национального
Исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова
Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится « » июня 2015 года в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.59 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова (<http://www.chem.msu.ru>).

Автореферат разослан « » апреля 2015 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В современном мире в стадии масштабно внедряемых или только разрабатываемых находится большое количество различных технологий использования биомассы в энергетических и сырьевых целях. Согласно концепции устойчивого развития человечества, наибольшую практическую значимость представляют собой процессы, обеспечивающие получение коммерчески ценных продуктов за счет утилизации существующих отходов и трансформации возобновляемых видов сырья. При разработке таких биотехнологических процессов важно не только учитывать возможность получения различных целевых продуктов из используемой биомассы, но и организовать производство с минимальной нагрузкой на окружающую среду. Поиски продуктивных видов биомассы для биотехнологической конверсии выдвигают в разряд **перспективных** источников фототрофные микроорганизмы. Интерес к ним предопределяется в 20–30 раз более высокой скоростью накопления их биомассы в сравнении с традиционными сельскохозяйственными культурами, необходимостью использования в 10–30 раз меньших площадей для накопления 1 кг биомассы, при этом возможно использование земель, требующих рекультивации или непригодных для сельскохозяйственного культивирования [Моисеев И., 2009]. Клетки микроводорослей представляют собой источник углеводов, белков и липидов, которые могут быть подвергнуты дальнейшей биотехнологической трансформации в различные целевые продукты.

Известно, что некоторые микроводоросли входят в состав активного ила [Roudsari F.P., 2014] и могут использовать не только CO₂ в качестве основного источника углерода, но и органические соединения. Традиционные процессы очистки сточных вод с использованием активного ила характеризуются наличием ограничений по значениям исходных величин химического потребления кислорода (**ХПК**¹) сточных вод. При этом в процессе очистки происходит накопление биомассы активного ила, которая, как правило, характеризуется непостоянством химического состава из-за исходной гетерогенности микробного состава, изменяющегося в процессе обработки сточных вод, что является существенным ограничением для возможностей ее дальнейшей трансформации в разнообразные целевые продукты. Таким образом, интересен не только сам факт очистки сточных вод, но и **актуально** получение альтернативных вариантов биомассы, применяемой для этой очистки с возможным последующим ее использованием в качестве сырья в различных биотехнологических процессах. Использование сточных вод, богатых биоорганическими соединениями, в качестве питательных сред для культивирования микроводорослей представляется **перспективным**, поскольку позволяет

¹ Список используемых сокращений: ХПК – химическое потребление кислорода, МК – молочная кислота, ФК – фумаровая кислота, ЯК – янтарная кислота, ПГА – полигидроксиалкоаноаты, ПВС – поливиниловый спирт, ИБК – иммобилизованный биокатализатор, ВС – восстанавливающие сахара, ИЖ – ионная жидкость, Ц – целлюлазный комплекс (продуцент - *Trichoderma viride*), А – амилазный комплекс (продуцент - *Aspergillus oryzae*).

рассчитывать на объединение технологии биологической очистки водных ресурсов и накопления биомассы микроводорослей в качестве сырья для получения различных промышленных продуктов. Такой процесс может стать экономически обоснованным дополнением к традиционно используемому процессу очистки сточных вод на основе активного ила. Важным, с **научной** и **практической** точек зрения, является разработка и исследование новых биотехнологических процессов с использованием клеток микроводорослей в процессах очистки сточных вод и последующей трансформацией полученной таким образом возобновляемой биомассы в коммерчески значимые продукты.

Предварительная обработка биомассы является одной из ключевых стадий ее трансформации в различные целевые продукты. Гидролиз углеводных компонентов биомассы важен, так как позволяет получать среды, содержащие восстанавливающие сахара (**ВС**), конвертируемые на последующих стадиях биотехнологических процессов в разные химические соединения. В этой связи оптимизация процессов предобработки любой биомассы важна для ее дальнейшего эффективного использования.

Внимание к биоразлагаемым полимерным материалам, которые могут заменить полимеры, традиционно используемые и производимые химической промышленностью, постоянно растет. При этом наибольшей **научной** и **практической актуальностью** характеризуется получение таких полимерных материалов, мономерами или исходными соединениями для производства которых являются получаемые биотехнологическим способом органические кислоты – молочная (**МК**), фумаровая (**ФК**), янтарная (**ЯК**) (сам процесс полимеризации осуществляется химическим путем), а также полимерных материалов, получаемых биотехнологическим путем, например, полигидроксиалканоатов (**ПГА**), используемых для производства полимерных изделий. **Актуальным** является расширение сырьевой базы для их биотехнологического производства, главным образом, за счет использования возобновляемых источников сырья.

Иммобилизация клеток и их использование в качестве биокатализаторов в различных современных биотехнологических процессах экологической направленности на многочисленных примерах подтвердили своё преимущество и перспективность применения за счёт упрощения технологического оформления процессов с их участием, возможности их длительного хранения и многократного использования с улучшением основных характеристик процессов (продуктивности, выхода продукта и т.д.). Криогель поливинилового спирта (**ПВС**) оказался одним из наиболее перспективных носителей для иммобилизации клеток различных микроорганизмов, применяемых в различных биотехнологических процессах [Lozinsky V.I., 1998]. Особый **научный** интерес представляет исследование возможности получения новых высокоэффективных иммобилизованных биокатализаторов (**ИБК**) с использованием этого носителя, изучение их свойств и определение условий их эффективного использования.

Результаты анализа **актуальных** задач и **перспективных** направлений исследований легли в основу формирования цели и задач работы.

Целью данной работы являлось исследование различных подходов к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам её биокаталитической трансформации в органические кислоты (мономеры для получения биоразлагаемых полимеров) и биполимеры в виде ПГА.

В ходе работы решались следующие **основные задачи**:

- разработать эффективный способ накопления биомассы свободных клеток микроводорослей *C. vulgaris*, совместив его с заменой традиционно используемых сред на сточные воды разного состава;

- усовершенствовать подходы к предобработке биомассы микроводорослей *C. vulgaris* для получения сред с максимально высокими концентрациями ВС, получаемых из углеводных компонентов биомассы в результате их гидролиза;

- определить наиболее эффективные подходы к получению органических кислот путём оптимизации условий применения иммобилизованных клеток мицелиальных грибов рода *Rhizopus* в процессах биотрансформации ВС, содержащихся в гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в МК и ФК;

- разработать биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *Actinobacillus succinogenes* и оптимизировать условия его использования для получения ЯК в процессах конверсии ВС, содержащихся в гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*;

- установить возможность получения ПГА с использованием клеток *Cupriavidus necator* при их культивировании в гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

Научная новизна работы. Разработан оригинальный способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов путем их иммобилизации в криогель ПВС, обеспечивающий продолжительное хранение клеток (не менее 1,5 лет) при сохранении у них пролиферативной функции на 90÷95 %. Действенность способа проверена в отношении 12 культур фототрофных микроорганизмов.

Показано, что применение высококонцентрированного иммобилизованного инокулята позволяет увеличить скорость процессов очистки сточных вод и накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris* для ее трансформации в различные целевые продукты.

Впервые показано, что для получения максимальной концентрации ВС в гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, необходимо использовать комбинированную обработку клеток: механическую деструкцию и ферментативный гидролиз с использованием ферментных препаратов класса целлюлаз и амилаз.

Установлены оптимальные условия применения иммобилизованных клеток мицелиальных грибов рода *Rhizopus* для биотрансформации ВС, содержащихся в ферментоллизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в МК и ФК.

Предложен подход к утилизации биомассы мицелиальных грибов рода *Rhizopus*, многократно использованных в процессах получения органических кислот, с применением методов метаногенеза и быстрого пиролиза (500°C,

5 мин) с получением, соответственно, метана и пиролизной нефти. Показана возможность увеличения выхода метана с $41,4 \pm 1,3\%$ до $61,3 \pm 1,9\%$ при обогащении биомассы мицелиальных грибов биомассой микроводорослей *C. vulgaris*. Установлено присутствие длинноцепочечных нитрилсодержащих соединений в образцах пиролизной нефти, которые можно рассматривать в качестве перспективных компонентов высокоэнтальпийного топлива.

Впервые установлено, что для биотехнологического получения ПГА с применением в качестве продуцентов клеток бактерий *C. necator* (с накоплением полимера в клетках до $59,57 \pm 1,75\%$) могут быть использованы гидролизаты биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

Практическая значимость работы. Разработанный способ получения иммобилизованного высококонцентрированного инокулята может быть использован не только для ускоренного накопления биомассы клеток фототрофных микроорганизмов непосредственно после его размораживания, но и применен при хранении данных микроорганизмов в мировых коллекциях, заменив менее эффективные традиционно используемые методы.

Установлено, что применение иммобилизованного инокулята на основе клеток микроводорослей *C. vulgaris* возможно для обработки сточных вод различного химического состава с целью значительного снижения уровня ХПК. Такая предобработка стоков перед их подачей на основные очистные сооружения может позволить избежать необходимости их разбавления с увеличением объёма для достижения уровня ХПК, приемлемого для использования аэробного активного ила.

Разработан оригинальный высокоэффективный биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes* для получения ЯК, позволяющий значительно расширить спектр возможных источников сырья (биомассы фототрофных микроорганизмов, макроводорослей, целлюлозосодержащих отходов) для получения ЯК.

Обобщение полученных результатов может быть использовано при создании биотехнологического комплекса, сочетающего в себе эффективные биокаталитические процессы, направленные на накопление биомассы микроводорослей, сопряженное с очисткой сточных вод различного состава, и проведение трансформации ее гидролизатов в различные целевые продукты в виде природных полимеров (ПГА) или мономеров (МК, ФК, ЯК) для синтеза биоразлагаемых полимеров.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Подход к накоплению биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах, основанный на использовании концентрированного инокулята в виде клеток, иммобилизованных в криогель ПВС.

2. Разработанный способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов путем их иммобилизации в криогель ПВС, обеспечивающий продолжительное хранение клеток.

3. Разработанный биокатализатор в виде иммобилизованных клеток *A. succinogenes* для получения ЯК из различных субстратов.

4. Условия предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*,

обеспечивающие максимальный уровень накопления ВС в среде.

5. Способы получения органических кислот (МК, ФК, ЯК) и ПГА при конверсии ВС, содержащихся в ферментализатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

Личный вклад автора состоял в критическом анализе литературных данных, планировании, подготовке и проведении экспериментов, обобщении и обсуждении полученных результатов, участии в подготовке публикаций и в популяризации полученных результатов в форме докладов на международных и российских научных конференциях различного уровня.

Апробация работы. Результаты диссертации были представлены на 8 научных форумах, в том числе: XII Ежегод. междунар. молод. конф-ции «ИБХФ РАН-ВУЗы» (Россия, Москва, 2012); Internat. symposium of marine enzyme and polysaccharides (Vietnam, Nha Trang, 2012), V Междунар. науч.-практ. конф-ции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Россия, Ростов-на-Дону, 2013); Internat. conf. «Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications» (Россия, Москва, 2013), Междунар. конф-ции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Россия, Казань, 2013), Междисциплин. науч. форуме Moscow Science Week (Россия, Москва, 2014); Рос. конф-ции «85 лет: Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова 1929-2014» (Россия, Москва, 2014), I Междунар. конф-ции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Россия, Новосибирск, 2014).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в журналах из Перечня ВАК, 1 Патент РФ на изобретение и 9 тезисов на международных и российских конференциях.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 176 страниц печатного текста, включая 50 рисунков, 36 таблиц, 221 ссылку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть

Объекты исследования. В работе использовались клетки зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* C-1, *C. vulgaris* C-2, *C. vulgaris* C-7, *C. vulgaris* C-75, *C. vulgaris* C-82, *Nannochloropsis* sp. штамм *rsemsu-N-1*, *Chlamydomonas* sp., *Chlorococcum* sp., *Cosmarium* sp., *Dunaliella salina* Teod. штамм *rsemsu-D-1*, клетки красных микроводорослей *Galdieria partita* Sentz. штамм *rsemsu-G-3*, *Haematococcus pluvialis*, клетки диатомовых микроводорослей *Thalassiosira weissflogii*, клетки цианобактерий *Arthrospira* / *Spirulina platensis* (NORDST.) GEITL. штамм 1/02-II, *Nostoc* sp., *Gloeotrichia echinulata*. Клетки были получены из Коллекции института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Коллекции института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Коллекции Биологического и Географического факультетов МГУ имени М.В. Ломоносова. В работе использовались штаммы мицелиальных грибов *Rhizopus oryzae* F-814, *R. oryzae* F-1032, полученные из Всероссийской коллекции промышленных

микроорганизмов, а также штаммы бактерий *Actinobacillus succinogenes* В-10111, *Cupriavidus necator* В-8619, полученные из ВКПМ и *Photobacterium phosphoreum* №311 КМ МГУ, полученные из Коллекции микроорганизмов МГУ [Куц В.В., 2009].

Коммерческие препараты ферментов: целлюлазный комплекс из клеток *Trichoderma viride* (Sigma), ферментный комплекс, содержащий α -амилазу, из клеток *Aspergillus oryzae* (Sigma).

Методы исследования. Получение образцов иммобилизованных в криогель ПВС клеток микроорганизмов проводилось путем смешивания раствора ПВС с суспензией клеток фототрофных микроорганизмов, бактерий или спор мицелиальных грибов и дальнейшем замораживании/оттаивании сформированных гранул из полученной смеси. Формирование иммобилизованных мицелиальных грибов проводилось на глюкозосодержащей среде согласно известному способу [Спиричева О.В., 2006].

Определение ВС проводилось по методу Шомоди-Нельсона [Синицын А.П., 1995]. При определении состава основных биоорганических компонентов биомассы клеток микроорганизмов экстракция липидов проводилась по методу Фольша [Folch J., 1957], определение содержания липидов проводилось спектрофлуорометрически (по взаимодействию с флуоресцентным красителем Нильский красный). Экстракция и определение содержания белка проводились согласно известному способу [Досон Р., 1991]. Определение общего содержания углеводов проводилось с использованием фенольного метода [Dubois M., 1956]. Определение ХПК проводилось бихроматным методом [Dubber D., 2010]. Экстракция и определение внутриклеточного содержания ПГА проводились согласно известному способу [Мышкина В.Л., 2010]. Для определения концентрации МК, ФК, ЯК и глюкозы использовались стандартные ферментативные наборы. Определение концентрации муравьиной кислоты, фурфурола и оксиметилфурфурола проводилось с использованием метода ВЭЖХ на хроматографе Knauer Smartline Pump 1000 с УФ-детектором. Оценка токсичности сред проводилась согласно разработанному способу с использованием иммобилизованных клеток фотобактерий *P. phosphoreum* [Ефременко Е.Н., 2010].

При обработке всех экспериментальных данных рассчитывались средние значения и значения стандартных отклонений. Все эксперименты проводились не менее, чем в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

1. Исследование процесса накопления биомассы клеток микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах разного состава

Культивирование свободных клеток микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах

С целью выбора штамма с высокой удельной скоростью роста и высокими значениями продуктивности (скорости) процесса по биомассе (Q_C) на примере 5 культур был проведен скрининг и изучены кинетические

параметры процесса накопления биомассы различных образцов клеток микроводорослей *C. vulgaris* в традиционно применяемой среде Тамия [Тамия Н., 1953] с добавлением 5 г/л глюкозы. В результате был отобран штамм *C. vulgaris* С-1, удельная скорость и продуктивность по биомассе которого в указанной среде составили $0,42 \pm 0,02$ сут⁻¹ и 306 ± 10 мг сух. в-в/л/сут. Именно этот штамм использовался в дальнейших экспериментах. Для проведения исследований по накоплению биомассы были выбраны наиболее распространенные и значимые с практической точки зрения разновидности сточных вод: пищевого производства, агропромышленного комплекса и бытовых стоков (Таблица 1).

Таблица 1 – Состав сточных вод, используемых для культивирования микроводорослей *C. vulgaris*

Сточная вода		Состав, мг/л
№1	Модельная питательная среда, имитирующая бытовые стоки [Noprens I., 2001]	ХПК – 620 , CO(NH ₂) ₂ – 91,7, CH ₃ COONa×3H ₂ O – 131,6, триптон – 17,4, дрожжевой экстракт – 52,2, крахмал – 122,0, молочный порошок – 116,2, масло подсолнечное – 29,0, NH ₄ Cl – 12,8, MgHPO ₄ ×3H ₂ O – 29,0, KH ₂ PO ₄ – 23,4, FeSO ₄ ×7H ₂ O – 5,8, раствор микроэлементов – 1 мл. Раствор микроэлементов содержит: Cr(NO ₃) ₃ ×9H ₂ O – 770, CuCl ₂ ×2H ₂ O – 536, MnSO ₄ ×H ₂ O – 108, NiSO ₄ ×6H ₂ O – 336, PbCl ₂ – 100, ZnCl ₂ – 208 (pH 7,1)
№2	Модельная питательная среда, имитирующая стоки пищевой промышленности [Reinhold D., 2012]	ХПК – 1644 , сахароза – 1282, крахмал – 173,6, CaCl ₂ – 185,0, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 252,8, K ₂ SO ₄ – 1062,7 NaHCO ₃ – 128,9, FeCl ₃ ×6H ₂ O – 7,1, KH ₂ PO ₄ – 17,5, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 72,3, раствор микроэлементов – 1 мл. Раствор микроэлементов содержит: MnSO ₄ ×H ₂ O – 350,9, ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 879,7, CuCl ₂ ×2H ₂ O – 268,2, CoCl ₂ – 44,1, Na ₂ B ₄ O ₇ ×10H ₂ O – 352,8, Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O – 25,2, NiNO ₃ ×6H ₂ O – 346,9 (pH 7,0)
№3	Реальные стоки Совхоза Декоративного Садоводства (г. Москва)	ХПК – 990 , N-NH ₄ – 41,4, N общ – 52,5; P общ – 8,8 (pH 7,2)
№4	Реальные стоки Останкинского Молочного Комбината (г. Москва)	ХПК – 1610 , N-NH ₄ – 34,6, N общ – 61,5, P общ – 10,6 (pH 7,6)

После 13 сут культивирования клеток при исходной их концентрации $C_{БМО} = 0,10 \pm 0,14$ г сух. в-в/л во всех использованных видах сточных вод наблюдалось накопление биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в

концентрациях более $0,55 \pm 0,02$ г сух. в-в/л. Было отмечено, что интенсивность роста клеток *C. vulgaris* зависит от состава сточных вод и от исходной концентрации клеток в среде. Скорость роста клеток увеличивалась при достижении их концентрации в среде $0,2 \div 0,4$ г сух. в-в/л. В связи с этим далее была исследована кинетика накопления клеток *C. vulgaris* в сточных водах при исходной концентрации биомассы $C_{БМ0} = 0,4$ г сух. в-в/л. При этом в зависимости от среды прирост биомассы составил $0,6 \div 1,7$ г сух. в-в/л, средняя скорость накопления биомассы $Q_c = 75 \div 210$ мг сух. в-в/л/сут (Рисунок 1). При этом уровень ХПК сред был снижен в $2 \div 8$ раз, скорость снижения ХПК составила в зависимости от среды $51 \div 179$ мг/л/сут.

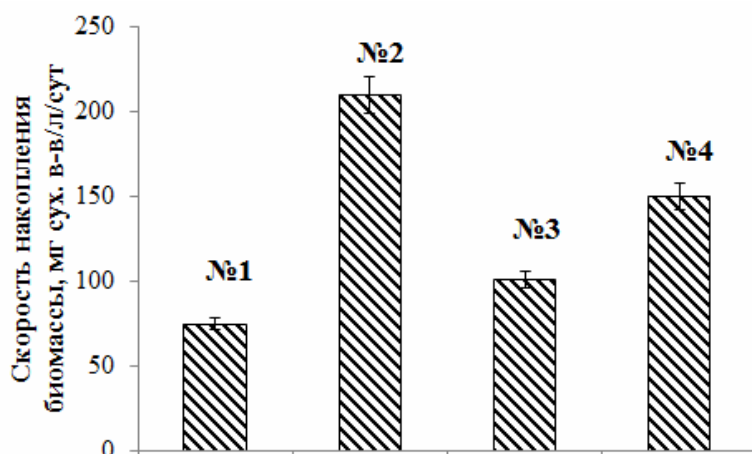


Рисунок 1 – Средняя скорость накопления за 8 сут биомассы клеток *C. vulgaris* в сточных водах №1 - №4 (см. Таблицу 1) при исходной концентрации клеток *C. vulgaris* в среде 0,4 г сух. в-в/л

Был проведен анализ состава основных биоорганических компонентов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на среде Тамийя и в указанных выше сточных водах (Таблица 2).

Таблица 2 – Состав основных биоорганических компонентов биомассы клеток *C. vulgaris*, накопленной в различных средах

Среда	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %
Тамийя	$16,5 \pm 1,7$	$7,0 \pm 0,8$	$55,6 \pm 4,3$
Сточная вода №1	$22,5 \pm 1,0$	$9,3 \pm 0,4$	$50,7 \pm 2,2$
Сточная вода №2	$17,1 \pm 0,9$	$9,9 \pm 0,5$	$55,5 \pm 2,5$
Сточная вода №3	$26,1 \pm 1,2$	$7,7 \pm 0,4$	$51,4 \pm 2,1$
Сточная вода №4	$18,4 \pm 0,9$	$12,4 \pm 0,6$	$52,3 \pm 2,2$

Было установлено, что во всех случаях культивирования в сточных водах так же, как и на «классической» среде Тамийя, биомасса клеток *C. vulgaris* характеризовалась практически одинаковым достаточно высоким содержанием углеводов ($50 \div 55$ % сухого веса). Это делает такую биомассу весьма привлекательным субстратом для дальнейшей биокаталитической трансформации клетками микроорганизмов в различные значимые продукты, а указанные виды сточных вод – пригодной средой для накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, богатой углеводами.

Одним из вариантов оптимизации исследуемого процесса, с точки зрения получения максимальной скорости накопления биомассы и скорости

снижения ХПК сред, было решено попробовать использовать в качестве инокулята иммобилизованные клетки микроводорослей в исходно более высокой концентрации.

Влияние иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* на процесс накопления их биомассы

Был разработан способ иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* в криогель ПВС при -70°C , обеспечивающий сохранение способности к пролиферации клеток на $95\pm 3\%$. Был определен наиболее эффективный исходный состав суспензии клеток в растворе полимера для получения иммобилизованного препарата: 4% (по сухим веществам) биомассы в 7% растворе ПВС в среде Тамийя.

Была исследована возможность многократного использования разработанного иммобилизованного инокулята для накопления биомассы клеток микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах различного состава путем замены питательной среды на свежую (Рисунок 2). Показано, что за 1 цикл при оптимизированной концентрации иммобилизованных клеток, используемых в качестве инокулята (1,2 г сух. в-в/л), может быть получено в зависимости от среды культивирования до $0,6\div 1,7$ г сух. в-в/л биомассы микроводорослей со средней скоростью накопления $Q_c=203\div 557$ мг сух. в-в /л/сут, а ХПК - снижено в $2\div 8$ раз со средней скоростью снижения $139\div 479$ мг/л/сут. За 4 цикла использования иммобилизованного инокулята показатели Q_c снижались не более, чем на $12\div 13\%$.

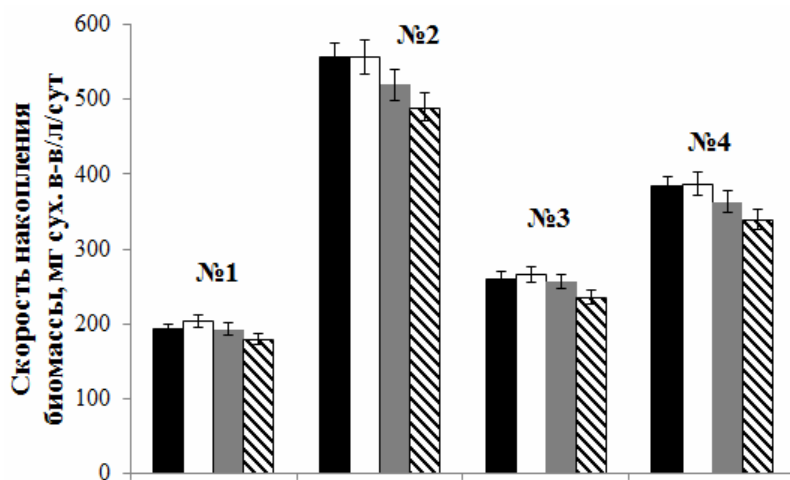


Рисунок 2 – Средняя скорость накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* в сточных водах №1 - №4 при концентрации внесенных во все среды иммобилизованных клеток *C. vulgaris* 1,2 г сух. в-в/л (■ - 1-ый, □ - 2-ой, ■ - 3-ий, ▨ - 4-ый цикл культивирования)

Анализ состава основных биоорганических компонентов биомассы показал его идентичность составу биомассы, накопленной при использовании в качестве инокулята свободных клеток *C. vulgaris* (Таблица 3).

Таблица 3 – Состав основных биоорганических компонентов биомассы клеток *C. vulgaris*, накопленной в сточных водах в результате культивирования иммобилизованных клеток *C. vulgaris*

Сточная вода	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %
№1	20,8±1,4	10,3±0,7	49,1±2,8
№2	19,8±0,8	8,4±0,4	54,8±2,1
№3	24,5±1,0	8,5±0,8	52,7±3,0
№4	20,1±0,9	13,5±0,9	50,3±2,7

Таким образом, был продемонстрирован новый подход к быстрому и продуктивному накоплению биомассы свободных клеток микроводорослей в среде сточных вод при использовании оригинального иммобилизованного инокулята.

2. Выбор способа гидролиза полисахаридов, входящих в состав биомассы микроводорослей *C. vulgaris*

Был проведен сравнительный анализ эффективности различных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, с целью получения максимальной концентрации ВС, в том числе глюкозы, из углеводных компонентов биомассы (Таблица 4). При проведении кислотной обработки максимальный выход ВС ($76,13 \pm 2,41\%$) может быть получен при проведении кислотного гидролиза в среде с 1,2 н H_2SO_4 в течение 25 мин при повышенных температуре и давлении с предварительной механической дезинтеграцией клеток *C. vulgaris* на шаровой мельнице в течение 4 мин. Но оказалось, что в полученных гидролизатах присутствовали муравьиная кислота (0,21 г/л), оксиметилфурфурол (0,28 г/л) и фурфурол (0,06 г/л), токсичные для микробных продуцентов. В этой связи такие гидролизаты могут использоваться для целей химической промышленности.

Оптимальным, с точки зрения получения максимальных выходов ВС и глюкозы при гидролизе полисахаридов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, можно считать подход, сочетающий последовательно метод её механической деструкции в течение 4 минут на шаровой мельнице и метод её ферментативной обработки в подобранных условиях (рН 5,5, 37°C, с использованием ферментных препаратов класса целлюлаз (8 мг/г сух. в-в биомассы) и амилаз (2 мг/г сух. в-в биомассы) (Таблица 4).

Анализ токсичности полученного ферментолита с использованием чувствительных к токсикантам клеток фотобактерий *P. phosphoreum* показал его нетоксичность для клеток микроорганизмов.

С целью получения высококонцентрированных растворов ВС было исследовано влияние начальной концентрации в среде механически дезинтегрированной биомассы микроводорослей *C. vulgaris* ($C_{БМ0}$) на эффективность ферментативного гидролиза (Таблица 5).

Из полученных данных следовало, что в целом при увеличении исходной концентрации биомассы конечная концентрация ВС в гидролизате увеличивалась. Однако с увеличением концентрации биомассы от 100 до 120 г сух. в-в/л наблюдаемого повышения максимальной концентрации ВС уже практически не происходило. Таким образом, оказалось, что для ферментативного гидролиза в подобранных условиях целесообразно использовать биомассу микроводорослей *C. vulgaris* в начальных концентрациях до 100 г сух. в-в/л, так как при этом возможно достижение наибольших значений конечной концентрации ВС, а полученный нетоксичный гидролизат может быть рекомендован для использования на последующих стадиях биотехнологических процессов биотрансформации сырья в различные продукты с помощью биокатализаторов.

Таблица 4 – Основные показатели различных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточной воде №2 ($C_{\text{БМО}} = 20$ г сух. в-в/л, $C_{\text{УГЛ}} = 11,1$ г/л)*

№	Способ предобработки	$C_{\text{ВС}}$, г/л	$C_{\text{ГЛ}}$, г/л	$Y_{\text{ВС}}$, %	$Y_{\text{ГЛ}}$, %	$Q_{\text{ВС}}$, г/л/ч	$Q_{\text{ГЛ}}$, г/л/ч
1	Кислотный гидролиз и термолиз (1,2н HCl 25 мин, 121 °С, 1 ати)	6,86±0,25	2,30±0,07	61,80±2,20	20,72±0,59	16,33±0,60	5,48±0,17
2	Кислотный гидролиз и термолиз (1,2н H_2SO_4 45 мин, 121 °С, 1 ати)	7,71±0,27	3,38±0,08	69,46±2,39	30,45±0,71	10,28±0,36	4,51±0,11
3	Механическая деструкция (4 мин) + Кислотный гидролиз и термолиз (1,2н H_2SO_4 25 мин, 121 °С, 1 ати)	8,45±0,27	4,55±0,12	76,13±2,41	40,99±1,09	20,12±0,64	10,83±0,29
4	Ферментативный гидролиз (20 ч, 37 °С, рН 5,5): Ц (8 мг/г сух. в-в биомассы) + А (2 мг/г сух. в-в биомассы)	2,98±0,09	1,43±0,04	26,85±0,82	12,88±0,39	0,15±0,01	0,07±0,01
5	Термолиз (0,5 ч, 108 °С, 0,5 ати) + Ферментативный гидролиз (20 ч, 37 °С, рН 5,5): Ц (8 мг/г сух. в-в биомассы) + А (2 мг/г сух. в-в биомассы)	8,35±0,26	5,88±0,16	75,23±2,33	52,97±1,42	0,37±0,01	0,29±0,01
6	Обработка ИЖ [Bmim]Cl (1 ч, 120 °С) + Ферментативный гидролиз (20 ч, 37 °С, рН 5,5): Ц (8 мг/г сух. в-в биомассы) + А (2 мг/г сух. в-в биомассы)	5,72±0,18	3,83±0,11	51,53±1,61	34,50±1,02	0,32±0,01	0,21±0,01
7	Механическая деструкция (4 мин) + Ферментативный гидролиз (20 ч, 37 °С, рН 5,5): Ц (8 мг/г сух. в-в биомассы) + А (2 мг/г сух. в-в биомассы)	9,87±0,34	7,98±0,22	88,92±3,12	71,89±2,01	0,49±0,02	0,40±0,01

* $C_{\text{БМО}}$ - исходная концентрация биомассы, г сух. в-в/л, $C_{\text{УГЛ}}$ – исходная общая концентрация углеводов, г/л, $C_{\text{ВС}}$ – концентрация ВС, г/л, $C_{\text{ГЛ}}$ - концентрация глюкозы, г/л, $Y_{\text{ВС}}$ – выход ВС (% от общей исходной концентрации углеводов), $Y_{\text{ГЛ}}$ – выход глюкозы (% от общей исходной концентрации углеводов) $Q_{\text{ВС}}$ - продуктивность процесса по ВС, г/л/ч, $Q_{\text{ГЛ}}$ - продуктивность процесса по глюкозе, г/л/ч, Ц – целлюлазный комплекс (продуцент - *Trichoderma viride*), А – амилазный комплекс (продуцент - *Aspergillus oryzae*), ИЖ [Bmim]Cl – ионная жидкость 1-бутил-3-метилимидазолий хлорид

Таблица 5 – Основные показатели ферментативного гидролиза предварительно дезинтегрированной на шаровой мельнице биомассы микроводорослей *C. vulgaris* при варьировании ее исходной концентрации в реакционной среде

$C_{\text{БМО}}$, г сух. в-в/л	$C_{\text{ВС}}$, г/л	$Y_{\text{ВС}}$, %	$Q_{\text{ВС}}$, г/л/ч
20	9,87±0,34	88,92±3,12	0,49±0,02
40	19,51±0,66	87,88±3,01	0,98±0,03
50	24,10±0,85	86,85±3,09	1,10±0,04
60	28,55±1,03	85,74±3,13	1,19±0,04
70	33,00±1,18	84,94±3,01	1,38±0,05
100	45,19±1,69	81,42±3,02	1,61±0,06
120	46,06±1,70	69,16±2,62	1,64±0,06

3. Трансформация ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в органические кислоты (мономеры для получения биоразлагаемых полимеров) и биополимеры (полигидроксиалканоаты)

Получение молочной и fumarовой кислот с использованием биокатализаторов в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиальных грибов

Для исследования и оптимизации процессов получения МК и ФК из ферментализатов биомассы *C. vulgaris* были использованы разработанные ранее в лаборатории экобиокатализа Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова высокоэффективные биокатализаторы в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиальных грибов: *Rhizopus oryzae* F-814 – продуцент МК [Спиричева О.В., 2006], *R. oryzae* F-1032 – продуцент ФК [Сенько О.В., 2013].

Были оптимизированы условия биокаталитической трансформации ВС, содержащихся в ферментативных гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, в МК при использовании ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* F-814. При оптимальных условиях (28°C, pH 6,6±0,2, длительности цикла - 40ч, исходной концентрации ВС в ферментализате $C_{\text{ВСО}}=45,2\pm 1,7$ г/л, концентрации ИБК $C_{\text{ИБК}}=30$ г сух.в-в/л) максимальная концентрация МК составила $C_{\text{МКмакс}} = 28,4\pm 1,1$ г/л, продуктивность процесса по МК $Q_{\text{МК}}=0,71\pm 0,03$ г/л/ч, степень конверсии потребленных ВС в МК $Y_{\text{МК/ВС}}=0,65\pm 0,03$.

Полученные результаты были в 142 раза лучше по показателям $C_{\text{МКмакс}}$ и $Q_{\text{МК}}$, чем в единственном известном из литературы аналогичном процессе [Сенько О.В., 2013].

Впервые была показана возможность длительного эффективного использования ИБК в периодическом процессе получения МК из ВС, входящих в состав ферментализатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (Рисунок 3 А). Период полуинактивации ИБК составил $\text{ПП}_{\text{ИБК}}=480$ ч.

Были оптимизированы условия биокаталитической трансформации ВС, содержащихся в ферментализатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, в ФК при использовании ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* F-1032. При оптимальных

условиях (28°C , длительности цикла - 40ч, исходной концентрации ВС в ферментолитате $C_{\text{BC}0}=45,2\pm 1,7$ г/л, концентрации ИБК $C_{\text{ИБК}}=30$ г сух.в-в/л) максимальная концентрация ФК составила $C_{\text{ФКмакс}}=24,2\pm 0,9$ г/л, продуктивность процесса по ФК $Q_{\text{ФК}}=0,61\pm 0,03$ г/л/ч, степень конверсии потребленных ВС в ФК $Y_{\text{ФК/ВС}}=0,55\pm 0,02$. При этом показатели $C_{\text{ФКмакс}}$ и $Q_{\text{ФК}}$ оказались выше более, чем в 200 раз в сравнении с единственным известным из литературы аналогичным процессом [Сенько О.В., 2013].

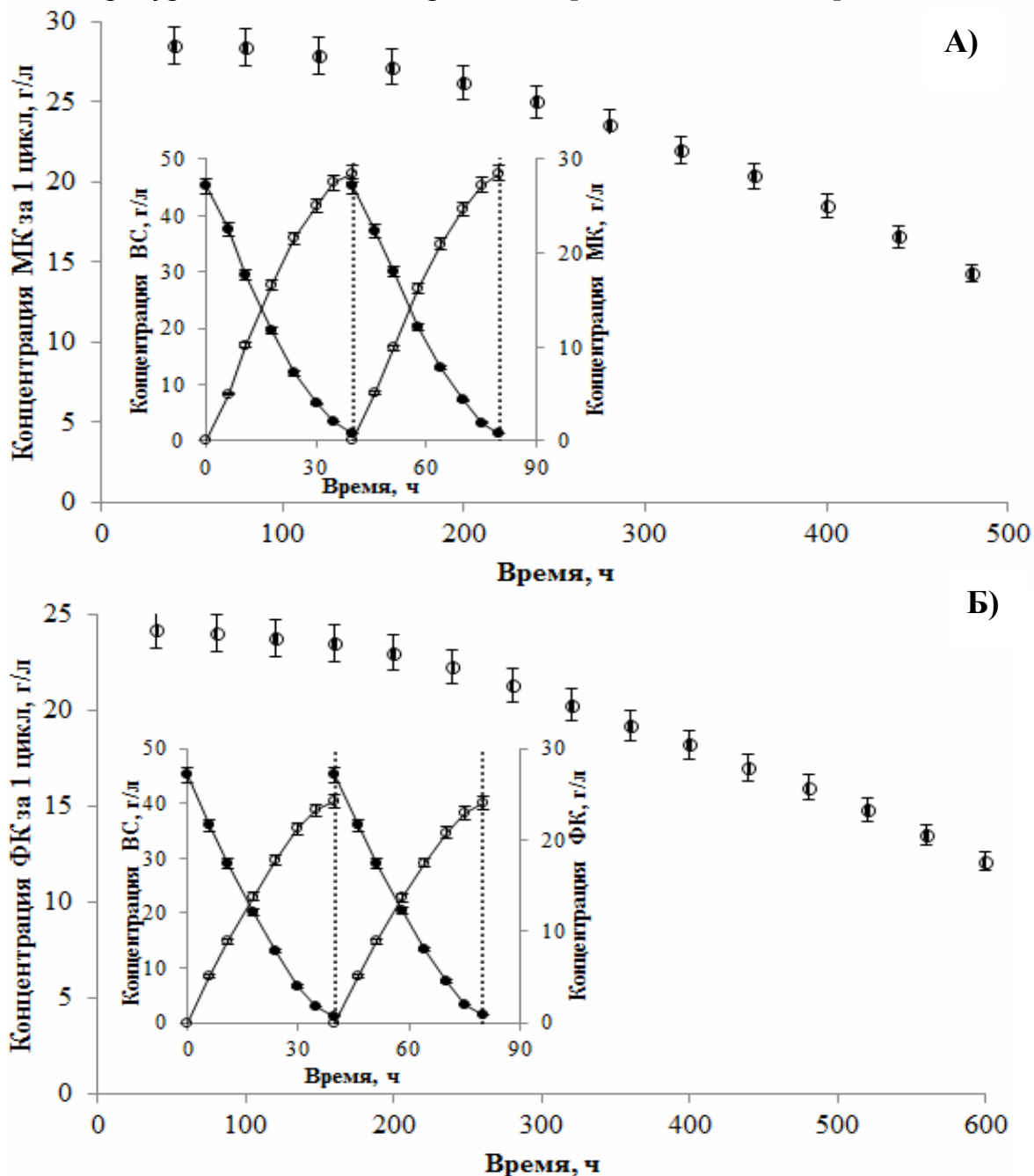


Рисунок 3 – Изменение концентрации МК (А) и ФК (Б) в среде в процессе многократного использования ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л). Каждая «точка» соответствует максимальному уровню накопления кислоты в конце каждого периодического цикла. На «врезке» представлена кинетика потребления ВС (●) и накопления в среде кислоты (○) в 2-х циклах использования ИБК для получения кислоты из ферментативных гидролизатов биомассы *S. vulgaris* при исходной концентрации ВС в них $45,2\pm 1,7$ г/л. Пунктирными линиями на «врезке» отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе с ИБК на свежую питательную среду

Впервые была показана возможность длительного эффективного использования ИБК в периодическом процессе получения ФК из ВС, входящих в состав ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (Рисунок 3 Б). Период полуинактивации ИБК составил $ПП_{ИБК}=600$ ч.

Получение янтарной кислоты с использованием биокатализатора в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий Actinobacillus succinogenes B-10111

Для получения ЯК был разработан биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes*, был определен наиболее эффективный и целесообразный к применению исходный состав ИБК: 2 % (по сухим веществам) биомассы в 13% растворе ПВС. Показана возможность и оптимизированы условия проведения периодического биотехнологического процесса получения ЯК из глюкозы при использовании разработанного ИБК на основе иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes*: исходная концентрация глюкозы $C_{ГЛЮ}=70$ г/л, концентрация ИБК $C_{ИБК}=20$ г сух. в-в/л, длительность цикла - 38ч, максимальная концентрация ЯК $C_{ЯК_{макс}}=52,3\pm 2,1$ г/л, продуктивность процесса по ЯК $Q_{ЯК}=1,38\pm 0,05$ г/л/ч, степень конверсии потребленной глюкозы в ЯК $Y_{ЯК/ГЛЮ}=0,77\pm 0,03$, период полуинактивации ИБК $ПП_{ИБК}=1070$ ч (Рисунок 4А).

При сравнении процессов получения ЯК из глюкозы при использовании свободных и иммобилизованных клеток в этой работе было установлено, что использование ИБК значительно более эффективно. При иммобилизации обеспечивается увеличение показателя длительности возможного эффективного использования продуцента как минимум в 19 раз, продуктивности процесса – в 1,2 раза, максимальной концентрации ЯК за 1 цикл – в 1,4 раза.

Получение ЯК с использованием разработанного ИБК по сравнению с известными биотехнологическими процессами получения ЯК из глюкозы на основе как свободных, так и иммобилизованных клеток [Liu Y.-P., 2008, Corona-González R. I., 2008, 2014, Xi Y., 2013], обеспечивает одну из самых высоких степеней конверсии глюкозы в ЯК, длительность его эффективного функционирования в 3,5 и более раз превышает лучшие из известных результатов, при этом при использовании одной и той же иммобилизованной биомассы, входящей в состав ИБК, удается получать как минимум в 3,5 раза большие количества ЯК.

Из полученных результатов следует, что иммобилизация клеток бактерий *A. succinogenes* в криогель ПВС, сформированный при использовании 13% раствора ПВС с ресуспендированной в нем биомассой клеток (2% сух. в-в по массе), является оригинальным методом получения ИБК, применение которого позволяет существенно повысить эффективность биотехнологического процесса получения ЯК по основным показателям.

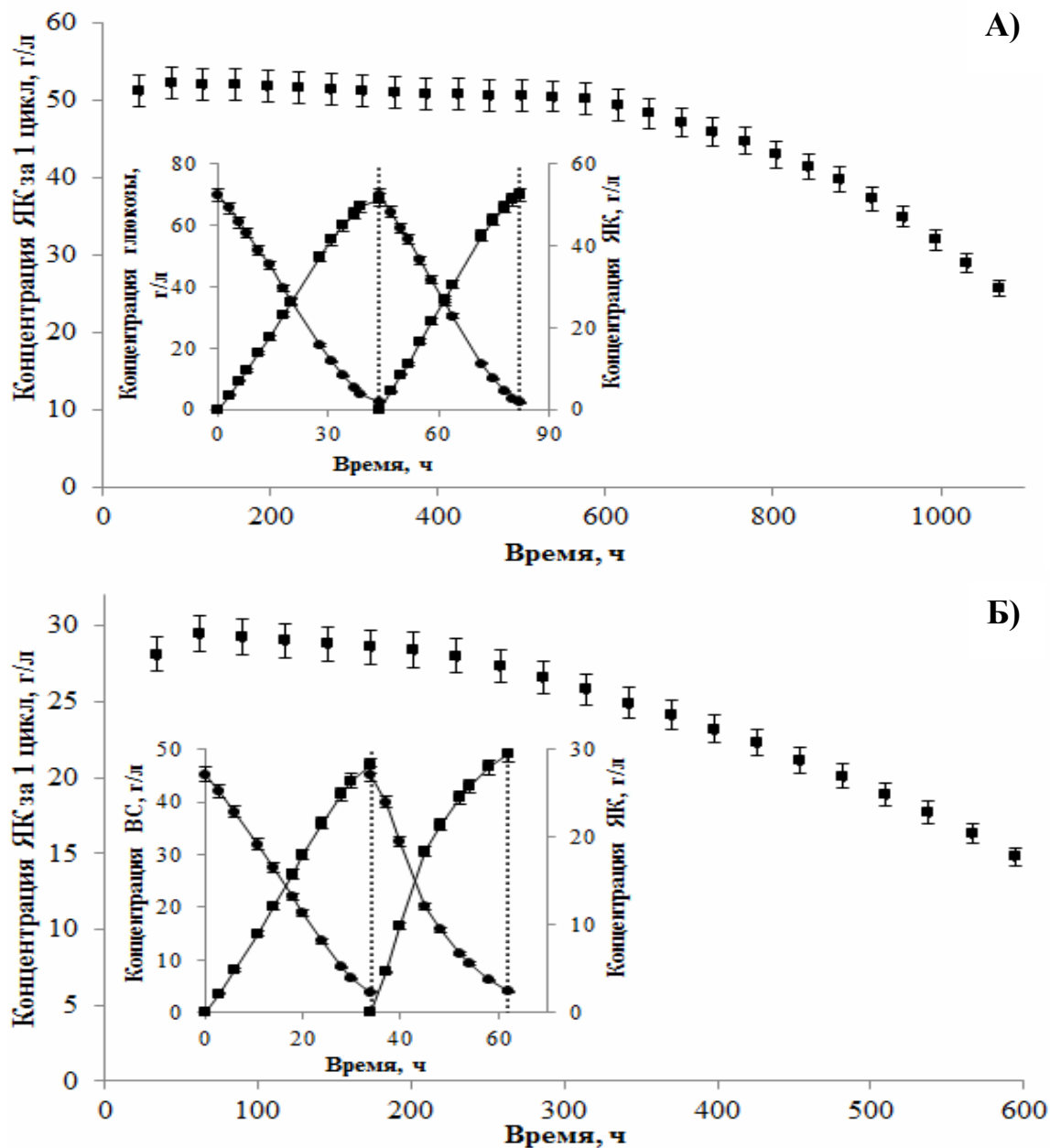


Рисунок 4 – Изменение концентрации ЯК в среде в процессе многократного использования ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* ($S_{ИБК}=20$ г сух. в-в/л). Каждая «точка» соответствует максимальному уровню накопления ЯК в конце каждого периодического цикла. На «врезке» представлена кинетика потребления глюкозы (А) и ВС (Б) (●) и накопления в среде ЯК (■) в 2-х циклах использования ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* (А) - при использовании в качестве субстрата – глюкозы при исходной концентрации в среде $S_{Глю}=70$ г/л. (Б) - при использовании в качестве субстрата – ферментативных гидролизатов биомассы *S. vulgaris* при исходной концентрации ВС в них $45,2\pm 1,7$ г/л. Пунктирными линиями на «врезке» отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе на свежую питательную среду

Впервые была показана возможность и оптимизированы условия проведения периодического биотехнологического получения ЯК из ферментолитатов биомассы микроводорослей *S. vulgaris* при использовании разработанного ИБК на основе иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes*: исходная концентрация ВС $S_{ВС0}=45,2\pm 1,7$ г/л, концентрация ИБК $S_{ИБК}=20$ г сух. в-в/л, длительность цикла - 28ч,

максимальная концентрация ЯК $C_{\text{ЯКмакс}}=29,5\pm 1,7$ г/л, продуктивность процесса по ЯК $Q_{\text{ЯК}}=1,05\pm 0,06$ г/л/ч, степень конверсии потребленных ВС в ЯК $Y_{\text{ЯК/ВС}}=0,69\pm 0,03$, период полуинактивации ИБК ПП $t_{\text{ИБК}}=594$ ч (Рисунок 4Б).

Использование ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в качестве субстрата для накопления ПГА бактериями *Cupriavidus necator* B-8619

На примере синтетических глюкозосодержащих питательных сред была показана возможность и оптимизированы условия накопления ПГА в составе биомассы клеток *C. necator*: исходная концентрация биомассы клеток $C_{\text{БМО}}=5,0$ г сух. в-в/л, исходная концентрация глюкозы $C_{\text{ГЛО}}=20$ г/л, длительность процесса 15 ч, концентрация ПГА $C_{\text{ПГА}}=7,76\pm 0,21$ г/л, продуктивность процесса по ПГА $Q_{\text{ПГА}}=461\pm 12$ мг/л/ч.

Впервые установлено, что перспективной основой сред для культивирования клеток *C. necator* с целью накопления в них ПГА является ферментолитат биомассы микроводорослей. Были оптимизированы условия получения ПГА в клетках *C. necator* при их исходной концентрации $C_{\text{БМО}}=5,0$ г сух. в-в/л с использованием ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в качестве среды культивирования с разной исходной концентрацией ВС в них. Было показано, что максимальная концентрация ПГА накапливается в течение 15 ч при исходной концентрации ВС в ферментолитате $24,10\pm 0,85$ г/л (Таблица 6). При этом скорость накопления ПГА (405 ± 12 мг/л/сут) в установленных условиях в 4,6 и более раз превосходит известные из литературы данные, полученные при использовании для накопления ПГА разных гидролизатов и отходов производства [Oliveira F.C., 2004, Yu J., 2008, Baei M. S., 2009, Castilho L. R., 2009, Sangyoka S., 2012].

Таблица 6 – Характеристики процесса накопления ПГА клетками *C. necator* в среде с ферментолитанной биомассой *C. vulgaris* при варьировании исходной концентрации ВС в среде

Исходная концентрация ВС в ферментолитатах $C_{\text{ВС0}}$, г/л	14,70±0,41	24,10±0,85	33,00±1,18
Длительность процесса, ч	10	15	20
Максимальная концентрация ПГА, $C_{\text{ПГА}}$ г/л	4,57±0,12	6,91±0,20	6,71±0,19
Внутриклеточное содержание ПГА, %	51,00±1,31	59,57±1,75	58,81±1,72
Средняя скорость накопления ПГА, $Q_{\text{ПГА}}$, мг/л/ч	373±10	405±12	294±8

4. Оценка научно-практического потенциала полученных в данной работе результатов

Определение возможности и эффективности использования разработанного способа иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* в отношении клеток различных фототрофных микроорганизмов

Показано, что предложенный способ иммобилизации и

криоконсервации клеток микроводорослей *C. vulgaris* пригоден для широкого спектра клеток фототрофных микроорганизмов – зеленых, сине-зеленых, красных и диатомовых микроводорослей. При этом разработанный способ обеспечивает длительный срок хранения клеток (не менее 1,5 лет) при сохранении у них способности к пролиферации на 90÷95 % (Таблица 7).

Таблица 7 - Применение разработанного способа иммобилизации клеток *C. vulgaris* в криогель ПВС к клеткам различных фототрофных микроорганизмов в оптимизированных для них условиях

Вид фототрофных микроорганизмов	Концентрация раствора ПВС, использованного для иммобилизации клеток, %	Концентрация биомассы (по сух. в-вам) в иммобилизованном препарате, %	Жизнеспособность* после 1,5 лет хранения, %
Зеленые микроводоросли			
<i>C. vulgaris</i>	7,0	4,0	95 ± 3
<i>Dunaliella salina</i>	8,0	4,3	94 ± 4
<i>Nannochloropsis sp.</i>	7,5	3,8	93 ± 4
<i>Chlamydomonas sp.</i>	6,5	4,3	90 ± 3
<i>Chlorococcum sp.</i>	7,0	4,2	92 ± 3
<i>Cosmarium sp.</i>	8,0	3,7	94 ± 4
Красные микроводоросли			
<i>Galdieria partita</i>	8,0	4,1	91 ± 3
<i>Haematococcus pluvialis</i>	7,0	4,3	92 ± 3
Диатомовые микроводоросли			
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	8,7	4,0	95 ± 4
Сине-зелёные микроводоросли (цианобактерии)			
<i>Nostoc sp.</i>	6,5	4,0	91 ± 3
<i>Spirulina platensis</i>	6,0	3,8	90 ± 3
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	8,5	3,7	93 ± 4

* отношение скоростей накопления биомассы при использовании в качестве инокулята образца клеток до и после хранения

В сравнении с известными способами криоконсервации [Choudhary К. К., 2010, Tanniou А., 2012,] данный способ позволил не только повысить уровень жизнеспособности клеток (до 2-х раз), но и существенно упростить сам процесс криоконсервации.

Полученные результаты являются абсолютно конкурентоспособными по сравнению с аналогами, имеют высокую научную и практическую значимость, так как они оригинальны (получен Патент РФ на изобретение № 2508397, 2014) и могут быть использованы для хранения большого количества биоматериала, в том числе коллекционного.

Трансформация различного возобновляемого углеродсодержащего сырья в ЯК под действием ИБК, разработанного на основе иммобилизованных клеток бактерий *A. succinogenes*

Показано, что разработанный ИБК на основе иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes* может применяться для биотрансформации в ЯК широкого спектра возобновляемого сырья (показано на 18 видах субстратов), при этом в зависимости от сырья при $S_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л основные показатели процесса за 1 цикл лежат в диапазонах: $S_{\text{ЯК макс}} = 10\div 34$ г/л, $Y_{\text{ЯК/ВС}} = 0,42\div 0,69$, $Q_{\text{ЯК}} = 0,44\div 1,11$ г/л/ч, (Таблица 8).

Таблица 8 – Характеристики процессов трансформации гидролизатов различных видов возобновляемого сырья в ЯК под действием разработанного ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, иммобилизованных в криогель ПВС*

Гидролизат	$S_{\text{ВС0}}$, г/л	$S_{\text{ЯК}}$, г/л	$Y_{\text{ЯК/ВС}}$	$Q_{\text{ЯК}}$, г/л/ч	ПП _{ИБК} , ч
Целлюлозосодержащие отходы					
Пшеничная солома	66,4±2,6	33,7±1,3	0,68±0,02	1,06±0,03	600
Рисовая солома	66,5±2,1	31,4±1,5	0,60±0,03	1,08±0,03	420
Багасса	32,0±1,3	19,7±0,7	0,64±0,02	0,70±0,01	600
Свекловичный жом	44,2±1,8	23,9±1,2	0,57±0,03	1,01±0,01	410
Осиновые опилки	64,2±2,9	29,6±1,6	0,59±0,03	1,08±0,03	396
Березовые опилки	58,4±2,5	30,8±1,3	0,61±0,03	1,04±0,02	420
Сосновые опилки	64,8±2,3	29,4±1,2	0,60±0,03	1,07±0,03	396
Клубни топинамбура	74,6±3,2	16,2±1,1	0,42±0,01	0,63±0,01	596
Стебли топинамбура	62,2±1,9	15,3±0,9	0,43±0,02	0,70±0,02	476
Фототрофные микроорганизмы					
<i>C. vulgaris</i>	45,2±1,7	29,5±1,7	0,69±0,03	1,05±0,06	594
<i>Arthrospira platensis</i>	36,7±1,1	18,7±0,7	0,62±0,02	0,66±0,01	424
<i>Cosmarium sp.</i>	52,5±1,7	31,1±1,3	0,66±0,02	1,11±0,03	536
<i>Dunaliella salina</i>	62,3±2,1	29,9±1,0	0,51±0,01	0,66±0,01	490
<i>Nannochloropsis sp.</i>	51,1±1,9	20,1±1,3	0,66±0,02	1,07±0,03	408
<i>Nostoc sp.</i>	47,3±1,1	15,4±0,6	0,59±0,02	0,77±0,02	432
Макроводоросли					
<i>Laminaria saccharina</i>	36,6±1,1	15,7±0,7	0,52±0,01	0,61±0,01	552
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	56,0±1,5	21,6±1,3	0,55±0,02	0,77±0,02	600
<i>Ulva lactuca</i>	24,1±0,8	10,1±0,4	0,49±0,01	0,44±0,01	504

* $S_{\text{ВС0}}$ – исходная концентрация ВС, г/л, $S_{\text{ЯК}}$ – концентрация янтарной кислоты, г/л, $Y_{\text{ЯК/ВС}}$ – степень конверсии потребленных ВС в ЯК, $Q_{\text{ЯК}}$ – продуктивность процесса по ЯК, г/л/ч, ПП_{ИБК} – период полуинактивации ИБК, ч

Возможность использования в качестве субстратов для получения ЯК биомассы фототрофных микроорганизмов и макроводорослей при использовании клеток бактерий *A. succinogenes* была продемонстрирована в этой работе впервые. Оказалось, что разработанный ИБК может длительно использоваться в периодическом процессе получения ЯК из возобновляемого сырья, период его полуинактивации в зависимости от исходного сырья составляет 396÷600ч, длительность его эффективного функционирования многократно превышает лучшие из известных аналогов.

Подходы к утилизации биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, использованных в процессах получения органических кислот из ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*

В работе была продемонстрирована возможность утилизации биомассы иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, использованных при многократном получении органических кислот из ферментолитатов клеток микроводорослей *C. vulgaris*, в процессах метаногенеза и быстрого пиролиза (Рисунок 5, Таблица 9).

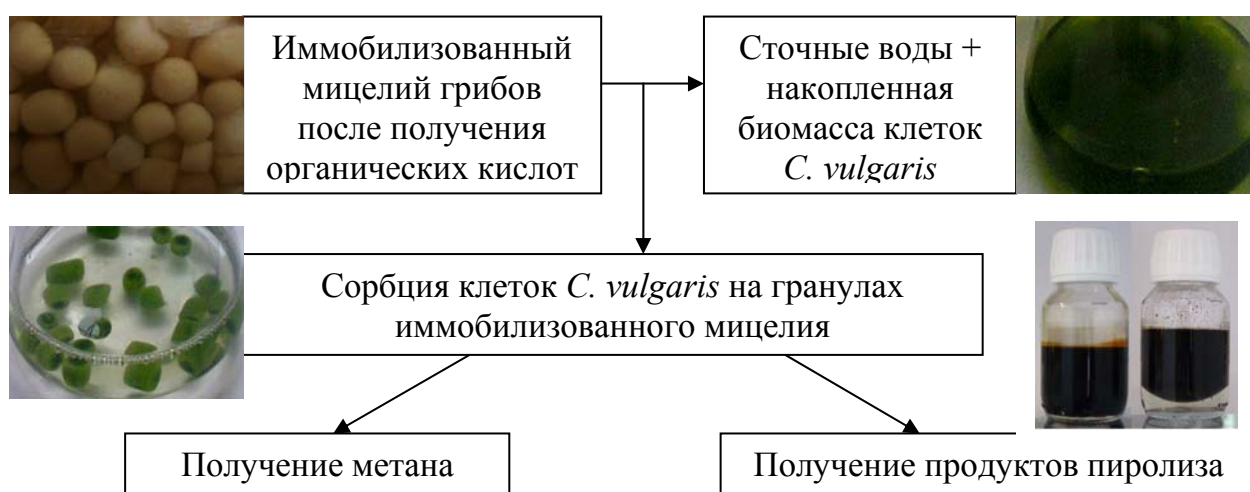


Рисунок 5 – Схема получения сорбированной на иммобилизованном грибном мицелии биомассы клеток *C. vulgaris* и ее конверсии в различные виды биотоплива

Таблица 9 – Результаты получения метана и бионефти с использованием различных типов биомассы в качестве исходного субстрата в процессах метаногенеза и быстрого пиролиза

Субстрат	Состав основных биоорганических компонентов, %			% конверсии в	
	липиды	белки	углеводы	метан	бионефть
Иммобилизованный мицелий <i>R. oryzae</i> F-1032	8,0±0,8	31,5±1,2	56,8±2,9	41,4±1,3	-
Биомасса <i>C. vulgaris</i>	17,1±0,9	9,9±0,5	55,5±2,5	67,6±2,1	50,5±2,1
Иммобилизованный мицелий <i>R. oryzae</i> F-1032 с сорбированной биомассой <i>C. vulgaris</i>	12,8±0,6	22,1±0,9	56,3±2,8	61,3±1,9	58,3±2,3

Использование биомассы иммобилизованных мицелиальных грибов в качестве субстрата для получения метана обеспечило выход продукта равный $41,4 \pm 1,3\%$. Была показана возможность увеличения выхода метана при обогащении биомассы мицелиальных грибов клетками микроводорослей *C. vulgaris* за счет кратковременного помещения гранул иммобилизованных мицелиальных грибов в сточные воды с накопленной биомассой микроводорослей *C. vulgaris*. Использование полученной «смешанной» биомассы в качестве субстрата для получения метана позволило увеличить выход метана на 20% (Таблица 9), что сделало процесс более интересным с точки зрения его возможной практической реализации. При быстром пиролизе полученной смешанной биомассы ($500\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 мин) выход жидкой фракции (так называемой бионефти или пиролизной нефти) составил $58,3 \pm 2,3\%$. При этом хромато-масс-спектрометрический анализ полученной бионефти показал наличие в ней алифатических длинноцепочечных нитрилов – потенциальных компонентов современных ракетных топлив.

Биотехнологический комплекс для накопления биомассы микроводорослей в процессе очистки сточных вод и ее последующей трансформации в органические кислоты и ПГА

Анализ и обобщение полученных в работе результатов с учетом актуальных задач и перспективных направлений развития современной биотехнологии позволили сформулировать концепцию биотехнологического комплекса (Рисунок 6), которая может иметь в потенциале практическую реализацию.

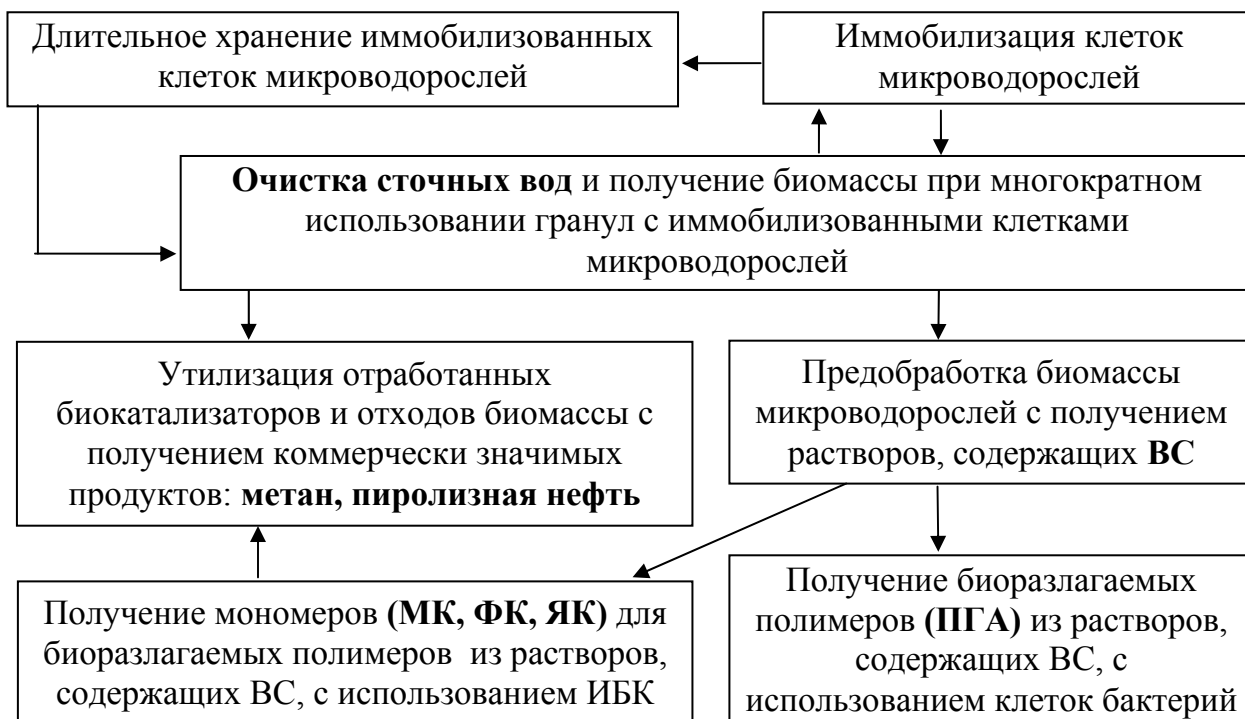


Рисунок 6 – Концепция биотехнологического комплекса экологически эффективных биокаталитических процессов на основе использования биомассы микроводорослей, накапливающейся при очистке сточных вод, направленных, главным образом, на ее трансформацию в мономеры для полимерного синтеза и получение биополимеров в виде ПГА

В составе комплекса может быть обеспечено накопление клеток микроводорослей с одновременной очисткой сточных вод и последующее использование биомассы для ее трансформации в целевые коммерчески значимые продукты в виде мономеров, пригодных для получения биоразлагаемых полимерных материалов, а также для получения таких биополимеров, как ПГА, и кроме того могут быть получены продукты переработки отходов основного производства (биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток мицелиальных грибов) в метан и бионефть.

Выводы

1. Установлена возможность использования иммобилизованных клеток микроводорослей *C. vulgaris* С-1 в качестве инокулята для накопления биомассы в процессе очистки сточных вод с одновременным снижением уровня ХПК в 2÷8 раз. Получаемая при этом биомасса свободных клеток микроводорослей характеризуется постоянством доли углеводов в её составе, обеспечивающим возможность её прикладного использования.

2. Применение кислотного гидролиза биомассы *C. vulgaris* обеспечивает быстрое получение сред с высоким выходом ВС (76,13±2,41%), но содержащих муравьиную кислоту, фурфурол и оксиметилфурфурол, токсичные для микробных продуцентов. Эти среды могут быть пригодны для химической промышленности. Механическая дезинтеграция клеток микроводорослей *C. vulgaris* в сочетании с ферментативным гидролизом позволяет получать нетоксичные гидролизные среды с высоким выходом ВС (81÷89%) от общего содержания углеводов в исходной биомассе.

3. Предложены условия оптимального применения иммобилизованных клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* в процессах биотрансформации ВС, содержащихся в ферментолизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в молочную и фумаровую кислоты. В результате в сравнении с ранее известными данными для молочной кислоты показатели продуктивности процесса были увеличены в 142 раза, для фумаровой – более, чем в 200 раз.

4. Создан оригинальный высокоэффективный биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes* В-10111 для получения янтарной кислоты. Его использование в сравнении со свободными клетками обеспечило повышение уровня максимального накопления ЯК в глюкозосодержащих средах в одном рабочем цикле в 1,4 раза и увеличило общую длительность эффективного использования продуцента, как минимум, в 19 раз. Впервые для получения ЯК продемонстрирована возможность применения в качестве субстратов биомассы различных фототрофных микроорганизмов, включая клетки микроводорослей *C. vulgaris*, и макроводорослей.

5. Впервые установлено, что для биотехнологического процесса получения ПГА в составе клеток *C. necator* В-8619 перспективным субстратом является биомасса микроводорослей. Предложенный субстрат обеспечивает увеличение в 4,6 и более раз скорости накопления ПГА в составе биомассы продуцента по сравнению с литературными данными.

6. Разработан оригинальный способ иммобилизации клеток фототрофных микроорганизмов в криогель ПВС, апробированный на 12 культурах, обеспечивающий высокую длительность хранения клеток (не менее 1,5 лет) при высоком уровне сохранения у них способности к пролиферации (на 90÷95%) и до 2-х раз превосходящий по этим характеристикам аналоги.

7. Предложен подход к утилизации иммобилизованной в криогель ПВС биомассы мицелиальных грибов, использованных для получения органических кислот, методами метаногенеза и быстрого пиролиза с получением, соответственно, метана (с выходом 61,3±1,9%) или пиролизной нефти (с выходом 58,3±2,3%), в которой отмечено наличие длинноцепочечных нитрилов.

8. Пошагово разработана и сформулирована оригинальная концепция биотехнологического комплекса, сочетающего в себе эффективные биокаталитические процессы, направленные на трансформацию биомассы микроводорослей, накапливаемой в процессе очистки сточных вод различного состава в коммерчески значимые продукты (молочную, фумаровую, янтарную кислоты, ПГА, метан и пиролизную нефть).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Ф. Мамедова**, А.Б. Никольская, Е.Н. Ефременко. Исследование возможности использования сточных вод для накопления биомассы микроводорослей. // *Вестник КузГТУ*, 2013, №1, с. 113 – 115. (ВАК)

2. Е.Н. Ефременко, А.Б. Никольская, **Ф. Мамедова**, О.В. Сенько, Л.И. Трусков. Полунепрерывный и непрерывный процесс накопления биомассы клеток микроводорослей *Chlorella vulgaris* в минеральной среде. // *Альтернативная энергетика и экология*, 2013, № 2 (119), с. 44 – 49. (ВАК)

3. E.N. Efremenko, A.B. Nikolskaya, I.V. Lyagin, O.V. Senko, T.A. Makhlis, N.A. Stepanov, O.V. Maslova, **F. Mamedova**, S.D. Varfolomeyev. Production of biofuels from pretreated microalgae biomass by anaerobic fermentation with immobilized *Clostridium acetobutylicum* cells. // *Bioresource Technology*, 2012, V.114, p. 342 – 348. (ВАК) (IF 5,600)

4. А.Б. Никольская, А.В. Холстов, И.В. Лягин, **Ф. Мамедова**, Е.Н. Ефременко, С.Д. Варфоломеев. Иммобилизованные клетки *Chlorella vulgaris* для решения задач альтернативной энергетике и экологии. // *Альтернативная энергетика и экология*, 2012, № 4 (108), с. 95 – 100. (ВАК)

5. Е.Н. Ефременко, О.В. Сенько, Т.А. Махлис, **Ф. Мамедова**, А.В. Холстов, С.Д. Варфоломеев. Способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов. // Патент РФ на изобретение №2508397, опубликовано 27.02.2014, Бюл №6.

6. Е.Н. Ефременко, О.В. Сенько, Н.А. Степанов, И.В. Лягин, **Ф. Мамедова**, О.В. Маслова, Т.А. Махлис. Биомасса фототрофных микроорганизмов – перспективный субстрат биотехнологии. // Рос. конф. “85 лет: Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова 1929-2014”. Москва, 2014, 27 ноября, с. 12 – 13.

7. О.В. Сенько, Н.А. Степанов, **Ф. Мамедова**, О.В. Маслова. Биомасса макроводорослей как перспективный субстрат для биотехнологического получения органических кислот. // I Междунар. конф. молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. Новосибирск, 2014, 7 октября, с. 7 – 8.
8. О.В. Маслова, Н.А. Степанов, **Ф. Мамедова**, Е.Н. Ефременко. Новый высокоэффективный биокатализатор на основе клеток *Actinobacillus succinogenes* для получения янтарной кислоты. // Междисциплин. науч. форум Moscow Science Week. Москва, 2014, 8-12 сентября, с. А44.
9. **Ф. Мамедова**, О.В. Сенько, Е.Н. Ефременко. Сравнение эффективности предобработки различными способами биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris*. // Междисциплин. науч. форум Moscow Science Week. Москва, 2014, 8-12 сентября, с. В13.
10. О.В. Сенько, **Ф. Мамедова**, Н.А. Степанов, Е.Н. Ефременко. Биокаталитическое получение фумаровой кислоты из непищевого возобновляемого сырья. // Междунар. конф. “Биотехнология. Взгляд в будущее”. Казань, 2013, 26-27 марта, с. 324.
11. А. Docenko, **F. Mamedova**, O.V. Senko, E.N. Efremenko. Pretreatment of renewable carbonaceous raw materials for effective biotransformation into organic acid. // Internat. conf. “Biocatalysis-2013: Fundamentals & Applications”. Москва, 2013, 2-5 июля, с. 106 – 107.
12. О.В. Сенько, Н.А. Степанов, **Ф. Мамедова**, О.В. Маслова, Е.Н. Ефременко. Сырьевые источники биокаталитического получения органических кислот. // V Междунар. науч.-практ. конф. “Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины”. Ростов-на-Дону, 2013, 3-5 октября, с. 182.
13. I.V. Lyagin, O.V. Senko, A.B. Nikolskaya, **F. Mamedova**, N.A. Stepanov, D.T. Tran, T.S. Do, E.N. Efremenko. Conversion of renewable resources into products useable for chemical and fuel industries. // Internat. symposium of marine enzyme and polysaccharides. Nha Trang, Vietnam, 2012, 10-17 December, p. 19.
14. **Ф. Мамедова**, Е.Н. Ефременко. Исследование характеристик процесса накопления биомассы микроводорослей в промышленных сточных водах. // XII Ежегод. междунар. молод. конф. “ИБХФ РАН-Вузы”. Москва, 2012, 29-31 октября, с. 102 – 104.