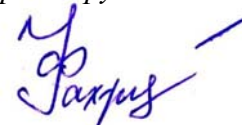


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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)

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
профессор, д.б.н., Ефременко Е.Н.

МОСКВА - 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Биомасса фототрофных микроорганизмов как перспективный сырьевой источник для биотехнологических процессов	14
1.2 Хранение культур фототрофных микроорганизмов	20
1.3 Предобработка биомассы фототрофных микроорганизмов для дальнейшего получения различных биопродуктов	26
1.4 Трансформация биомассы фототрофных микроорганизмов в полупродукты для синтеза биоразлагаемых полимеров	30
1.4.1 Органические кислоты – мономеры для получения биоразлагаемых полимеров	34
1.4.2 Полигидроксиалканоаты – микробные полимеры для получения биоразлагаемых композиционных материалов	40
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1 Материалы	44
2.1.1 Химические реактивы	44
2.1.2 Приборы	45
2.1.3 Микроорганизмы	46
2.1.4 Источники углеводсодержащего сырья, использованного в работе	46
2.2. Методы	47
2.2.1 Культивирование клеток различных микроорганизмов	47
2.2.2 Иммобилизация микроорганизмов в криогель поливинилового спирта	48
2.2.3 Анализ состава биоорганических компонентов биомассы клеток микроорганизмов	49
2.2.3.1 Определение сухого веса (влажности) биомассы клеток микроорганизмов	49
2.2.3.2 Определение содержания липидов	50
2.2.3.3 Определение содержания белков	50
2.2.3.4 Определение содержания углеводов	51
2.2.3.4.1 Определение содержания целлюлозы в биомассе микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	51
2.2.3.4.2 Определение содержания крахмала в биомассе микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	51

2.2.4	Определение концентрации внутриклеточного АТФ биолюминесцентным методом	51
2.2.5	Проведение и оценка эффективности гидролиза клеток микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	53
2.2.5.1.	Проведение кислотного гидролиза	53
2.2.5.2	Проведение ферментативного гидролиза	54
2.2.6	Получение органических кислот	55
2.2.7	Биосорбция клеток микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	55
2.2.8	Получение метана	56
2.2.9	Получение пиролизной нефти	56
2.2.10	Получение ПГА	56
2.2.11	Определение ХПК	57
2.2.12	Определение концентрации ВС	57
2.2.13	Определение концентрации глюкозы	57
2.2.14	Определение концентрации органических кислот	57
2.2.15	Определение содержания ПГА	59
2.2.16	Определение концентрации продуктов трансформации сахаров в кислотных гидролизатах биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	59
2.2.17	Оценка токсичности гидролизатов биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i> с использованием иммобилизованных клеток фотобактерий <i>P. phosphoreum</i>	59
2.2.18	Определение кинетических параметров процессов	60
	ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1	Исследование процесса накопления биомассы клеток микроводорослей <i>C. vulgaris</i> в сточных водах разного состава	62
3.1.1	Культивирование свободных клеток микроводорослей <i>C. vulgaris</i> в сточных водах	62
3.1.2	Влияние иммобилизации клеток микроводорослей <i>C. vulgaris</i> на процесс накопления их биомассы	67
3.2	Выбор способа гидролиза полисахаридов, входящих в состав биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	79
3.2.1	Неферментативные способы предобработки биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	81
3.2.2	Ферментативная обработка биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	89

3.2.3 Сравнительный анализ эффективности различных способов предобработки биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	101
3.3 Трансформация ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i> в органические кислоты – мономеры для получения биоразлагаемых полимеров, и биополимеры - полигидроксиалканоаты	105
3.3.1 Получение молочной и фумаровой кислот с использованием биокатализаторов в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиальных грибов вида <i>Rhizopus oryzae</i>	106
3.3.1.1 Получение молочной кислоты с использованием иммобилизованного биокатализатора (ИБК) на основе клеток мицелиального гриба <i>Rhizopus oryzae</i> F-814	106
3.3.1.2 Получение фумаровой кислоты с использованием ИБК на основе клеток мицелиального гриба <i>Rhizopus oryzae</i> F-1032	111
3.3.2 Получение янтарной кислоты с использованием биокатализатора в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий <i>Actinobacillus succinogenes</i> B-10111	114
3.3.2.1 Характеристики процесса получения ЯК под действием свободных клеток бактерий <i>A. succinogenes</i> B-10111	115
3.3.2.2 Разработка биокатализатора в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий <i>A. succinogenes</i> B-10111 и исследование его свойств	118
3.3.2.2.1 Оптимизация состава ИБК на основе клеток бактерий <i>A. succinogenes</i> , включенных в криогель ПВС	118
3.3.2.2.2 Исследование основных функциональных и каталитических характеристик разработанного ИБК на основе клеток бактерий <i>A. succinogenes</i> , включенных в криогель ПВС	120
3.3.2.2.3 Трансформация ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i> в ЯК под действием ИБК на основе клеток бактерий <i>A. succinogenes</i> , включенных в криогель ПВС	125
3.3.3 Использование ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i> в качестве субстрата для накопления полигидроксиалканоатов бактериями <i>Cupriavidus necator</i> B-8619	129
3.4 Оценка научно-практического потенциала полученных в данной работе результатов	139
3.4.1 Определение возможности и эффективности использования разработанного	139

способа иммобилизации клеток микроводорослей <i>C. vulgaris</i> в отношении клеток различных фототрофных микроорганизмов	
3.4.2 Трансформация различного возобновляемого углеродсодержащего сырья в ЯК под действием ИБК, разработанного на основе иммобилизованных клеток бактерий <i>A. succinogenes</i>	142
3.4.3 Подходы к утилизации биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, использованных в процессах получения органических кислот из ферментолитатов биомассы микроводорослей <i>C. vulgaris</i>	144
3.5 Биотехнологический комплекс для накопления биомассы микроводорослей в процессе очистки сточных вод и ее последующей трансформации в органические кислоты и ПГА	153
ВЫВОДЫ	157
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	159

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АДФ – аденозиндифосфат

БМ – биомасса

ВКПМ – Всероссийская Коллекция Промышленных Микроорганизмов

ВС – восстанавливающие сахара

ГЛ – глюкоза

ДМСО – диметилсульфоксид

ИБК – иммобилизованный биокатализатор

ИБХФ – Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля

ИЖ – ионные жидкости

МГУ – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

МК – молочная кислота

$P_{\text{ИБК}}$ – продуктивность иммобилизованного биокатализатора, г ЯК(МК,ФК)/ч/кг ИБК

ПВС – поливиниловый спирт

ПГА – полигидроксиалканоат

$P_{\text{ИБК}}$ – период полуинактивации иммобилизованного биокатализатора, ч

ФК – фумаровая кислота

ХПК – химическое потребление кислорода

ЦСО – целлюлозосодержащие отходы

ЦСС – целлюлозосодержащее сырьё

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯК – янтарная кислота

TRIS - трис(гидроксиметил)аминометан

[Bmim]Cl – 1-бутил-3-метилимидазолий хлорид

$C_{\text{БМ}}$ – концентрация биомассы, г сух. в-в/л

$C_{\text{БМО}}$ – исходная концентрация биомассы, г сух. в-в/л

$C_{\text{ВС}}$ – концентрация восстанавливающих сахаров, г/л

$C_{\text{ВС0}}$ – исходная концентрация восстанавливающих сахаров, г/л

$C_{\text{ГЛ}}$ – концентрация глюкозы, г/л

$C_{\text{ГЛ0}}$ – исходная концентрация глюкозы, г/л

$C_{\text{ИБК}}$ – концентрация иммобилизованного биокатализатора (по сухим веществам), г/л

$C_{\text{ПГА}}$ – концентрация полигидроксиалканоатов, г/л

$C_{\text{УГЛ}}$ – концентрация углеводов, г/л

$C_{\text{ЯК(МК,ФК)}}_{\text{макс}}$ – максимальная концентрация янтарной (молочной, фумаровой) кислоты, г/л

Q_C – продуктивность процесса по биомассе (скорость накопления биомассы), г(мг) сух. в-в/л/ч(сут)

$Q_{\text{ВС}}$ – средняя скорость накопления восстанавливающих сахаров, г/л/ч

$Q_{\text{ГЛ}}$ – средняя скорость накопления глюкозы, г/л/ч

$Q_{\text{ПГА}}$ – средняя скорость накопления полигидроксиалканоатов, мг/л/ч

$Q_{\text{ЯК(МК,ФК)}}$ – продуктивность процесса по янтарной (молочной, фумаровой) кислоте, г/л/ч

V_0 - начальная скорость гидролиза углеводов до восстанавливающих сахаров, г/л/сут

$Y_{\text{ВС}}$ – выход восстанавливающих сахаров, % от общего количества углеводов

$Y_{\text{ГЛ}}$ – выход глюкозы, % от общего количества углеводов

$Y_{\text{ЯК(МК,ФК)}/\text{БМ}}$ - степень конверсии биомассы в янтарную (молочную, фумаровую) кислоту

$Y_{\text{ЯК(МК,ФК)}/\text{ВС}}$ – степень конверсии потребленных восстанавливающих сахаров в янтарную (молочную, фумаровую) кислоту

$Y_{\text{ЯК(МК,ФК)}/\text{УГЛ}}$ - степень конверсии углеводов в янтарную (молочную, фумаровую) кислоту

μ – удельная скорость роста клеток, ч⁻¹ или сут⁻¹

$\Delta C_{\text{ВС}}$ – потребление восстанавливающих сахаров, %

$\Delta C_{\text{ГЛ}}$ – потребление глюкозы, %

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире в стадии масштабно внедряемых или только разрабатываемых находится большое количество различных технологий использования биомассы в энергетических и сырьевых целях. Поиски продуктивных видов биомассы для получения энергии выдвигают в разряд **перспективных** источников фототрофные микроорганизмы. При разработке таких биотехнологических процессов важно не только учитывать возможность получения различных целевых продуктов из используемой биомассы, но и организовать безопасное производство с минимальной нагрузкой на окружающую среду. Этим требованиям вполне отвечает биомасса микроводорослей.

По состоянию на 2010 г. мировое производство биомассы микроводорослей составляло более 7000 т/год, основная масса которого приходилась на США, Китай, Индию, Японию, Германию, Австралию, Израиль и Тайвань. Такие микроводоросли, как *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Cryptocodinium cohnii* и *Botryococcus braunii* используются в пищевой и фармацевтической промышленности, в производстве косметики, биотоплива, кормов для животных и др. [1, 2]. Коммерческим производством биомассы микроводорослей занимаются такие компании, как Royal, Dutch Shell (на Гавайских островах), Algae BioFuels (США, Алабама), Aquaflow Bionomic Corporation (Новая Зеландия), Mitsubishi (Япония) и др. Крупнейшим в Европе производителем биомассы микроводорослей является биотехнологическая компания Ingrepro B.V. (Нидерланды), которая известна большим опытом в реализации технологических схем выращивания клеток микроводорослей с целью получения обогащенной липидами биомассы. В частности, одним из основных объектов ее разработок, задействованных в технологических схемах фототрофного культивирования, являются клетки рода *Chlorella* [3]. Сегодня турецкая компания Agro Hayat LLC (Турция) предлагает целый ряд коммерческих решений по производству биомассы микроводорослей [4], поскольку она располагает готовыми комплексными решениями по выращиванию клеток микроводорослей родов *Chlorella*, *Spirulina*, и *Dunaliella* в различных масштабах.

Интерес к фототрофным микроорганизмам определяется более высокой скоростью накопления биомассы (в 20–30 раз) в сравнении с традиционными сельскохозяйственными культурами. Подсчитано, что для производства 1 кг биомассы требуется в 10–30 раз меньшие площади, причем, для этого можно использовать непригодные для сельскохозяйственного культивирования или требующие рекультивации земли [5].

Согласно концепции устойчивого развития человечества **актуальными** задачами современного общества является рациональное использование природных ресурсов,

снижение экологической нагрузки и построение рациональной экологически устойчивой и экономически обоснованной социальной системы. Наибольшую **практическую** значимость представляют собой процессы, обеспечивающие за счет утилизации существующих отходов и трансформации возобновляемых ресурсов получение коммерчески ценных продуктов безотходным способом.

Микроводоросли представляют собой достаточно эффективный преобразователь солнечной энергии с хорошо организованными стадиями восстановления CO_2 до целого комплекса энергоёмких биомолекул, включающих углеводы, белки, липиды, которые могут быть подвергнуты дальнейшей биотехнологической трансформации в различные целевые продукты.

Известно, что некоторые микроводоросли входят в состав активного ила [6] и могут использовать не только CO_2 в качестве основного источника углерода, но и органические соединения. Однако процессы очистки сточных вод с использованием активного ила характеризуются наличием ограничений по значениям исходных величин химического потребления кислорода (ХПК) сточных вод. В связи с этим для эффективной и глубокой очистки часто требуется значительное разбавление исходного образца сточных вод и поддержание в системе высоких концентраций биомассы для достижения высокой скорости снижения ХПК. Очевидно, что в процессе очистки сточных вод происходит накопление биомассы активного ила, которая, как правило, характеризуется непостоянством 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. Использование избыточной биомассы активного ила ограничивается его использованием в качестве биоудобрения в сельском хозяйстве и в качестве сырья для получения метана [7, 8]. 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 является весьма **перспективным**, поскольку позволяет объединить технологии биологической очистки водных ресурсов и накопления биомассы микроводорослей, являющейся ценным сырьем для получения различных промышленных продуктов. Такой процесс может стать экономически обоснованным дополнением процессу на основе активного ила, традиционно используемому для очистки сточных вод. Важно, что при культивировании микроводорослей в сточных водах не требуется экономических и

энергетических затрат, связанных с аэрацией среды. Важным, с **научной** и **практической** точек зрения, является разработка и исследование новых биотехнологических процессов с использованием клеток микроводорослей в процессах очистки сточных вод и последующая трансформация полученной таким образом возобновляемой биомассы в коммерчески значимые продукты.

Помимо очистки сточных вод в настоящее время перед мировым сообществом остро стоит глобальная экологическая проблема, связанная с утилизацией отходов различного происхождения. Так, основную часть бытовых отходов среднестатистического жителя мегаполиса в настоящее время составляют упаковочные материалы двух видов, одна часть из них (бумага, картон и т.п.) производится из возобновляемых целлюлозосодержащих ресурсов (древесина), вторая часть (пленки, пакеты, пластиковые бутылки, контейнеры и т.п.) - из невозобновляемых ресурсов (нефть и газ) [9]. Раздельный сбор всех этих отходов и их вторичная переработка, как показывает практика, пока нереализуемы в основном из-за “человеческого фактора” и низкого уровня “экологической культуры”. В связи с этим на данном этапе развития общества с целью снижения экологической нагрузки наиболее приемлемой является быстрая утилизация этих отходов. С первым видом упаковочных материалов проблема утилизации стоит не так остро, так как процесс их разложения на свалках в зависимости от условий окружающей среды длится в среднем 1-6 месяцев (газетная бумага, картон и коробки из него). Наиболее остро и **актуально** стоит проблема утилизации второго вида упаковочных материалов, разложение которых в естественных условиях длится до 200 лет [9]! В связи с этим в последние 20 лет ведется активный поиск возможностей получения, так называемых, биоразлагаемых полимерных материалов, которые должны заменить традиционно используемые полимерные материалы, в том числе упаковочные. Наибольший научный и **практический** интерес в этой области представляет получение таких полимерных материалов, мономерами или исходными соединениями для производства которых являются получаемые биотехнологическим способом органические кислоты: молочная, фумаровая, янтарная (сам процесс полимеризации осуществляется химическим путем), а также полупродукты для органического синтеза, получаемые в одностадийном биотехнологическом процессе, например, полигидроксиалканоаты (ПГА) [10]. **Актуальным** является расширение сырьевой базы для их биотехнологического производства, главным образом, за счет использования возобновляемых ресурсов.

Иммобилизация клеток и их использование в качестве биокатализаторов в различных современных биотехнологических процессах экологической направленности на многочисленных примерах подтвердили своё преимущество и перспективность их внедрения

за счёт упрощения технологического оформления процессов с их участием, возможности их длительного хранения и многократного применения, а также продолжительного периода полуинактивации. Криогель поливинилового спирта (ПВС) оказался одним из наиболее перспективных носителей для иммобилизации клеток различных микроорганизмов, применяемых в различных биотехнологических процессах. Сегодня несомненный **научный** интерес представляет исследование возможности получения новых высокоэффективных иммобилизованных биокатализаторов (ИБК) с использованием этого носителя, изучение их свойств и прогнозирование и расширение направлений их использования.

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

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

Для достижения этой цели были сформулированы 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 восстанавливающих сахаров (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 молочную и фумаровую кислоты;
- 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 состоит в следующем:

- 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 ферментолизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в молочную и фумаровую кислоты;

- предложен подход к утилизации биомассы мицелиальных грибов рода *Rhizopus*, использованных в процессах многократного получения органических кислот, с применением методов метаногенеза и быстрого пиролиза (500 °С, 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 результатов, полученных в работе, заключается в том, что:

- 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 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; при этом значительно расширен спектр возможных источников сырья (биомассы фототрофных микроорганизмов, микроводорослей, целлюлозосодержащих отходов) для получения янтарной кислоты при использовании разработанного биокатализатора;

- 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 (молочная, фумаровая, янтарная кислоты) для синтеза биоразлагаемых полимеров.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биомасса фототрофных микроорганизмов как перспективный сырьевой источник для биотехнологических процессов

Химический состав накапливающейся биомассы фототрофных микроорганизмов позволяет далее использовать ее для получения целого спектра ценных коммерчески значимых продуктов: белков, углеводов, липидов, витаминов, антиоксидантов, аминокислот, макро- и микроэлементов в биодоступной органической форме, биогаза, водорода, биоэтанола, биобутанола, биодизеля, полиненасыщенных жирных кислот [11-16].

Установлено, что, изменяя условия культивирования, можно получать биомассу фототрофных микроорганизмов с различным содержанием углеводов, белков и липидов [17, 18]. При этом необходимо обеспечить сочетание достаточно большого количества факторов, влияющих на уровень накопления биомассы клеток и ее биоорганический компонентный состав, к которым относят: выбранный штамм фототрофного микроорганизма, исходную концентрацию клеток в среде, состав среды культивирования, интенсивность освещенности, температуру процесса. Так, снижение температуры культивирования с 30 до 25°C и введение в питательную среду 0,75 г·л⁻¹ NaNO₃ практически не влияет на скорость роста клеток *Chlorella vulgaris*, но приводит к увеличению содержания липидных компонентов в клетках с 5,9 до 14%, в результате чего увеличивается выход липидов с 8 до 20 мг/л/сут [14]. Очевидно, что изменения содержания липидов в составе биомассы фототрофных микроорганизмов приводят и к варьированию доли других биоорганических компонентов биомассы – углеводов и белков. А это означает, что, в принципе, можно добиваться направленного получения клеток с желаемым биохимическим составом при целенаправленном выращивании клеток фототрофных микроорганизмов в специальных средах в фотобиореакторах.

В Таблице 1 приведены различные возможные режимы культивирования фототрофных микроорганизмов. Стандартные схемы их выращивания включают в себя главным образом фотобиореактор, в котором непосредственно проходит культивирование клеток. Этот реактор должен обеспечивать максимально возможное накопление биомассы за наиболее короткие периоды времени, что определяется условиями культивирования микроорганизмов.

Сегодня для реализации биосинтетических возможностей природных и генетически модифицированных штаммов микроводорослей-автотрофов используются два типа фотобиореакторов: закрытые и открытые. Закрытые фотобиореакторы обеспечивают контролируемые условия культивирования фототрофов и высокий выход биомассы, но они

Таблица 1 – Характеристики возможных способов культивирования фототрофных микроорганизмов в различных условиях [19, 20]

Способ культивирования	Источник энергии	Источник углерода	Уровень накопления биомассы клеток	Тип реактора	Цена	Особенности масштабирования
Фототрофный	Свет	Неорганический (как правило, газовые выбросы теплостанций)	Низкий	Открытый водоем или фотобиореактор	Низкая	Низкая плотность клеток, сильное испарение воды
Гетеротрофный	Органические вещества	Органический	Высокий	Обычный ферментер	Средняя	Высокая возможность микробной контаминации, высокая стоимость субстратов
Миксотрофный	Свет, органические вещества	Органический и неорганический	Средний	Закрытый фотобиореактор	Высокая	Возможность микробной контаминации, высокая стоимость субстратов

имеют высокую стоимость. Открытые водоёмы значительно дешевле, но легко подвергаются контаминации (загрязнению), и только некоторые микроводоросли (родов *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*) оказались способными к широкомасштабному культивированию в различных условиях. При фототрофном режиме культивирования повышение интереса к производству микроводорослей достигается использованием низкопотенциальных сбросов тепла и газовых выбросов теплостанций, отходов животноводческих комплексов и т.д. [21].

Как правило, для увеличения скорости роста фототрофных микроорганизмов применяют гетеро- или миксотрофные условия культивирования с использованием сред, в которых в качестве органического источника углерода чаще всего используют глюкозу [22, 23], ацетат [22, 24] или глицерин [22, 25]. Так было показано, что скорость накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в миксотрофных условиях в 9-25 раз выше, чем в фотоавтотрофных [22].

Выбор быстро растущих, продуктивных штаммов имеет принципиальное значение для успешного использования биомассы фототрофных микроорганизмов и особенно для низкой стоимости продуктов, получаемых из этой биомассы. Быстрый рост обеспечивает высокую продуктивность биомассы, а это приводит к высокой её плотности и уменьшает стоимость процесса концентрирования клеток микроорганизмов. Высокие темпы роста также уменьшают риск микробной контаминации сред с микроводорослями.

Одними из наиболее продуктивных считаются микроводоросли рода *Chlorella* обитающие преимущественно в естественных пресных водоемах, однако способные к развитию и в морской воде [26]. Этот род микроводорослей известен давно и хорошо изучен [27], что, безусловно, является явным преимуществом для их применения в промышленности.

Наряду с высокой продуктивностью биомассы, эти клетки обладают рядом особенностей, позволяющих считать их наиболее подходящими для использования в биотехнологических процессах в качестве субстрата. Преимуществом микроводорослей, относящихся к роду *Chlorella*, является их исключительная приспособляемость к изменениям окружающей среды [28]. Обладая очень «пластичным» метаболизмом, клетки микроводорослей рода *Chlorella* могут использовать не только неорганические, но и органические источники углерода [22]. В этой связи огромен интерес к использованию сточных вод различного химического состава для накопления биомассы микроводорослей.

В классических биореакторах для культивирования микроводорослей обычно используют синтетические питательные среды. Однако при использовании таких сред себестоимость получаемой биомассы оказывается достаточно высокой, поскольку требует

использования набора различных веществ, входящих в состав сред, их взвешивания, транспортировки к месту наращивания микроводорослей и растворения. Одним из способов повышения экономической эффективности выращивания клеток является использование сточных вод, загрязненных различными соединениями, способными выполнять роль компонентов питательных сред для клеток микроводорослей (Рисунок 1). Это позволяет удешевить питательную среду и решить проблему очистки сточных вод и накопления целевой биомассы [29].

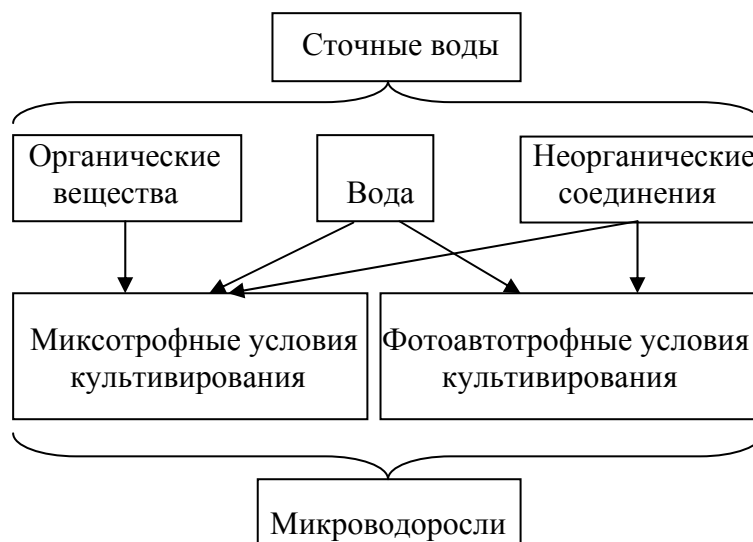


Рисунок 1 – Идеология использования сточных вод для культивирования клеток микроводорослей

При анализе затрат на ресурсы, необходимые для получения биомассы микроводорослей, было установлено, что вода и неорганические вещества являются наиболее важными дорогостоящими компонентами среды [30]. Было показано, что использование сточных вод для накопления биомассы микроводорослей с целью получения липидов, позволило, например, сократить расход воды на 90%, а также удовлетворить потребность клеток во всех неорганических веществах за исключением фосфора [30]. Помимо неорганических питательных веществ, часть органических веществ в сточных водах, могут также быть использованы для миксотрофного роста микроводорослей.

Несмотря на то, что сточные воды способны обеспечить основные ресурсы для роста микроводорослей, они пока не нашли применения в тех компаниях, которые сегодня уже активно занимаются производством биомассы микроводорослей. Основную разницу между сточными водами и искусственными питательными средами обуславливает сложный химический состав первых. Концентрация таких элементов, как фосфор и азот, варьируется в них в большом диапазоне. Часто азот в сточных водах представлен соединениями аммония,

которые могут в высоких концентрациях значительно ингибировать рост микроводорослей [31, 32]. Кроме того, сточные воды могут также содержать различные химические (кадмий, ртуть и цинк) [33] или биотические ингибиторы [34] развития микроводорослей. В сточных водах пищевой промышленности органические вещества могут стимулировать рост других микроорганизмов, например бактерий, которые будут конкурировать с микроводорослями за усвоение необходимых питательных веществ.

Поскольку вопрос об использовании сточных вод для роста клеток фототрофов очень актуален, то в настоящее время много научных коллективов вовлечено в исследование процессов культивирования биомассы фототрофных микроорганизмов с использованием сточных вод различных производств (Таблица 2). Однако все они отмечают тот факт, что, несмотря на то, что микроводоросли способны расти в самых разнообразных условиях, не каждый штамм фототрофных микроорганизмов способен адаптироваться к росту на сточных водах.

Как правило, на сточных водах культивируют штаммы, способные к миксотрофному росту, поскольку в этом случае возможна параллельная утилизация неорганических и органических источников углерода. Поскольку различные сточные воды содержат, соответственно, и различные источники углерода, то необходимо осуществлять предварительный скрининг культур, культивирование которых возможно на имеющейся сточной воде. Согласно данным, имеющимся в литературе, наиболее адаптируемыми к различным условиям окружающей среды, являются микроводоросли рода *Chlorella*, *Botryococcus*, *Scenedesmus* [28], при этом представители рода *Chlorella* обладают наилучшими показателями по скоростям накопления биомассы (Таблица 2).

Одним из решений проблем адаптации клеток микроводорослей к различным сточным водам может быть использование иммобилизованного инокулята культуры для интенсификации процесса накопления биомассы. Иммобилизация клеток микроводорослей и их использование на первоначальном этапе культивирования может обеспечить возможность регуляции их концентрации и повышения их резистентности к содержанию токсичных компонентов, высоким концентрациям органических или неорганических веществ.

Обзор информационных источников показал, что некоторые исследователи уже провели первые эксперименты по культивированию иммобилизованных клеток микроводорослей рода *Chlorella* на различных видах сточных вод (Таблица 3). В качестве носителя для иммобилизации в основном использовались гели, главным образом Са-альгинатный гель. Однако, несмотря на то, что клетки микроводорослей могли расти в иммобилизованном виде, скорость их роста была тем не менее ниже скорости роста свободных клеток в тех же условиях.

Таблица 2 – Скорость накопления биомассы клеток микроводорослей, выращенных в сточных водах

Микроводоросли	Источник сточных вод	Скорость накопления биомассы, мг сух. в-в/л/сут	Ссылка
<i>Chlorella sp.</i>		2,6 г/м ² /сут	[35]
		81	[36]
<i>Chlorella sp.</i> , <i>Micractinium sp.</i> , <i>Actinastrum sp.</i>	Молочное производство	59	[37]
<i>Chlorella sp.</i>	Модельные сточные воды,	43	[38]
<i>Chlorella vulgaris</i>	имитирующие бытовые	90	[39]
	Бытовые стоки	65	
	Модельные сточные воды, содержащие нонилфенол	93	[40]
	Бытовые стоки	62	[41]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Производство биогаза	39	[42]
<i>Chlorella saccharophila</i>	Производство ковров	23	[43]
<i>Botryococcus braunii</i>		34	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>		28	
<i>Pleurochrysis carterae</i>		33	
<i>Scenedesmus sp.</i>	Сельскохозяйственные стоки	6	[44]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Бытовые стоки	26	[45]

Следует отметить, что в приведенных работах по культивированию иммобилизованных клеток микроводорослей рода *Chlorella* на сточных водах использовались только бытовые или модельные сточные воды. Другие типы сточных вод не исследовались, снижение уровня ХПК в них не изучалось.

Таким образом, очевидна необходимость дополнительных исследований в данной области, апробация новых способов иммобилизации клеток и носителей, обеспечивающих более высокие скорости накопления биомассы микроводорослей при использовании исходно иммобилизованных клеток в качестве инокулята.

Таблица 3 – Скорость накопления биомассы клеток микроводорослей рода *Chlorella* в сточных водах при использовании в качестве инокулята иммобилизованных клеток тех же микроводорослей

Сточные воды	Носитель для иммобилизации	Скорость накопления биомассы, мг сух. в-в/л/сут	Ссылка	
Модельные, имитирующие бытовые	Модифицированная целлюлоза	20	[38]	
Модельные, имитирующие бытовые	Са-альгинатный гель	-	[46]	
Модельные, имитирующие бытовые		70	[39]	
Бытовые		50		
Модельные, содержащие нонилфенол		40	[40]	
Модельные, имитирующие бытовые (миксотрофные условия)		500	[47]	
Бытовые			59	[41]
		К-карагинанановый гель	60	

При этом следует отметить, что некоторые способы иммобилизации позволяют длительно сохранять жизнеспособность клеток микроводорослей в случае подобной необходимости и поэтому поиск метода получения иммобилизованного инокулята в виде клеток микроводорослей, сочетающего в себе решение этих двух задач (эффективное хранение и увеличение скорости накопления биомассы) является актуальным и обладает большой практической значимостью.

1.2 Хранение культур фототрофных микроорганизмов

Поскольку, известно, что при хранении фототрофных микроорганизмов помимо потери клетками жизнеспособности также имеют место процессы популяционной изменчивости, при этом доминантный фенотип замещается другими с измененными исходными свойствами и продуктивностью, происходит потеря клетками хранящейся культуры приоритетных свойств [48], то весьма актуальными становятся вопросы, связанные с возможностью использования эффективных способов хранения в условиях специализированных коллекций, производственных и научно-исследовательских лабораторий клеток фототрофных микроорганизмов, представляющих коммерческий интерес, в частности, в качестве источника биомассы, являющейся ценным возобновляемым

сырьём. Одним из основных критериев применения того или иного способа хранения клеток фототрофных микроорганизмов является адекватный выбор условий их хранения, обеспечивающих длительное сохранение клетками своих популяционных характеристик и максимально возможного уровня жизнеспособности.

Известно несколько различных способов, позволяющих сохранять клетки фототрофных микроорганизмов в жизнеспособном и репродуктивном состоянии (поддержание клеток на жидких и агаризованных средах, хранение в иммобилизованном виде, лиофилизация и криоконсервация с использованием защитных сред и криопротекторов) [49-52]. При этом самым эффективным способом долгосрочного хранения различных фототрофных микроорганизмов на сегодняшний день считается криоконсервация. Этот способ состоит в переводе биологических объектов в состояние холодного анабиоза (замораживания) с последующим возвратом их к метаболической активности (размораживания) в физиологически оптимальных условиях культивирования. Согласно большинству известных способов криоконсервации фототрофных микроорганизмов, она осуществляется путем замораживания клеток в различных условиях с последующим их хранением в замороженном состоянии [53, 54].

Известно, что при глубоком замораживании биологических объектов могут происходить серьёзные, в том числе необратимые повреждения клеток за счёт повреждений, вызываемых формированием кристаллов льда как внутри, так и снаружи клеток, сопровождающихся их обезвоживанием и нарушением свойств клеточных мембран [53]. Повышение концентрации электролитов в процессе замораживания приводит к изменению концентрации водородных ионов и нарушению кислотно-щелочного баланса. Вследствие обезвоживания локальное содержание солей в клетке достигает критической концентрации, оказывая негативное воздействие на структуру белков.

Варьирование режимов «замораживания-оттаивания» клеток (температура замораживания, температура оттаивания, скорости одного и другого процесса) может повысить эффективность результатов криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов [54].

В отношении температуры замораживания все известные сегодня способы криоконсервации фототрофных клеток можно разделить на два основных типа:

- способы криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, предусматривающие хранение клеток при температуре жидкого азота,
- способы, предусматривающие хранение клеток при температуре выше температуры жидкого азота.

Замораживание клеток до температуры жидкого азота сопровождается быстрым охлаждением образца, приводящим к резкому снижению его температуры. Такое быстрое охлаждение минимизирует эффект концентрирования электролитов вне клетки, так как образование льда протекает равномерно, но приводит к образованию большего его внутриклеточного количества. Медленное охлаждение (до температуры $-30\div-80^{\circ}\text{C}$) наоборот приводит к большей потере воды из клетки и к меньшему накоплению внутриклеточного льда, но при этом эффект концентрирования электролитов вне клетки значительно повышается. И тот, и другой режимы замораживания для эффективной криоконсервации клеток предполагают применение и внесение в суспензию клеток криопротекторов – защитных агентов, которые, как правило, влияют на эластичность цитоплазматической мембраны, связывают внутриклеточную воду и предотвращают чрезмерное обезвоживание клеток, снижают токсическое воздействие солей электролитов и препятствуют образованию крупных кристаллов льда в клетке или в непосредственной близости от клетки [55].

Учитывая вышесказанное, наиболее часто применяемыми способами криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов являются те, в которых для максимального сохранения их жизнеспособности используют двухстадийный режим замораживания суспензии клеток [56-58], при котором проводят первоначально медленное охлаждение клеток до $-30\div-140^{\circ}\text{C}$ в присутствии какого-либо криопротектора, а затем значительно более глубокое и быстрое замораживание клеток, перенося их в условия температуры жидкого азота.

Так известен способ криоконсервации фототрофных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* с использованием режима двухстадийного замораживания, согласно которому суспензию клеток ($(2,2\div 3,3)\times 10^6$ кл/мл) первоначально замораживают до -55°C в присутствии метанола (2-10%), помещая далее замороженный материал в пары жидкого азота с температурой -170°C . Жизнеспособность клеток при этом составляет 40-52,5% [59]. В другом варианте того же способа двустадийного замораживания в качестве криопротектора используется 10% раствор диметилсульфоксида (ДМСО) [60]. При этом первичное охлаждение ведётся до температуры -80°C , далее при этой температуре клетки выдерживаются 1,5 ч и погружаются в жидкий азот. Согласно этому варианту способа криоконсервации, клетки *C. vulgaris* могут храниться на протяжении 10-30 суток при -196°C . Однако для биотехнологических процессов хранения и использования инокулята такой способ не подходит. Увеличение концентрации ДМСО, используемого в качестве криоконсерванта, до 20% приводит к снижению уровня выживаемости клеток *C. vulgaris* [61]. Основными недостатками данных способов являются: недостаточно высокая выживаемость клеток в результате замораживания/оттаивания клеток, необходимость применения сложной

аппаратуры для программируемого замораживания суспензии клеток, применение цитотоксичных криопротекторов (метанола, ДМСО), требующих от персонала соблюдения особых мер предосторожности при работе с ними, а также быстрого освобождения клеток от этих криопротекторов сразу же после их размораживания (например, центрифугированием, промыванием физиологическим раствором, карбонатным буфером и повторным центрифугированием).

Также в роли криопротекторов вместо ДМСО может применяться 5% раствор глицерина [62], или даже смесь разных криопротекторов [63]. Клетки фототрофных микроорганизмов родов *Chlorella*, *Nannochloropsis* или *Tetraselmis* сохраняют жизнеспособность на уровне 50% от исходного уровня. При этом жизнеспособность клеток оценивается как процентное отношение скорости роста образца клеток до и после криоконсервации. Остаточный уровень жизнеспособности у клеток (50%) не изменяется в течение 15 лет их хранения при -196°C . Достоинством данного способа является постоянный остаточный уровень жизнеспособности, достигаемый при их криохранении. Однако снижение жизнеспособности на 50% в сравнении с исходным уровнем является большим недостатком способа. Кроме того, способ основан на методике замораживания с использованием сложной криогенной техники, а также использовании цитотоксичного вещества (ДМСО), от которого требуется быстро избавляться после размораживания клеток, и биodeградируемого пролина, провоцирующего контаминацию клеточного материала.

Известен ещё целый ряд модификаций способа криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов с использованием режима двухстадийного замораживания и ДМСО в качестве криопротектора, в которых клетки либо первоначально замораживают при скорости 1°C в мин до -40°C , а потом переносят в жидкий азот, добавляя ДМСО в концентрации 10-20% [64], либо клетки первоначально инкубируют 10 мин в присутствии 10% ДМСО, затем их замораживают до -80°C со скоростью $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, после чего погружают в жидкий азот [65], либо клетки смешивают с раствором ДМСО до конечной его концентрации 10-15%, выдерживают 15 мин в темноте при комнатной температуре, затем замораживают со скоростью $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до -40°C и после экспозиции при этой температуре в течение 10 мин погружают в жидкий азот [66]. Однако, несмотря на варьирование концентрации и порядка внесения ДМСО как криопротектора в суспензию клеток, времени выдерживания клеток в его присутствии в разных температурных режимах, все указанные способы характеризуются относительно невысоким уровнем жизнеспособности клеток (максимально $\sim 60-65\%$) после размораживания из-за деструктивного воздействия на клетки применяемого ДМСО. Все эти способы дороги ввиду необходимости использования энергоёмкого и дорогостоящего криогенного оборудования, обеспечивающего поддержание температур жидкого азота.

Кроме того при хранении образцов в жидком азоте существует необходимость его периодического добавления в ёмкости для хранения клеток из-за его испарения, что приводит, таким образом, к дополнительным экономическим затратам.

В этой связи более привлекательными являются способы криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, которые используют замораживание клеток и их хранение при температуре более высокой, чем температура жидкого азота.

Известен способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов, согласно которому их замораживание проводят при температуре -20°C или -60°C или -80°C в присутствии криопротектора (20% метанола или 5-10% ДМСО) и хранят при этих же значениях температуры [67, 68]. Несомненным преимуществом этого способа криоконсервации клеток является использование температур существенно выше температуры жидкого азота, позволяющих применять более простое и дешёвое оборудование, но огромным недостатком этого способа, как и ранее описанных, сдерживающим его применение, является использование токсичных криопротекторов, обеспечивающих частичное сохранение клетками их жизнеспособности непосредственно после размораживания и сохранение жизнеспособности после 2 лет хранения ниже уровня, характерного для клеток, замороженных без криопротектора.

Проведение иммобилизации клеток фототрофных микроорганизмов путём включения их в нетоксичную полимерную матрицу, состоящую из материала, способного проявлять свойства криопротектора, перед их криоконсервацией служит альтернативой тем способам, в которых используются цитотоксичные криопротекторы. В этой связи способы, предусматривающие такую иммобилизацию перед криоконсервацией особенно привлекательны для их применения на практике.

Известен способ криоконсервации, в котором проводится первоначально иммобилизация клеток диатомовых микроводорослей *Haslea ostrearia* в Са-альгинатный гель, затем осуществляется пропитывание гранул раствором 0,7 М сахарозы, используемой в качестве криопротектора, и их высушивание в потоке стерильного воздуха, замораживание высушенных образцов гранул при -80°C и перенос их в среду жидкого азота с последующим хранением при температуре жидкого азота [69]. Такой способ криоконсервации клеток, комбинирующий иммобилизацию клеток перед их криоконсервацией с двухстадийным замораживанием, между которыми ещё используется и высушивание гранул с иммобилизованными клетками в присутствии криопротектора, обеспечивает 77%-выживание клеток. Однако культивирование полученных таким образом образцов клеток фототрофных микроорганизмов сопровождается быстрым бактериальным и дрожжевым заражением вследствие присутствия в них сахарозы. Кроме того, к недостаткам этого способа

криоконсервации относится его многостадийность и, соответственно, длительность и затратность (по времени, энергии, труду) самого процесса.

Отказ от стадии высушивания иммобилизованных клеток, использования дополнительного (помимо самой матрицы носителя) криопротектора, а также от двухстадийного метода замораживания, существенно упростил бы процесс криоконсервации и сделал его более технически и экономически привлекательным.

Так, известен способ криоконсервации, при котором клетки фототрофных микроорганизмов иммобилизуют методом включения в Са-альгинатный гель с последующим замораживанием и хранением при температуре $-20\pm 2^\circ\text{C}$ [70]. Для этого выращивают клетки фототрофных микроорганизмов, в частности, цианобактерий *Rivularia aquatica* или *Gloeotrichia echinulata*, отделяют их от культуральной жидкости центрифугированием и ресуспендируют в стерильном 6% растворе альгината натрия, чтобы полученную суспензию по каплям внести в 100 мМ раствор CaCl_2 с целью формирования в нём в течение 1 ч сферических гранул Са-альгинатного геля, содержащих включённые в него клетки и имеющих диаметр 4 мм. Далее гранулы отделяют от раствора хлорида кальция, промывают стерильной дистиллированной водой и сушат в потоке стерильного воздуха (скорость потока воздуха – 0,45 м/с) в течение 30 мин, а затем помещают на хранение в герметично закрытой ёмкости при температуре $-20\pm 2^\circ\text{C}$.

Способ характеризуется несомненной привлекательностью в плане использования существенно более высоких температур в сравнении с жидким азотом, который требует применения дорогостоящего оборудования, и, кроме того, сам процесс замораживания осуществляется в одну стадию, а не при использовании двухстадийного температурного режима. Последнее обстоятельство важно, с точки зрения потенциально возможного масштабирования процесса, однако при хранении в течение 1 года образцов, полученных таким способом, остаточный уровень жизнеспособности у клеток составляет для разных культур не более 47-49%. Такой низкий уровень выживания клеток свидетельствует о том, что Са-альгинатный гель не обеспечивает в нужной мере роль криопротектора, и это является одним из основных недостатков этого способа, существенно ограничивающих возможность его использования на практике.

В этой связи огромен интерес к таким методам иммобилизации клеток фототрофных микроорганизмов, которые позволили бы не только использовать их для получения высококонцентрированных инокулятов для их применения в процессах накопления биомассы при очистке разных по химическому составу сточных вод, но и позволяли бы хранить их в течение продолжительного времени без значительных потерь жизнеспособности клеток в условиях, не требующих применения какого-либо особо

специального низкотемпературного оборудования. В этом случае идея применения для этих целей криогеля поливинилового спирта (ПВС), известного своей способностью при его использовании в качестве носителя для иммобилизации клеток бактерий, дрожжей и спор мицелиальных грибов, обеспечивать не только сохранность высокой метаболической активности клеток, но и их жизнеспособности на высоком уровне в течение длительного времени при хранении [71], становится актуальной и привлекательной для её реализации на клетках фототрофных микроорганизмов.

1.3 Предобработка биомассы фототрофных микроорганизмов для дальнейшего получения различных биопродуктов

Для эффективной трансформации полученной биомассы фототрофных микроорганизмов в различные биотехнологические продукты необходима ее предварительная дезинтеграция и обработка, способ осуществления которой выбирается, исходя из данных о ее биохимическом составе.

В настоящее время исследователи научились варьировать биохимический состав фототрофных микроорганизмов путем изменения условий культивирования, в частности, путем лимитирования клеток в процессе их культивирования по источникам азота и фосфора [17, 18]. Так можно получать повышенное содержание липидов или углеводов в биомассе клеток фототрофных микроорганизмов, которые могут быть использованы для получения различных коммерчески значимых продуктов (биодизеля, биоэтанола, биобутанола, метана, ацетона, водорода, органических кислот, микробных полимеров).

Кроме того, после экстракции липидов микроводорослей для получения биодизеля, оставшийся дебрис клеток, содержащий преимущественно углеводы и белки, также может быть сырьем для различных биотехнологических процессов при условии проведения эффективной его гидролитической предобработки [72].

Очевидно, что желаемый продукт и предполагаемый продуцент также определяют выбор способа предобработки биомассы, поскольку необходимо руководствоваться данными о субстратной специфичности штамма-продуцента конечного продукта, оптимальной концентрации питательных веществ, которая должна быть в среде, необходимости введения дополнительных источников питания, предпочтении определенных физико-химических характеристик среды (вязкость, pH). При этом необходимо свести к минимуму и контролировать возможное появление токсичных для клеток микроорганизмов веществ, ингибирующих их метаболическую активность.

В целом для предобработки биомассы микроводорослей применяются те же основные подходы, что и для других видов возобновляемого сырья: физические (механическая

деструкция, термолиз, ультразвуковое воздействие, замораживание), химические (кислотная и щелочная предобработка, использование ионных жидкостей), ферментативные [73-75].

Физические способы дезинтеграции используются для деструкции клеток микроводорослей с целью получения липидов [73, 76], однако, как самостоятельные методы, неэффективны для гидролиза углеводных компонентов биомассы с целью получения восстанавливающих сахаров (ВС), и в этом случае могут применяться в комбинации с кислотным или ферментативным гидролизом [77].

Кислотный гидролиз обычно проводится в присутствии неорганических кислот и является наиболее распространенным методом. Следует отметить, что, несмотря на быстроту проведения процесса и дешевизну используемого катализатора (как правило, H_2SO_4 и HCl), кислотный гидролиз имеет существенные недостатки, связанные с необходимостью использования коррозионностойкого оборудования, и образованием большого количества побочных продуктов [78]. Щелочной гидролиз биомассы считается наиболее дешевым способом, но неэффективным [78].

В последние годы значительно возрос интерес к ионным жидкостям (ИЖ), например в процессах обработки лигноцеллюлозосодержащей биомассы [79, 80]. Показано, что на основе ИЖ можно получить растворы целлюлозы, фиброина, кератина и других природных полимеров в достаточно высоких концентрациях [81], при этом возможность регенерации ИЖ и повторное их использование для обработки биомассы делает возможным создание замкнутых технологических процессов переработки природных полимеров с их использованием. Кроме того, ИЖ выгодно отличаются от других растворителей такими свойствами, как широкий температурный диапазон жидкого состояния, высокая термическая стабильность, малое давление паров [82]. Целлюлоза, предобработанная с использованием ИЖ, характеризуется значительно меньшим индексом кристалличности по сравнению с неподобработанной, так как в результате взаимодействия с ИЖ происходит разрушение водородных связей в областях кристалличности. При последующей замене ИЖ на воду или другой полярный растворитель, например, метанол или этанол, целлюлоза переходит из кристаллической формы в аморфную и легко подвергается дальнейшему гидролизу (кислотному или ферментативному), что обеспечивает высокий выход ВС [83]. Однако высокая стоимость ИЖ, их токсичность и отсутствие разработанных технологий их использования в промышленности в настоящее время сдерживает применение ИЖ.

На данный момент известен ряд работ, посвященных физико-химическим способам обработки биомассы различных видов микроводорослей для подготовки её к дальнейшей конверсии в биотехнологические продукты под действием разнообразных микроорганизмов – продуцентов (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты физико-химических способов предобработки биомассы микроводорослей

Микроводоросли	Содержание углеводов в биомассе, %	Условия обработки биомассы	Y _{BC} (в т.ч. Y _{ГЛ}), %	Целевой продукт, получаемый из биомассы	Ссылка
<i>Chlorella vulgaris</i>	57	Обработка 1 г сух. в-в биомассы /л раствором 1,5% HCl при 121°C 20 мин	100 (89,5)	Биоводород	[84]
		Обработка 5 г сух. в-в биомассы /л раствором 1% NaOH при 121°C 20 мин	1		
<i>Chlorella sp.</i>	73,6	Обработка 50 г сух. в-в биомассы /л (в виде лиофилизированного порошка) раствором 1% H ₂ SO ₄ при 121°C 20 мин	93,7	Биоэтанол	[85]
		Обработка 200 г сух. в-в биомассы/л смесью растворов 2% HCl + 2,5% MgCl ₂ при 180°C 10 мин	83,47 (64,21)		
		Обработка 200 г сух. в-в биомассы/л раствором 4% HCl при 180°C 10 мин	72		
		Обработка 200 г сух. в-в биомассы/л раствором 2% H ₂ SO ₄ при 180°C 10 мин	12 (6)		
		Последовательно в 2 стадии: 1) Обработка ИЖ [Emim]Cl (1-этил-3-метилимидазолий хлорид) при 105°C 180 мин 2) Обработка раствором 7% HCl при 105°C 180 мин	88,02		[74]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	60	Обработка 50 г сух.в-в биомассы/л раствором 3% H ₂ SO ₄ при 110 °C 30 мин	58		[87]
<i>Chlorococcum humicola</i>	32,5	Обработка 15 г сух. в-в биомассы/л раствором 1% H ₂ SO ₄ при 140 °C 30 мин	**		[88]
<i>Scenedesmus obliquus</i> *	24,7	Обработка 67 г сух. в-в биомассы /л раствором 0,8% NaOH при 100°C 150 мин	**	Биоводород	[72]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	31,8	Последовательно в 2 стадии: 1) Высушивание биомассы при 80°C до постоянной массы 2) Обработка 50 г сух. в-в биомассы /л раствором 9,8% H ₂ SO ₄ при 120°C 30 мин	89,9 (59)	-	[78]
		Обработка 100 г сух. в-в биомассы /л раствором 0,8% NaOH при 120°C 30 мин	7,9		
<i>Nannochloropsis salina</i>	18,2	Обработка 50 г сух. в-в биомассы /л раствором 5% H ₂ SO ₄ при 120°C 60 мин	64,3 (49,5)	Молочная кислота	[89]

*- биомасса после извлечения липидов; ** - не контролировался, Y_{BC}, Y_{ГЛ} – выходы BC, глюкозы, % от общего количества углеводов

Из Таблицы 4 следует, что щелочной гидролиз можно считать абсолютно неэффективным методом предобработки биомассы микроводорослей, если конечной целью является получение высоких выходов ВС.

Метод кислотного гидролиза является эффективным с точки зрения быстрого получения высоких выходов ВС. Для повышения эффективности метода предполагается использование более высоких концентраций кислоты (до 9,8 %) или проведение процесса при повышенных температурах (до 180 °С). Хорошие результаты получены при использовании последовательного сочетания 2-х методов предобработки биомассы микроводорослей: обработки ИЖ и последующего кислотного гидролиза. Повысить эффективность кислотного гидролиза позволяет также предварительная лиофилизация или высушивание биомассы.

Применение данных методов является экономически оправданным (за исключением использования ИЖ), однако в случае предобработки биомассы в среде появляются различные вещества (продукты трансформации сахаров: фурфурол, оксиметилфурфурол, муравьиная кислота и т.д.), токсичные для клеток микроорганизмов-продуцентов [74, 78].

Ферментативный гидролиз с целью получения ВС в этом случае является более предпочтительным, поскольку характеризуется высокой специфичностью и, в отличие от физико-химических методов, его использование позволяет получать относительно высокие выходы сахаров при сравнительно мягких условиях проведения реакции (при атмосферном давлении и температуре не выше 70 °С), при этом получаемые гидролизаты практически не содержат нежелательных побочных продуктов гидролиза. В качестве недостатка ферментативного гидролиза можно отметить относительно низкую рентабельность процесса из-за немалой стоимости ферментных препаратов. Однако, несмотря на это, прилагаются большие усилия по совершенствованию технологии ферментативного гидролиза полисахаридов различных видов биомассы и внедрению его в промышленных масштабах. В частности, из-за нарастающей популярности биомассы микроводорослей, как возобновляемого источника энергии, в настоящее время очень актуальны разработки эффективного ферментативного гидролиза ее полисахаридов.

Выбор ферментативных препаратов определяется биохимическим составом клеточных полимеров. Следует однако отметить, что подобные данные для разных клеток микроводорослей обрывочны и носят весьма противоречивый характер, что очевидно, связано с тем, что даже биохимический состав клеток одного и того же штамма микроводорослей может сильно варьироваться в зависимости от условий культивирования [85]. Биомасса микроводорослей рода *Chlorella* является в этом отношении наиболее изученной [90-92]. Известно, что клеточные стенки этих микроводорослей состоят из внешнего ригидного слоя, погруженного в пластичный матрикс, причем разные виды

Chlorella отличаются по составу этих двух слоев [93]. К примеру, у вида *Chlorella vulgaris*, ригидный слой образован хитиноподобным гликаном, который может составлять 3÷15 % от массы клеточной стенки [94], а внутренний слой образован главным образом целлюлозой, а также гемицеллюлозами и пектиноподобными веществами [92]. Помимо полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки, клетки микроводорослей рода *Chlorella* могут накапливать в пластидах запасной углеводов - крахмал [95]. Общее содержание углеводов может достигать 70 % от веса сухой биомассы [86], при этом следует отметить, что, несмотря на разнообразие углеводных компонентов клеток, основную их часть составляют все же глюкозосодержащие полимеры, а именно целлюлоза и крахмал, содержание которых варьируется в зависимости от условий культивирования клеток и может достигать соответственно 35 % [74, 86] и 55 % [96] от веса сухой биомассы.

На сегодняшний день известен ряд работ, посвященных ферментативному гидролизу биомассы микроводорослей. В качестве ферментных препаратов большинство исследователей используют целлюлазы, α -амилазы и глюкоамилазы, некоторые применяют также ксиланазы, пектиназы, лизоцим (Таблица 5). Для повышения реакционной способности сырья применяются различные физические способы его предподготовки к дальнейшему ферментативному гидролизу. Следует отметить, что, поскольку микроводоросли, в отличие от лигноцеллюлозосодержащего сырья, не содержат в своем составе лигнин, то в данном случае отпадает необходимость использования расщепляющих лигнин ферментов, что облегчает процесс ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей по сравнению с гидролизом целлюлозосодержащего сырья.

Таким образом, учитывая меняющийся в зависимости от условий культивирования биохимический состав биомассы клеток микроводорослей, очевидно, что в каждом конкретном случае необходимо проведение оптимизации способов ее предобработки с целью получения растворов с максимальной концентрацией ВС и минимальным содержанием токсичных продуктов, снижающих метаболическую активность клеток микроорганизмов, которые далее должны быть использованы при конверсии ВС в различные целевые продукты.

1.4 Трансформация биомассы фототрофных микроорганизмов в полупродукты для синтеза биоразлагаемых полимеров

Традиционно биомасса фототрофных микроорганизмов служит сырьем для получения антиоксидантов и кормового белка [103, 104]. В последние десятилетия с развитием научных представлений о влиянии условий культивирования на изменение биохимического состава

Таблица 5 – Результаты ферментативных способов предобработки биомассы микроводорослей

Микроводоросли	% углеводов в биомассе от сух. в-в	Условия обработки биомассы	Y _{BC} (в т.ч. Y _{ГЛ}), %	Целевой продукт, получаемый из биомассы	Ссылка
<i>Chlorella vulgaris</i>	**	Ферментативный гидролиз 2,6 г сух. в-в биомассы/л (pH 4,8, 55 ⁰ С, 10 ч) под действием лизоцима (2 мг/г сух. биомассы)	**	Липиды биомассы	[97]
		Ферментативный гидролиз 2,6 г сух. в-в биомассы/л (pH 4,8, 55 ⁰ С, 10 ч) под действием целлюлазы (2 мг/г сух. биомассы)			
<i>Chlorella vulgaris</i>	22,4	Последовательно 2 стадии: 1) Дезинтеграция биомассы в шаровой мельнице 2) Ферментативный гидролиз 100 г сух. в-в биомассы/л (цитратно-фосфатный буфер (pH 4,8), 50 ⁰ С, 72 ч) под действием пектиназы <i>A.aculeatus</i> (1,88 г/г сух. биомассы)	79	Биоэтанол	[75]
<i>Chlorella homosphaera</i>	**	Последовательно 4 стадии: 1) Промывка биомассы дважды 95% охлажденным этанолом 2) Высушивание биомассы и растирание пестиком в ступке 3) Замораживание биомассы при -20 ⁰ С 4) Ферментативный гидролиз 100 г сух. в-в биомассы/л (Na-ацетатном буфер (pH 4,8), 50 ⁰ С, 24 ч) под действием ферментного комплекса из целлюлазы <i>T. reesei</i> (10 Ед/г сух. биомассы), ксиланазы <i>T. reesei</i> (10 Ед/г сух. биомассы), амилазы <i>Aspergillus awamori</i> (10 Ед/г сух. биомассы)	24,5 (23,3) *	-	[77]
<i>Chlorella zofingiensis</i>			19,3 (18,4) *		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26	Последовательно 3 стадии: 1) Промывка биомассы дважды дистиллированной водой 2) Лиофилизация биомассы 24 ч 3) Ферментативный гидролиз 20 г сух. в-в биомассы/л (Na-ацетатном буфер (pH 4,6), 50 ⁰ С, 72 ч) под действием целлюлазы, иммобилизованной на нановолокнистой мембране ПАН (полиактрилонитрил) (28 мг целлюлазы/г ПАН)	62		[98]

Таблица 5 продолжение

Микрородосли	% углеводов в биомассе от сух. в-в	Условия обработки биомассы	Y _{BC} (в т.ч. Y _{ГЛ}), %	Целевой продукт, получаемый из биомассы	Ссылка
<i>Chlamidomonas reinhardtii</i>	59,7	Последовательно 2 стадии: 1) Промывка биомассы водой 2) Ферментативный гидролиз 50 г сух. в-в биомассы/л: -ожижение (pH 6,0, 90 ⁰ С, 30 мин) под действием α-амилазы <i>Bacillus licheniformis</i> (1мг/г сух. биомассы) -осахаривание (pH 4,5, 55 ⁰ С, 30 мин) под действием глюкоамилазы <i>Aspergillus niger</i> (40 мг/г сух. биомассы)	67		[99]
<i>Chlorococcum humicola</i>	32,5	Последовательно 4 стадии: 1) Дезинтеграция биомассы ультразвуком (40 кГц, 25 мин) 2) Высушивание биомассы при 60 ⁰ С 12 ч 3) Измельчение биомассы в лабораторной дисковой мельнице 4) Ферментативный гидролиз 10 г сух. в-в биомассы/л (Na-ацетатном буфер (pH 4,8), 40 ⁰ С, 11 ч) под действием целлюлазы <i>Trichoderma reesei</i> (20 мг/г сух. биомассы)	64,2	Биоэтанол	[100]
<i>Hydrodictyon reticulum</i>	62,9	Последовательно 2 стадии: 1) Промывка биомассы водопроводной водой, высушивание при комнатной температуре 2) Ферментативный гидролиз 80 г сух. в-в биомассы/л (pH 6,0, 34 ⁰ С, 48 ч под действием комплекса ферментных препаратов из Celluclast Conc BG (20 мг/г сух. биомассы), целлюбиазы <i>Aspergillus niger</i> (10 мг/г сух. биомассы), глюкоамилазы <i>A. niger</i> (10 мг/г сух. биомассы)	**	Молочная кислота	[101, 102]

*- от сухой биомассы

** - параметр не контролировался

Y_{BC}, Y_{ГЛ} – выходы BC, глюкозы, % от общего количества углеводов

биомассы микроводорослей интенсивно внедрялись проекты по конверсии липидов, входящих в ее состав, в биодизельное топливо [105].

Однако в настоящее время в связи со значительным снижением цен на нефть достичь показатели себестоимости получаемых биотоплив в сравнении с себестоимостью аналогичных нефтепродуктов не представляется возможным. В этой связи актуальной является конверсия биологических макромолекул, входящих в состав биомассы фототрофных микроорганизмов, в коммерчески значимые продукты с высокой стоимостью, в частности, направленные на импортозамещение зарубежных аналогов.

К таким продуктам относятся органические кислоты (молочная, фумаровая, янтарная, яблочная, аспарагиновая) или микробные биополимеры (полигидроксиалканоаты, бактериальная целлюлоза, ксантан, пуллулан), которые могут использоваться для получения биоразлагаемых композитных материалов (Рисунок 2).

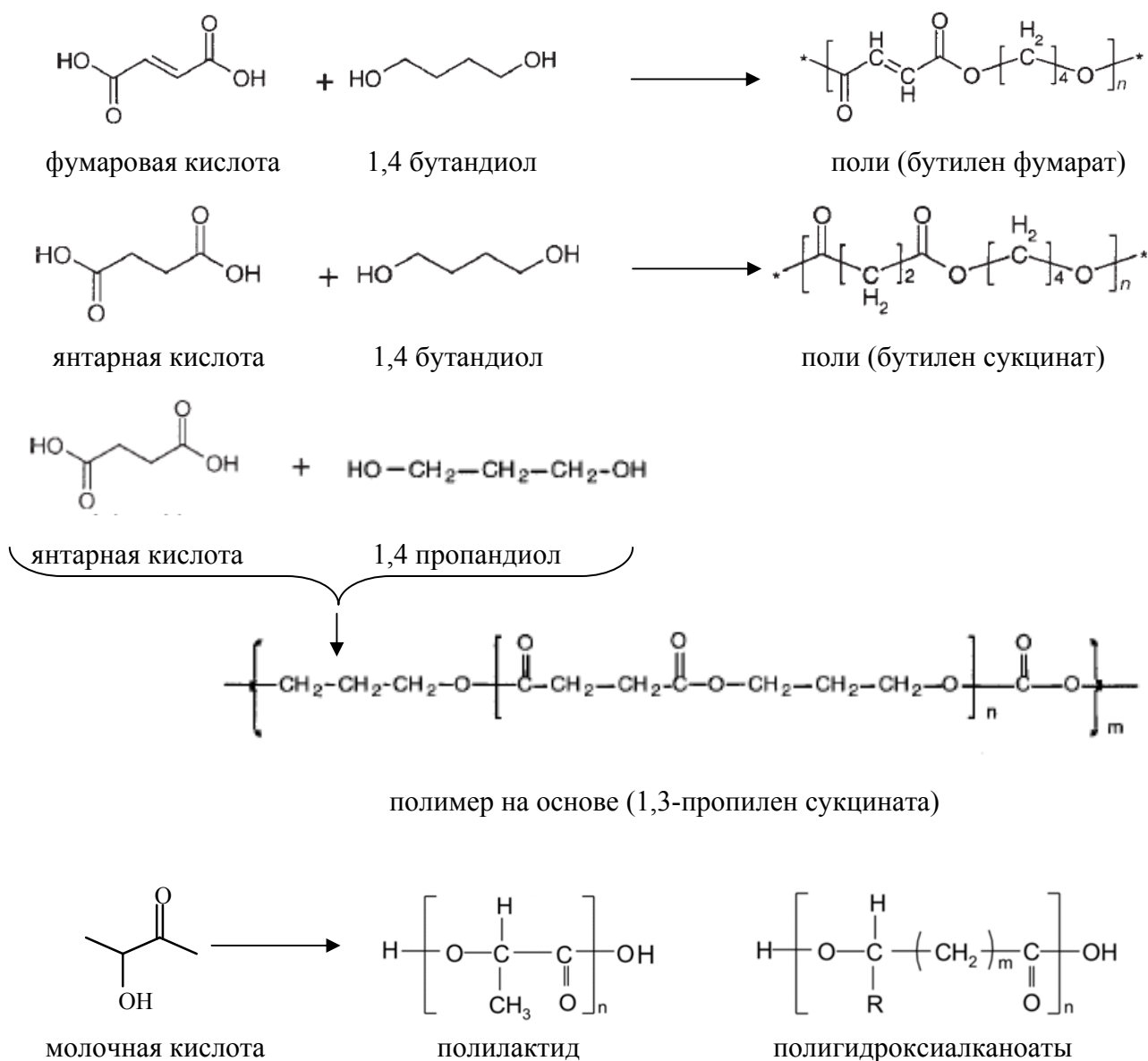


Рисунок 2 – Биоразлагаемые полимеры

В настоящее время спрос на пластик и изделия из него в мире превышает 200 млн. тонн и увеличивается с каждым годом [106]. После использования основная масса пластиков, производимых из нефти и природного газа, не подлежит биодegradации в условиях окружающей среды, что создает глобальные экологические проблемы и формирует стимул к ускоренной разработке технологий получения природных полимеров из возобновляемого сырья при его глубокой переработке. По своим характеристикам эти полимеры близки к синтетическим, но при этом являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, то есть полностью разлагающимися до углекислого газа и воды [107].

Многие мировые компании (Coca-Cola, Procter & Gamble и др.) уже начали производить биоразлагаемые композиты из целлюлозосодержащих отходов с целью изготовления тары для своей продукции. Наиболее интенсивный рост наблюдается на рынке биопластиков в Северной Америке, Японии и Европе. Объем производства биопластиков сегодня в мире оценивается в 2 млн т/г, а к 2017 г по прогнозам достигнет 6 млн т/г [108]. В России начат импорт таких биополимеров, тогда как производства не существует в виду отсутствия промышленных технологий по производству исходных материалов.

1.4.1 Органические кислоты – мономеры для получения биоразлагаемых полимеров

Биокомпозитные материалы на основе органических кислот перспективны, с точки зрения замены традиционных во всех областях, и находят все большее применение на практике. Например, композитные материалы на основе молочной кислоты (МК) нашли применение в производстве упаковки одноразового использования (пищевая упаковка), в медицине (хирургические нити) [109, 110].

Основным ограничивающим фактором выпуска конкурентоспособных биопластиков на основе полилактидов являются высокие затраты на её производство той степени чистоты, которая требуется для синтеза полимеров.

Биотехнологическим путем МК можно получать из глюкозосодержащих гидролизатов различных видов возобновляемого сырья (сахаро-, целлюлозо- и крахмалосодержащих отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности) при помощи бактерий и мицелиальных грибов [111, 112].

Использование молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* позволяет получать смесь D и L-формы МК (1:1) [113], а использование мицелиальных грибов рода *Rhizopus* позволяет получать продукт преимущественно в виде L-формы [114]. Промышленных процессов с использованием таких грибов пока нет, хотя интерес к ним огромен, так как показано, что в отличие от бактериальных продуцентов клетки мицелиальных грибов *R. oryzae* способны

конвертировать в МК не только глюкозу, но и ксилозу с 60%-ным выходом за счет синтеза и секреции собственных ксиланаз [115].

В большинстве случаев среды, содержание МК и полученные в результате культивирования бактерий, представляют собой гидролизаты крахмалсодержащего сырья, у которых есть достаточно высокая пищевая ценность. В этой связи процесс получения МК для производства биопластиков конкурирует с процессами, ориентированными на переработку исходного сырья в продукты, удовлетворяющие пищевые потребности людей и нужды животноводства. Отсюда возникает интерес к другим источникам сырья для получения МК – прежде всего это целлюлозосодержащая биомасса [116, 117]. Однако присутствие разных природных ингибиторов синтеза белка в данном сырье негативно влияет на метаболическую активность клеток – продуцентов МК. В связи с этим актуальность использования биомассы микроводорослей для получения МК только возрастает. По экспериментальным данным в этом направлении исследований пока что крайне мало [89, 101, 102, 111].

Фумаровая кислота (ФК) используется в производстве различных фармацевтических препаратов, напитков, продуктов питания, кормов для животных, моющих средств, ненасыщенных полиэфирных, алкидных смол и печатных красок [118], кроме того ФК вместе с молочной и янтарной кислотами была определена в качестве одного из десяти основных химических веществ, актуальность получения которых для синтеза биопластиков путём биотехнологической конверсии биомассы различного типа крайне высока в современном мире [119].

Полимеры на основе фумаровой и янтарной кислот способны заменить традиционно используемые полимерные материалы, например, для получения одноразовой посуды, поскольку обладают достаточно высокими прочностными характеристиками и при этом подвергаются биоразложению [120].

Традиционные химические методы получения органических кислот трудоемки и дорогостоящи из-за больших расходов и нестабильности применяемых металлсодержащих катализаторов [121], поэтому актуальным представляется получение органических кислот биокаталитическим способом, при котором используются катализаторы дешевые, применяются в меньших количествах и могут длительно применяться, если это иммобилизованные биокатализаторы [122, 123].

ФК является естественной органической кислотой, которая синтезируется в цикле трикарбоновых кислот [124] и присутствует во всех живых клетках, однако редко секретруется в среду. Продуцентом данной кислоты являются различные микроорганизмы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, однако наиболее активны именно представители рода

Rhizopus. У этих клеток имеется способность продуцировать и секретировать ФК при их экспонировании в средах, содержащих различные сахара, в первую очередь, глюкозу [125]. Так, среды, используемые для получения ФК, как правило, содержат глюкозу в концентрации 50–100 г/л, при этом в ходе ферментации проводится нейтрализация среды CaCO_3 или раствором КОН для поддержания значения pH, благоприятного для функционирования клеток.

Что касается янтарной кислоты (ЯК), то она является полупродуктом для синтеза целого ряда конечных продуктов, в частности, биопластиков [126-128]. ЯК также широко используется в пищевой промышленности в качестве пищевой добавки, подкислителя и консерванта, в последние годы она стала применяться в косметологии [129].

В настоящее время ЯК получают методом химического синтеза из малеиновой кислоты или ее ангидрида, с использованием дорогостоящего ванадиевого катализатора [130].

Наиболее перспективным представляется биотехнологический процесс получения ЯК, при котором произведенный продукт характеризуется высокой чистотой [131]. Наиболее эффективным процессом биокаталитического получения ЯК и ее солей является анаэробное сбраживание сахаров, в частности, глюкозы, с формированием целевого продукта в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот [132].

Продуцентами ЯК могут быть различные клетки бактерий (*Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Escherichia coli*, *Mannheimia succiniciproducens*) [131] и дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Yarrowia lipolytica*) [133, 134, 135], однако наиболее эффективными являются клетки *Actinobacillus succinogenes*, которые способны конвертировать в ЯК не только глюкозу, но и целый ряд других сахаров [136, 137], и даже глицерин [138]. Из литературы известно, что степень конверсии ВС в ЯК с применением клеток бактерий *A. succinogenes* из гидролизатов различного целлюлозосодержащего сырья может достигать 0,6-0,8 (60-80 %) (Таблица 6).

В настоящее время преимущественная часть исследований в области получения органических кислот, как мономеров для получения биоразлагаемых полимеров, направлена на расширение сырьевой базы для клеток-продуцентов. В этом отношении биомасса фототрофных микроорганизмов представляет собой весьма перспективный субстрат, поскольку её предобработка в отличие от целлюлозосодержащих отходов требует меньших затрат.

На сегодняшний день известно всего несколько работ, посвященных именно трансформации биомассы микроводорослей в органические кислоты – МК и ФК (Таблица 7), при этом известна только одна работа, в которой показана принципиальная возможность

Таблица 6 – Характеристики существующих процессов получения ЯК с использованием свободных и иммобилизованных клеток

A. succinogenes

Субстрат	Носитель для иммобилизации	Исходная концентрация субстрата, г/л	Потребление субстрата, %	С _{як} , г/л	У _{як/вс}	Q _{як} , г/л/ч	Максимальная продолжительность использования, ч	Ссылка	
Глюкоза	Нет	10,1	100	4,7	0,46	0,47	10	[139]	
		20,4		10,6	0,52	0,76	14		
		32,2		18,3	0,57	1,14	16		
		54,7		33,8	0,62	1,13	30		
		85,3	67,9	32,4	0,56	0,72	45		
		101,4	60,3	32,4	0,53	0,59	55		
		50	84	37,9	0,90	0,75	50		[140]
		50	99,4	39,4	0,79	0,66	60		[141]
		30	81,9	17,2	0,70	0,51	34		[142]
	Агар	21,4	100	12,4	0,58	2,06	30	[143]	
		37,6	100	22,6	0,60	2,83	40		
		58,1	100	34,3	0,59	1,75	100		
		78,3	100	43,8	0,56	1,35	165		
	Диатомит	21,4	65,4	6,7	0,48	0,55	12	[143]	
	Кокосовый уголь		91,6	10,4	0,53	1,28	8		
	Композитный материал	20	97	9,1	0,47	0,4	21,4	[144]	
		40	98	33,9	0,86	0,9	38,5		
		60	96	35,1	0,61	0,7	48,2		
		80	84	32,6	0,49	0,7	47		
		100	75	23,3	0,31	0,3	72,2		
		120	71	31,8	0,37	0,3	108,7		
140		51	26,2	0,37	0,2	142,5			
160	61	15,8	0,16	0,1	237,8				

Таблица 6- продолжение

38	Гидролизат сердцевины кукурузного початка	Нет	38,7*	85,4	16,4	0,50	0,34	48	[145]
	Гидролизат тростниковой мелассы		50,6*	80,6	23,6	0,58	0,49		[141]
	Гидролизат сердцевины кукурузы		64,4*	89,1	46,4	0,81	0,97		[146]
	Гидролизат рисовой соломы		45*	80,0	32,1	0,89	0,67		
	Гидролизат пшеничной соломы			62,4	17,6	0,63	0,37		
	Гидролизат кукурузной соломы			56,9	19,0	0,74	0,40		
	Гидролизат отходов стеблей кукурузы		92,4	33,7	0,81	0,70	32	[142]	
	Гидролизат отходов стеблей хлопка		58*	97,2	45,5	0,81		0,95	
	Гидролизат кукурузных волокон		30*	90	17,8	0,66	0,56	25	[147]
	Гидролизат побочных продуктов помола пшеничной муки		30*	43	15,8	1,23	0,62	36	[148]
	Гидролизат отходов производства рисовой водки		50*	98	35,4	0,72	0,98	68	[149]
	Гидролизат багассы сахарного тростника		64,6*	94	62,1	1,02	0,91	48	[150]
			64*	94,3	36,2	0,60	0,75	24	
	52*	100	22,5	0,43	1,01				

* - Концентрация ВС

С_{ЯК} - максимальная концентрация ЯК г/л, Y_{ЯК/ВС} – степень конверсии потребленных ВС в ЯК, Q_{ЯК} – продуктивность процесса по ЯК, г/л/ч

Таблица 7 – Характеристики существующих процессов конверсии биомассы микроводорослей в МК и ФК

Микроводоросли	Условия предобработки	Микроорга- низм	Исходная концентрация биомассы, г/л	Концентрация углеводов, г/л	Сп, г/л	Уп/угл	Qп, г/л/ч	Ссылка	
Молочная кислота									
<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	Последовательно 2 стадии: 1) Промывка биомассы водопроводной водой, высушивание при комнатной температуре 2) Ферментативный гидролиз 80 г сух. в-в биомассы/л (рН 6,0, 34 ⁰ С, 48 ч под действием комплекса ферментных препаратов из Celluclast Conc BG (20 мг/г сух. биомассы), целлюбиазы <i>Aspergillus niger</i> (10 мг/г сух. биомассы), глюкоамилазы <i>A. niger</i> (10 мг/г сух. биомассы)	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	80	50,3	36,6	0,73	1,02	[101]	
		<i>Lactobacillus paracasei</i>		43,7	37,1	0,85	1,03	[102]	
<i>Nannochloropsis salina</i>	Обработка 50 г сух. в-в биомассы /л раствором 5% H ₂ SO ₄ при 120 ⁰ С 60 мин	<i>Lactobacillus pentosus</i>	150	27,3	16,3	0,60	0,91	[89]	
<i>Dunaliella salina</i>	Термолиз (100 ⁰ С, 30 мин)	ИБК* на основе клеток <i>R. oryzae</i>	100	69,7	7,3	0,10	0,18	[111]	
<i>Chlorella vulgaris</i>				55,5	0,2	0,004	0,005		
Фумаровая кислота									
<i>Dunaliella salina</i>	Термолиз (100 ⁰ С, 30 мин)	ИБК* на основе клеток <i>R. oryzae</i>	100	69,7	18,3	0,26	0,46		
<i>Chlorella vulgaris</i>				55,5	0,1	0,002	0,003		

* ИБК – иммобилизованный биокатализатор

Сп – концентрация МК или ФК, г/л Уп/уг – степень конверсии углеводов в МК или ФК, Qп – продуктивность процесса по МК или ФК, г/л/ч

конверсии биомассы микроводорослей в ФК, работ, направленных на исследование процессов получения ЯК из гидролизатов микроводорослей в литературе не обнаружено. В связи с этим представляет определенный интерес, с научной и практической точки зрения, исследование новых возможностей получения вышеуказанных органических кислот из гидролизатов биомассы микроводорослей, накопленной, в частности, на сточных водах. Отходы сырья, остающиеся в процессах биокаталитического получения органических кислот, теоретически могут быть конвертированы в биогаз, таким образом, улучшив экономическую составляющую такого процесса, создающего основу для глубокой переработки углеродсодержащего сырья.

1.4.2 Полигидроксиалканоаты – микробные полимеры для получения биоразлагаемых композиционных материалов

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются биополимерами ациклических гидроксикислот, которые синтезируются многими прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста, при избытке углеродного и энергетического субстрата в среде и дефиците минеральных элементов (азота, серы, фосфора и др.). Биопластики на основе ПГА являются биосовместимыми и биоразлагаемыми материалами, и поэтому интерес к ним непрерывно увеличивается [151]. ПГА нашли применение в производстве упаковки одноразового пользования (продукты бытовой химии, личной гигиены и пищевая упаковка), медицине и фармакологии, сельском хозяйстве [152]. Создание и изучение новых биосовместимых материалов, необходимых для современных медицинских технологий, является актуальной проблемой. Активно развивающееся в настоящее время новое направление применения таких материалов – это формирование биоискусственных органов и тканей [153, 154]. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в биотехнологии, пока не удалось создать материалы, полностью совместимые с живым организмом. Основными факторами, сдерживающими широкое применение остро востребованных биodeградируемых полимерных материалов, являются узкий ассортимент данных материалов, а также пока не решенная проблема регулируемости процессов их функционирования и деструкции в живом организме. Именно ПГА с середины 80-х годов активно изучают в качестве материала для хирургии, тканевой инженерии и создания биоискусственных органов, поскольку эти биополимеры обладают удовлетворительной, с медицинской точки зрения, механической прочностью, высокой биосовместимостью и медленной биodeградацией [155].

По сравнению с биоразлагаемыми полимерами на основе органических кислот синтез полимерных материалов на основе ПГА проводят биотехнологическим методом прямой

ферментации непосредственно в клетках микроорганизмов [151], их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, введение пластификаторов и модифицирующих компонентов). Кроме того, ПГА подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами. ПГА не гидролизуются в жидких средах, так как деградация ПГА является биологической и происходит клеточным и гуморальным путями, более того скоростью деградации ПГА можно управлять [156].

Прогнозные оценки зарубежных экспертов по потенциальной стоимости ПГА в зависимости от типа используемого сырья, технологии синтеза и объемов производства составляют от 2,9 до 8,3 тыс. дол США/т. Среди факторов, указывающих на то, почему производители ПГА не завоевывают российский рынок, можно указать главный - высокая стоимость продукта. Ведущие химические компании и мировые производители изделий из пластиков (*Procter and Gambel, Monsanto, Tefha* и др.) активно инвестируют финансовые средства в разработку технологий производства ПГА. Сегодня такие производства осваивают или планируют к освоению практически все развитые страны, однако решающим для начала широкомасштабного получения и применения ПГА является снижение стоимости этих биопластиков.

Поскольку значительная доля затрат на производство ПГА связана с расходами на углеродсодержащее сырье для выращивания микроорганизмов, основное внимание в настоящее время уделяется расширению и удешевлению сырьевой базы этого производства, которое может быть достигнуто, в частности, за счет применения в качестве исходного сырья промышленных и сельскохозяйственных отходов, гидролизатов различных видов растительной биомассы, накапливающейся ежегодно в огромных количествах.

К числу перспективных продуцентов ПГА относятся бактерии родов *Azotobacter*, *Bacillus*, *Methylmonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* [151]. Существенное внимание различными авторами уделяется именно бактериям *Cupriavidus nector* (бывшее систематическое название *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*) в связи с их способностью аккумулировать ПГА, в том числе различного состава (гомогенный полигидроксibuтират, более технологичные сополимеры гидроксibuтирата с гидроксивалератом, а также трехкомпонентные полимеры), с высокими выходами на различных субстратах (Таблица 8).

Как видно из Таблицы 8, для получения ПГА могут использоваться самые разнообразные субстраты, представляющие собой различные гидролизаты и отходы промышленных и сельскохозяйственных производств.

Факторы, обеспечивающие аккумуляцию ПГА, видо- и штаммоспецифичны, поэтому актуальной задачей для развития новой технологии синтеза и аккумуляции этих

полимеров в составе клеток микроорганизмов является исследование и нахождение условий, максимизирующих выходы ПГА у конкретных штаммов по конкретным субстратам.

Таблица 8 – Характеристики процессов накопления ПГА клетками *C. necator* в питательных средах на основе различных гидролизатов и отходов производств

Источник сырья	Максимальная концентрация биомассы <i>C. necator</i> , г сух. в-в/л	Максимальная концентрация ПГА, г/л	Внутриклеточное содержание ПГА, %	Средняя скорость накопления ПГА, мг/л/ч	Ссылка
Гидролизат багассы	11,5	4,6	40,2	96	[157]
Гидролизат тростниковой мелассы	22	2,85	13	40	[158]
Оливковое масло	4,3	3,4	79	47	[159]
Кукурузное масло	3,6	2,9	81	40	
Пальмовое масло	4,1	3,2	79	44	
Пальмовое масло	5,5	4,4	80	31	[160]
Соевые отходы+меласса	12,5	4,9	39,2	82	[161]
Отходы переработки фруктов и овощей	2,77	1,13	40,8	25	[162]
Отходы производства крахмала из кассавы	2,80	2,39	85,5	50	[163]
Отходы биодизеля+меласса	15,4	2,1	13,6	26	[164]

Актуальным является развитие и внедрение новых технологий, позволяющих снизить себестоимость конечного продукта. В этой связи исследование возможности получения ПГА при культивировании их в среде гидролизованной биомассы микроводорослей, выращенных на очищаемых сточных водах, однозначно обладает новизной и имеет практическую значимость.

Таким образом, актуальным и значимым, с научной и практической точек зрения, является разработка различных подходов к накоплению биомассы микроводорослей

C. vulgaris в процессе очистки сточных вод и к процессам ее биокаталитической трансформации в органические кислоты (мономеры для получения биоразлагаемых полимеров) и биополимеры в виде ПГА.

Анализируя изложенные в литературном обзоре данные, можно утверждать, что исследовательскую работу целесообразно провести в трёх основных направлениях:

1. разработать эффективный способ накопления биомассы свободных клеток микроводорослей *C. vulgaris* в процессе очистки сточных вод разного состава с одновременным снижением уровня их загрязнения (ХПК).
2. усовершенствовать подходы к предобработке биомассы *C. vulgaris* для получения сред с максимально высокими концентрациями ВС.
3. определить наиболее эффективные подходы к получению органических кислот и ПГА при использовании сред, получаемых в результате эффективной деструкции биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

Именно в этих направлениях и развивались научные исследования, предпринятые далее в этой работе.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Химические реактивы

Реактивы (Химмед): мочеви́на, ч., ацетат натрия 3-водный, ч.д.а., хлорид аммония, ч.д.а., дигидроортофосфат калия ч.д.а., сульфат железа 7-водный х.ч., хлорид кальция, ч., гидрокарбонат натрия х.ч., хлорид железа 6-водный, ч., сульфат аммония, ч., сульфат цинка 7-водный, х.ч., сульфат меди 5-водный, х.ч., хлорид натрия ч., сульфат цинка 7-водный, х.ч., нитрат кобальта 6-водный ч.д.а., гидроортофосфат калия 3-водный ч.д.а., карбонат натрия х.ч., глюкоза, ч., молибдат аммония, ч.д.а., сульфат ртути, х.ч., сульфат серебра, х.ч., диметилсульфоксид (ДМСО), ч., дихлорметан, ч., концентрированная серная кислота, х.ч., нитрат аммония, ч., бихромат калия, ч., молибдат аммония 4-водный, ч.д.а., арсенат натрия 7-водный, х.ч.

Реактивы (Реахим): нитрат хрома 9-водный, ч., хлорид меди 2-водный, ч., сульфат никеля 7-водный, х.ч., хлорид свинца, ч., хлорид цинка, ч., сахароза, ч.д.а., сульфат магния 7-водный, ч.д.а., сульфат калия, ч., хлорид кобальта 6-водный, ч., тетраборат натрия 10-водный, ч.д.а., молибдат натрия 2-водный, ч.д.а., нитрат никеля 6-водный, ч.д.а., борная кислота, ч.д.а., хлорид марганца 4-водный, ч.д.а., нитрат натрия, ч., гидроортофосфат натрия, ч.д.а., хлороформ, ч.д.а., концентрированная уксусная кислота, о.с.ч., концентрированная азотная кислота ч.д.а., гидроксид натрия, х.ч., сульфат натрия ч.д.а., изопропиловый спирт, х.ч., карбонат магния, ч.д.а.

Реактивы (Sigma) марки ч.д.а.: лимонная кислота, биотин, метанол, краситель «Нильский красный», додецилсульфат натрия, целлюлоза микрокристаллическая, [Bmim]Cl (1-бутил-3-метилимидозолий хлорид).

Остальные реактивы: TRIS (Трис[гидроксиметил]аминометан) (ICN Pharmaceuticals), триптон и дрожжевой экстракт (Difco), поливиниловый спирт марки 16/1 (средняя ММ 84 кДа, степень деметилирования 99%, ЕрмакХим (Россия)), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) ч.д.а. (Merck), антрон, ч.д.а., гидроксид калия ч.д.а. (Лабтех), крахмал (картофельный “высшего сорта”, Бельнический крахмальный завод, Беларусь, ГОСТ 7699-78).

Коммерческие препараты ферментов: Cellulase (*Trichoderma viride*) (Sigma), α -amylase (*Aspergillus oryzae*) (Sigma), pectinase (*Aspergillus niger*) (Sigma), chitinase (*Trichoderma viride*) (Sigma), endo-1,4 β -mannanase (*Aspergillus niger*) (Megazyme), endo-1,4- β -xylanase (*Trichoderma viride*) (Megazyme).

Аналитические наборы для определения концентрации химических веществ: Фотоглюкоза 2/4 (Импакт, Россия), Иммолюм (Люмтек, Россия), Lactate Dry-Fast (Sentinel,

Италия), Fumarate detection kit (Abcam, Англия), Succinic Acid Assay Kit (Megazyme, Ирландия), Total Starch Assay Kit (Megazyme, Ирландия).

Образцы сточных вод, используемые в работе: сточная вода Останкинского Совхоза Декоративного Садоводства (г. Москва), сточная вода Останкинского Молочного Комбината (г. Москва).

2.1.2 Приборы

Культивирование клеток микроводорослей осуществлялось при освещении люминесцентными лампами Osram Fluora 77 (30 Вт) (Германия)

Культивирование клеток мицелиальных грибов и бактерий проводилось на термостатируемом шейкере-инкубаторе «Adolf Kuhner AG» (Швейцария) и «BioSan ES-20» (Литва).

Для отделения клеток от среды культивирования использовались центрифуги Beckman J-2-21 (США) и Eppendorf centrifuge 5415R (Германия).

Спектрофотометрические исследования проводились на спектрофотометре «Agilent UV-853» (Германия), оборудованном термостатируемой ячейкой.

Определение внутриклеточной концентрации АТФ проводилось с использованием микролюминометра New Horizons diagnostics Co., MODEL 3560 (США).

Механическая дезинтеграция биомассы микроводорослей проводилась на шаровой мельнице Mini-Beadbeater-24 (США).

Для наблюдения за клетками микроорганизмов использовался световой микроскоп Биомед (Россия) с насадкой БиомедЛюм206070112209 и цифровой камерой для микроскопа Myscope 500M.

Перемешивание растворов осуществлялось на Термошейкере Biosan TS-100 (Латвия).

Взвешивание образцов осуществлялось на весах: электронных лабораторных CAS MWP (Корея) и аналитических Mettler Toledo ML (Швейцария).

Высушивание образцов проводилось в сухожаровом шкафу ШС-80-01 СПУ (Россия).

Значения pH приготовленных сред и отбираемых в процессе экспериментов проб контролировались с помощью pH-метра Corning Pinnacle 530 (Швейцария).

Для проведения ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей использовался термостат Binder (США).

Для аналитических исследований использовался жидкостной хроматограф Knauer Smartline Pump 1000 (Германия) с УФ-детектором, газовый хроматограф ЛХМ 8 МД - модель 3 (Россия) с катарометром и хромато-масс-спектрометр Trace 1300 ISQ (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение уровня биолюминесценции клеток фотобактерий проводилось на люминометре 1250 LKB-Wallac (Швеция).

Термическая обработка жидких сред (стерилизация) осуществлялась в Стерилизаторе паровом ВК-75-01 (Россия).

2.1.3 Микроорганизмы

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-П, *Nostoc sp.*, *Gloeotrichia echinulata*, полученные 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 им. М.В. Ломоносова.

В работе использовались штаммы мицелиальных грибов *Rhizopus oryzae* F-814, *R. oryzae* F-1032, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

В работе использовались штаммы бактерий *Actinobacillus succinogenes* В-10111, *Cupriavidus necator* В-8619, полученные из ВКПМ и *Photobacterium phosphoreum* КМ МГУ №311, полученные из Коллекции микроорганизмов МГУ.

2.1.4 Источники углеводсодержащего сырья, использованного в работе

В качестве сырья в работе использовались:

- биомасса фототрофных микроорганизмов (п. 2.1.3);
- биомасса макроводорослей: *Laminariae saccharina* (ОАО Красногорсклекарства, Р №ЛС-001856 от 30.12.2011), *Asparagopsis taxiformis*, *Ulva lactuca* (собраны на побережье Вьетнама и идентифицированы в Институте Химии Вьетнамской Академии наук);
- образцы целлюлозосодержащих отходов (ЦСО): свекловичный жом (ЭкспоДон, Ростов-на-Дону, Россия), пшеничная солома (Место скоса - Тульская область, Россия), осиновые, березовые и сосновые опилки (ЗАО Боровичи-Мебель, г. Боровичи, Россия), клубни и стебли топинамбура (ООО Эспланада-Южная, Краснодарский край, Россия), рисовая солома, багасса (GIA GIA NGUYEN CO, LTD, Вьетнам).

2.2 Методы

2.2.1 Культивирование клеток различных микроорганизмов

-клеток фототрофных микроорганизмов:

Культивирование клеток микроводорослей *C. vulgaris* осуществлялось на среде Тамийя [165] с добавлением 5 г/л глюкозы, модельных питательных средах, имитирующих бытовые сточные воды и сточные воды пищевой промышленности и реальных сточных водах Останкинского Молочного Комбината (г. Москва) и Останкинского Совхоза Декоративного Садоводства (г. Москва).

Состав модельной питательной среды, имитирующей бытовые сточные воды (Сточная вода №1) (мг/л) [166]: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ – 91,7, $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 131,6, триптон – 17,4, дрожжевой экстракт – 52,2, крахмал – 122,0, молочный порошок – 116,2, масло подсолнечное – 29,0, NH_4Cl – 12,8, $\text{MgHPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 29,0, KH_2PO_4 – 23,4, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,8, раствор микроэлементов – 1 мл. Раствор микроэлементов содержит (мг/л): $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ – 770, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 536, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 108, $\text{NiSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 336, PbCl_2 – 100, ZnCl_2 – 208 (pH 7,1).

Состав модельной питательной среды, имитирующей сточные воды пищевой промышленности (Сточная вода №2) (мг/л) [167]: сахароза – 1282, крахмал – 173,6, CaCl_2 – 185,0, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 252,8, K_2SO_4 – 1063, NaHCO_3 – 128,9, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 7,1, KH_2PO_4 – 17,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 72,3, раствор микроэлементов – 1 мл. Раствор микроэлементов содержит (мг/л): $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 350,9, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 879,7, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 268,2, CoCl_2 – 44,1, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ – 352,8, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 25,2, $\text{NiNO}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 346,9 (pH 7,0).

Состав сточных вод Останкинского Совхоза Декоративного Садоводства (Сточная вода №3) (мг/л): ХПК – 990, N-NH₄ – 41,4, N общ – 52,5; P общ – 8,8 (pH 7,2).

Состав сточных вод Останкинского Молочного Комбината (Сточная вода №4) (мг/л): ХПК – 1610, N-NH₄ – 34,6, N общ – 61,5, P общ – 10,6 (pH 7,6).

Культивирование клеток микроводорослей *Dunaliella salina* Teod. штамм *rsemsu-D-1* осуществлялось на среде Семененко-Абдуллаева [165], микроводорослей *Nannochloropsis sp.* штамм *rsemsu-N-1*, *Chlamydomonas sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Cosmarium sp.* и цианобактерий *Nostoc sp.* – на среде BG-11 [165], микроводорослей *Galdieria partita* Sentz. штамм *rsemsu-G-3* – на среде Аллен [165], микроводорослей *Haematococcus pluvialis* – на среде ОНМ [165], микроводорослей *Thalassiosira weissflogii* – на среде f/2 [165], цианобактерий *Arthrospira / Spirulina platensis* (NORDST.) GEITL. штамм 1/02-П – на среде Заррука [165], цианобактерий *Gloeotrichia echinulata* – на среде ZG-11 [165].

Культивирование фототрофных микроорганизмов проводилось в аэробных условиях при температуре 25 °С в режиме круглосуточного освещения люминесцентными лампами. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,2.

-клеток мицелиальных грибов:

Культивирование клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* F-814, *R. oryzae* F-1032 осуществлялось на среде следующего состава (г/л): глюкоза – 100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,36, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,07, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ – 1. Культивирование проводилось в аэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин) при температуре 28 °С. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,2.

-клеток бактерий:

Культивирование клеток бактерий *A. succinogenes* В-10111 с целью накопления их биомассы осуществлялось на «среде роста» (г/л): глюкоза – 20; дрожжевой экстракт – 5, NaHCO_3 – 10, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 8,5, KH_2PO_4 – 15,5; с целью накопления ЯК на «рабочей среде» (г/л): глюкоза – 50, дрожжевой экстракт – 5, KH_2PO_4 – 3,0, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, CaCl_2 – 0,2, NaCl – 1. Культивирование проводилось в анаэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин) при температуре 37 °С. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,5. Значение pH устанавливалось на уровне $6,8 \pm 0,2$ при использовании 2 М раствора Na_2CO_3 . Для поддержания pH $6,8 \pm 0,2$ использовался MgCO_3 в концентрации 25 г/л.

Культивирование клеток бактерий *C. necator* В-8619 осуществлялось на Средах 1-4.

Состав Среда-1 (г/л): глюкоза – 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4, KH_2PO_4 – 13,3, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,2, лимонная кислота – 1,7, раствор микроэлементов – 10 мл. Раствор микроэлементов содержит (г/л в 0,1 М HCl): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 10, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,25, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 1,0, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,0, H_3BO_3 – 0,3, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ – 0,1. Составы Сред 2, 3 и 4 аналогичны составу Среда-1 за исключением того, что в них вместо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вводились $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4Cl и NH_4NO_3 соответственно. Культивирование проводилось в аэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин) при температуре 28 °С. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,2. Для поддержания pH $7,0 \pm 0,2$ использовался 2 М раствор KOH.

Культивирование клеток фотобактерий *P. phosphoreum* КМ МГУ №311 осуществлялось на среде Фаргали с добавлением дрожжевого экстракта и пептона [168].

2.2.2 Иммобилизация микроорганизмов в криогель поливинилового спирта

- Иммобилизация клеток фототрофных микроорганизмов

Для проведения иммобилизации клетки микроводорослей *C. vulgaris* С-1 культивировались в среде Тамия до конца экспоненциальной фазы роста, накопленная биомасса клеток осаждалась центрифугированием (4000 об/мин, 15 мин), далее осадок влажной биомассы смешивался с 5-20%-ным раствором ПВС, приготовленном на среде

Тамийя или стерильной водопроводной воде так, чтобы содержание в смеси сухой биомассы составило 4%, и ресуспендировался до получения гомогенной суспензии клеток. Для формирования гранул приготовленная смесь с помощью стерильного шприца или пипетки наносилась на охлажденную поверхность в виде мелких капель. Полученный материал помещался в морозильную камеру при -70°C и хранился при этой же температуре в герметичных условиях. Размораживание проводилось в 2 этапа: образцы выдерживались около 3-х часов при -20°C и далее при $+7^{\circ}\text{C}$ в течение такого же периода.

Иммобилизация клеток других фототрофных микроорганизмов осуществлялась аналогичным образом.

-Иммобилизация спорового материала грибных культур

Иммобилизация спорового материала грибных культур осуществлялась согласно известному способу [169]: 95 мл суспензии спор в физиологическом растворе с концентрацией 5×10^6 кл/мл ресуспендировалось в 1050 г 12 % водного раствора ПВС до получения гомогенной суспензии. Для формирования гранул криогеля ПВС с иммобилизованными спорами приготовленная смесь с помощью стерильного шприца распределялась по ячейкам 96-луночных планшетов, которые помещались в морозильную камеру при -18°C и выдерживались при этой же температуре. Размораживание образцов проводилось при $+7^{\circ}\text{C}$ в течение 3-х часов.

-Иммобилизация клеток бактерий

Для проведения иммобилизации клетки бактерий *A. succinogenes* В-10111 культивировались в среде роста до конца экспоненциальной фазы роста, накопленная биомасса клеток осаждалась центрифугированием (8000 об/мин, 15 мин), далее осадок влажной биомассы смешивался с 10-15%-ным раствором ПВС, приготовленном на среде, в которой культивировались клетки, так, чтобы содержание в смеси сухой биомассы составило 1-3%, и ресуспендировался до получения гомогенной суспензии клеток. Для формирования гранул приготовленная смесь с помощью стерильного шприца распределялась по ячейкам 96-луночных планшетов. Полученный материал помещался в морозильную камеру при -70°C и хранился при этой же температуре. Размораживание проводилось в 2 этапа: образцы выдерживались около 3-х часов при -20°C и далее при $+7^{\circ}\text{C}$ в течение такого же периода.

2.2.3 Анализ состава биоорганических компонентов биомассы клеток микроорганизмов

2.2.3.1 Определение сухого веса (влажности) биомассы клеток микроорганизмов

Определение сухого веса биомассы клеток проводилось согласно известной методике [170]. Стекланные бюксы помещались в сушильный шкаф и сушились в течение 2 ч при температуре 110°C . Затем бюксы вынимались пинцетом из сушильного шкафа и

переносились в эксикатор с безводным CaCl₂. Через 1 ч бюксы взвешивались с точностью до 0,1 мг. Высушивание и взвешивание повторялось с соблюдением указанной последовательности операций, пока масса не достигала постоянного значения, то есть колебания в ее определениях не превышали ± 0,1 мг.

2.2.3.2 Определение содержания липидов

Перед определением липидов и их экстракцией влажная биомасса клеток микроорганизмов подвергалась термообработке на водяной бане при 100°C в течение 10 мин. Экстракция липидов из предобработанной биомассы осуществлялась по методу Фольша [171].

Определение липидов проводилось спектрофлуориметрически (по взаимодействию с флуоресцентным красителем Нильский красный). Для спектрофлуориметрического анализа в кювету, содержащую 2 мл 50 мкМ Нильского красного в ДМСО, добавлялось 10 мкл анализируемого раствора органической фазы и определялась интенсивность флуоресценции при длине волны 635 нм, возбуждаемой светом с длиной волны 485 нм.

В аналогичных условиях определялось изменение интенсивности флуоресценции для растворов с известной концентрацией липидов. Масса экстрагированных липидов рассчитывалась с использованием определённой концентрации и известного объёма органической фазы. Определение, включая стадию экстракции, проводилось в трёх повторностях.

2.2.3.3 Определение содержания белков

Осадки биомассы клеток микроорганизмов после экстракции липидов высушивались при 50 °С в течение 20 ч и затем взвешивались.

Экстракция белка проводилась добавлением к осадку 1 мл 4% додецилсульфата натрия в 0,1 М TRIS-HCl буфере (pH 8,5). Осадки ресуспендировались, выдерживались на термошейкере при 60 °С и 1400 об/мин. в течение 30 мин. и центрифугировались (13200 об/мин., 5 мин). Экстракция проводилась 2–3 раза, после чего определялась концентрация белка в суммарном экстракте по оптической плотности растворов при длине волны 260 и 280 нм с использованием следующей формулы [172]:

$$C(\text{мг} / \text{мл}) = 1,55 \times A_{260} - 0,76 \times A_{280} \quad (1)$$

Масса белков рассчитывалась согласно определённой концентрации и известному объёму экстракта. Определение, включая стадию экстракции, проводилось в трёх повторностях.

2.2.3.4 Определение содержания углеводов

Осадки биомассы клеток микроорганизмов после экстракции белка высушивались при 60 °С в течение 20 ч, а затем взвешивались. К навеске осадка добавлялось 100 мкл воды и 1,9 мл конц. H₂SO₄. После этого полученная смесь выдерживалась на термошейкере при 60 °С и 1400 об/мин. до полного растворения осадка. Перед определением аликвота полученного гидролизата разбавлялась в 100–200 раз.

Определение общего содержания углеводов в белковом экстракте и гидролизате осадка проводилось с использованием фенольного метода [173]. Для этого к 0,16 мл анализируемой пробы добавлялось 0,16 мл 5% водного раствора фенола, а затем 0,8 мл H₂SO₄ (конц.). Полученная смесь перемешивалась. Через 10–20 мин. пробы охлаждались до комнатной температуры, и в них определялась оптическая плотность при длине волны 490 нм.

В качестве стандарта использовался водный раствор глюкозы с концентрацией 10–180 мкг/мл. Содержание углеводов рассчитывалось путем суммирования растворимой и нерастворимой составляющих. Определение проводилось в трёх повторностях.

2.2.3.4.1 Определение содержания целлюлозы в биомассе микроводорослей *C. vulgaris*

Экстракция целлюлозы и определение ее содержания в биомассе микроводорослей *C. vulgaris* С-1 проводились по методу Апдеграфа [174, 175].

2.2.3.4.2 Определение содержания крахмала в биомассе микроводорослей *C. vulgaris*

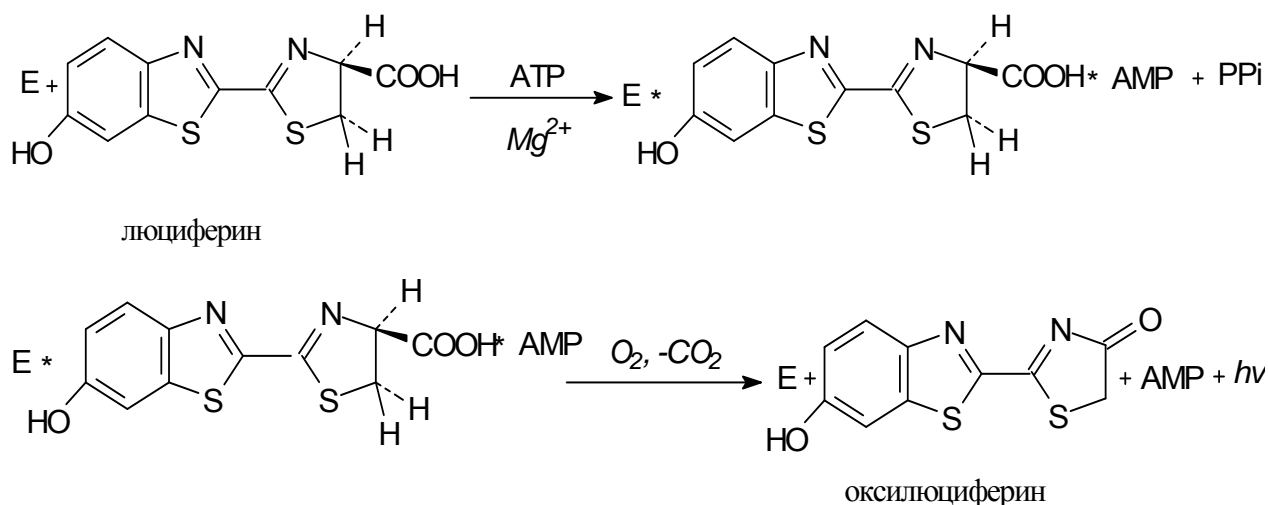
Содержание крахмала в биомассе микроводорослей *C. vulgaris* С-1 определялось ферментативным методом с применением реагентов фирмы Megazyme (Ирландия) [176]. Согласно инструкции производителя, в ходе ферментативной реакции термостабильная α -амилаза гидролизует крахмал в растворимые мальтодекстрины. Далее глюкоамилаза гидролизует мальтодекстрины в D-глюкозу. D-глюкоза под действием глюкозооксидазы окисляется в глюконовую кислоту, при этом образуется эквимольное количество H₂O₂. Под действием пероксидазы H₂O₂ окисляет 4-аминоантипирин в присутствии 4-гидроксibenзойной кислоты в окрашенное соединение (хинонимин), интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом образце и измеряется спектрофотометрически при длине волны 510 нм.

2.2.4 Определение концентрации внутриклеточного АТФ биолюминесцентным методом

Выживаемость клеток микроорганизмов контролировалась определением концентрации внутриклеточного АТФ. В свою очередь, концентрация АТФ определялась люциферин-люциферазным методом с использованием стандартного реагента,

разработанного на кафедре химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова [177].

Схема биолюминесцентной реакции выглядит следующим образом:



где: E – люцифераза; PP_i – неорганический пирофосфат; ATP – внутриклеточный АТФ, AMP – аденозинмонофосфат, $h\nu$ - квант света.

Квантовый выход реакции равен 1. При образовании одной молекулы оксилуциферина выделяется 1 квант света, что и определяет высокую чувствительность метода. Он позволяет определить концентрацию АТФ до 10^{-12} - 10^{-14} М. Скорость реакции пропорциональна интенсивности излучаемого света (измеряется с помощью люцинометра).

Концентрация внутриклеточного АТФ в свободных клетках микроорганизмов определялась следующим образом: к 0,1 мл клеточной суспензии добавлялось 0,9 мл ДМСО. В полученном экстракте анализировалось содержание АТФ.

Экстракция АТФ из клеток, иммобилизованных в криогель ПВС, проводилась следующим образом: гранулы биокатализатора подсушивались 20-30 секунд при комнатной температуре, взвешивались, заливались 1 мл ДМСО и нагревались в течение нескольких секунд до температуры 70-80 °С. При этом происходила исчерпывающая экстракция АТФ из клеток.

Для измерения концентрации АТФ 50 мкл экстракта из клеток вносилось в кювету люцинометра, содержащую 50 мкл люциферин-люциферазного реагента.

Для построения калибровочного графика использовались стандартные растворы динатриевой соли АТФ в концентрации 10^{-8} - 10^{-5} М.

Расчет концентрации АТФ (моль/г) для иммобилизованных клеток в образце проводился по формуле:

$$[ATP]_{экстраг.} = \frac{I \times V_1 \times [ATP]_{ст.} \times V_{ст.}}{m \times V_{экт.} \times I_{ст.} \times V_2},$$

где I – интенсивность свечения образца, мВ;

$I_{ст.}$ – интенсивность свечения стандарта, мВ;

V_1 – объем реакционной смеси до добавления стандарта АТФ, мл;

V_2 – объем реакционной смеси после добавления стандарта АТФ, мл;

$V_{экт.}$ – объем экстракта, мл;

$V_{ст.}$ – объем стандарта АТФ, мл;

$[ATP]_{ст.}$ – концентрация АТФ в стандартном растворе, моль/л;

m – масса клеток, иммобилизованных в криогель ПВС (г), отнесенная к объему реакционной смеси (л).

Для свободных клеток расчет концентрации внутриклеточного АТФ производился аналогично расчету для иммобилизованных клеток, однако в этом случае отсутствовала величина m и полученный результат имел размерность моль/л.

2.2.5. Проведение и оценка эффективности гидролиза клеток микроводорослей *C. vulgaris*

2.2.5.1. Проведение кислотного гидролиза

-Кислотный гидролиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1 без ее предварительной обработки

Накопленная биомасса микроводорослей *C. vulgaris* С-1 осаждалась центрифугированием (8000 об/мин, 10 мин), осадок ресуспендировался в 0,4÷2,0 н растворах H_2SO_4 или HCl , далее полученная суспензия подвергалась термолизу в автоклаве в течение 25-70 мин при температуре 108, 121 °С и давлении 0,5, 1,0 ати соответственно. Исходная концентрация биомассы микроводорослей во всех экспериментах была одинакова и равна 20 г сух. в-в/л. По окончании процессов производилась нейтрализация кислоты 2,5 М раствором $NaOH$, и из реакционной смеси отбирались пробы для определения концентрации ВС и глюкозы.

-Кислотный гидролиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1 с ее предварительной механической дезинтеграцией

Предварительная механическая дезинтеграция биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1 проводилась в шаровой мельнице Mini-BeadBeater-24 (размер стеклянных бус 0,5 мм, скорость вращения ротора 3000 об/мин, в ячейки объемом 0,5 мл загрузка биомассы составляла по 80 мг по сух. в-вам) в течение 3-5 мин. Степень дезинтеграции биомассы оценивалась микробиологическим методом с использованием счетной камеры Горяева и

рассчитывалась как процентное отношение разницы значений количества целых клеток в образце определенного объема до и после дезинтеграции в течение определенного промежутка времени к исходному количеству клеток. Дезинтегрированная таким образом биомасса *C. vulgaris* C-1 далее подвергалась кислотному гидролизу растворами H_2SO_4 в указанных выше условиях.

2.2.5.2 Проведение ферментативного гидролиза

-Ферментативный гидролиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 без ее предварительной обработки

Накопленная биомасса микроводорослей *C. vulgaris* C-1 осаждалась из среды роста центрифугированием (8000 об/мин, 10 мин), осадок влажной биомассы ресуспендировался в Na-ацетатном буфере (pH 5,5), в полученную суспензию вносился комплекс ферментных препаратов. Концентрация биомассы при этом была 20 г сух. в-в/л. Гидролиз проводился при 37 °С в течение 20 ч. Через определенные промежутки времени из реакционной смеси отбирались пробы для определения концентрации ВС и глюкозы.

-Ферментативный гидролиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 с ее предварительным термолизом

Предварительный термолиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 проводился в Na-ацетатном буфере (pH 5,5) при температуре 108, 121 °С и давлении 0,5, 1 ати, соответственно, в течение 15÷60 мин. Исходная концентрация биомассы при этом была 20 г сух. в-в/л. Предобработанная таким образом биомасса *C. vulgaris* C-1 далее подвергалась ферментативному гидролизу в указанных выше условиях.

-Ферментативный гидролиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 с предварительной обработкой ее ИЖ

Предобработка ИЖ биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 осуществлялась с использованием 1-бутил-3-метилимидазолия хлорида ([Bmim]Cl). К навеске биомассы добавлялась навеска ИЖ. Массовая доля биомассы микроводорослей в смеси с ИЖ по сухим веществам составляла 4%. Полученная смесь выдерживалась в сушильном шкафу в течение 30, 60 мин при температуре 100, 120 °С. Далее ИЖ удалялась следующим образом: рабочая смесь ресуспендировалась в дистиллированной воде, подвергалась центрифугированию (10000 об/мин, 3 мин), после чего с осадком проводилась повторная операция до тех пор, пока концентрация ИЖ в промывных водах составляла не более 0,2 г/л (концентрация ИЖ определялась спектрофотометрически по оптической плотности раствора при длине волны 210 нм). Предобработанная таким образом биомасса *C. vulgaris* C-1 далее подвергалась ферментативному гидролизу в указанных выше условиях.

-Ферментативный гидролиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 с ее предварительной механической дезинтеграцией

Предварительная механическая дезинтеграция биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 проводилась в шаровой мельнице Mini-BeadBeater-24 (размер стеклянных бус 0,5 мм, скорость вращения ротора 3000 об/мин, в ячейки объемом 0,5 мл загрузка биомассы составляла по 80 мг по сух. в-вам) в течение 4 мин. Дезинтегрированная таким образом биомасса *C. vulgaris* C-1 далее подвергалась ферментативному гидролизу в указанных выше условиях.

2.2.6 Получение органических кислот

-молочной кислоты

Трансформация ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 в молочную кислоту под действием иммобилизованного биокатализатора (ИБК) на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 осуществлялась при 28 °С в аэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин) в течение 40 ч. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,2. Для поддержания рН $6,6 \pm 0,2$ использовался 2,5 М раствор NH_4OH . Начальная концентрация ИБК была 30 г сух. в-в/л.

-фумаровой кислоты

Трансформация ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 в фумаровую кислоту под действием ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 осуществлялась при 28 °С в аэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин) в течение 40 ч. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,2. Начальная концентрация ИБК была 30 г сух. в-в/л.

-янтарной кислоты

Трансформация ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* C-1 в янтарную кислоту под действием ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* осуществлялась при 37 °С в анаэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин). Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,5. Значение рН в гидролизате устанавливалось на уровне $6,8 \pm 0,2$ при использовании 2 М раствора Na_2CO_3 и поддерживалось на этом уровне введением в среду MgCO_3 . Начальная концентрация ИБК была 20 г сух. в-в/л.

2.2.7 Биосорбция клеток микроводорослей *C. vulgaris*

Биосорбция клеток микроводорослей *C. vulgaris* C-1 из сточных вод осуществлялась иммобилизованными клетками мицелиальных грибов *R. oryzae* F-814 и *R. oryzae* F-1032,

множественно использованными в процессах получения органических кислот из ферментоллизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1. Процесс проводился при 28 °С в аэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин) в течение 24 ч. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,2.

2.2.8 Получение метана

Трансформация биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1, клеток иммобилизованных мицелиальных грибов *R. oryzae* F-1032 и их смесей осуществлялась согласно ранее разработанному способу [13]. В качестве биокатализатора метаногенеза использовался анаэробный ил, взятый с очистных сооружений завода по изготовлению чипсов ФритоЛей (г. Кашира) из действующего анаэробного реактора. Анаэробный ил имел следующие характеристики: беззольное вещество биомассы (БВБ) – 35,5 г/л; метаногенная активность – 252,3 мг ХПК/г БВБ/сут; сухой вес – 57,2 г/л; зольность – 38,0%. Процесс метаногенеза проводился при термостатировании реакторов при 35°С. Все образцы биомассы перед началом метаногенеза подвергались термообработке при 108°С и 0,5 ати в течение 0,5 ч.

2.2.9 Получение пиролизной нефти

Пиролиз биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1 и ее смеси с иммобилизованными клетками мицелиальных грибов *R. oryzae* F-1032 осуществлялся в термогравиметрическом анализаторе в атмосфере N₂ при температуре 500 °С в течение 5 мин известным способом [178]. По окончании пиролиза твердая и жидкая фракция экстрагировались CH₂Cl₂, отделялись фильтрованием и после испарения CH₂Cl₂ взвешивались. Жидкие фракции продуктов превращения образцов исследовались методом хромато-масс-спектрометрии с использованием хромато-масс-спектрометра Trace 1300 ISQ (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.10 Получение ПГА

Трансформация ферментоллизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1 в ПГА под действием клеток бактерий *C. necator* осуществлялась при 28 °С в аэробных условиях с постоянным перемешиванием (180 об/мин) в течение 15 ч. Соотношение жидкой и газовой фаз в мини-реакторе составляло 0,2. Для поддержания рН 7,0±0,2 использовался 2 М раствор КОН. Начальная концентрация бактерий *C. necator* составляла 5 г сух. в-в/л.

2.2.11 Определение ХПК

ХПК определялось бихроматным методом, в котором в качестве окислителя использовался $K_2Cr_2O_7$, при этом Cr(VI) восстанавливается до Cr(III) с изменением окраски раствора с оранжевого в зеленый.

В пробирки с герметичными пробками последовательно вносилось 3 мл H_2SO_4 (конц), 200 мг смеси Ag_2SO_4 и $HgSO_4$ в весовом соотношении 1:1, 1,3 мл 0,2083 н раствора $K_2Cr_2O_7$ бихромата калия и 2,1 мл исследуемого образца. Закрытые пробирки тщательно перемешивались и помещались на 2 ч в нагревательный блок при $160\text{ }^{\circ}C$. После охлаждения до комнатной температуры оптическая плотность определялась при длине волны 600 нм против раствора сравнения, приготовленного таким же образом, но без добавления пробы. ХПК определялось с помощью калибровочного графика в диапазоне концентраций от 0,1 до 1,2 г ХПК/л с использованием растворов глюкозы и $CH_3COONa \times 3H_2O$ известной концентрации.

2.2.12 Определение концентрации ВС

Определение концентрации ВС проводилось с использованием метода Шомоди-Нельсона [179].

2.2.13 Определение концентрации глюкозы

Для определения концентрации глюкозы в среде использовался глюкозидазный метод с применением стандартного реагента фирмы Импакт (Россия).

Согласно инструкции производителя в результате окисления β -D-глюкозы под действием глюкооксидазы образуется эквимолярное количество перекиси водорода. Под действием пероксидазы H_2O_2 окисляет 4-аминоантипирин в присутствии фенола в окрашенное соединение (хинонимин), интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом образце и измеряется спектрофотометрически при длине волны 500 нм.

2.2.14 Определение концентрации органических кислот

- молочной кислоты

Концентрация L(+)-изомера МК определялась ферментативным лактатоксидазно-пероксидазным методом с применением реагента фирмы Sentinel (Италия). В ходе ферментативной реакции L-МК окисляется лактатоксидазой до пирувата, при этом образуется H_2O_2 . В присутствии H_2O_2 под действием пероксидазы 4-аминоантипирин

окисляется и конденсируется с бесцветным донором водорода - N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-метиланилином с образованием окрашенного соединения - хинонимина.

Количество хинонимина, которое образуется в ходе ферментативной реакции, эквивалентно исходному количеству L-МК.

Рабочие растворы готовились согласно методикам фирмы–производителя Sentinel (Италия). При проведении расчетов учитывалась концентрация стандартного раствора L-МК, который содержится в наборе реактивов. Расчет концентрации L-МК в образцах проводился с использованием уравнения:

$$MK=(A/As)\times MKs,$$

где MK и MKs – концентрация МК в образце и стандарте, соответственно, г/л;

A и As – оптическая плотность раствора образца и стандарта, соответственно, при длине волны 550 нм.

-фумаровой кислоты

Концентрация фумаровой кислоты определялась ферментативным методом с применением реагента фирмы Abscam Inc. (США). В ходе ферментативной реакции фумаровая кислота (фумарат) под действием сукцинатдегидрогеназы в комплексе с восстановленным флавинадениндинуклеотидом (ФАДН₂) восстанавливается до сукцината, при этом ФАДН₂ переходит в свою окисленную форму - окрашенное соединение ФАД.

Количество образующегося ФАД эквивалентно исходному количеству ФК.

Рабочие растворы готовились согласно методикам фирмы–производителя Abscam Inc. (США). При проведении расчетов учитывалась концентрация стандартного раствора фумаровой кислоты, который содержится в наборе реактивов. Расчет концентрации фумаровой кислоты в образцах проводился с использованием уравнения:

$$FK=(A/As)\times FKs,$$

где FK и FKs – концентрация фумаровой кислоты в образце и стандарте соответственно, г/л;

A и As – оптическая плотность раствора образца и стандарта соответственно при длине волны 450 нм.

- янтарной кислоты

Концентрация янтарной кислоты определялась ферментативным методом с применением реагента фирмы Megazyme (Ирландия). В ходе ферментативной реакции сукцинил-КоА-синтетаза в присутствии АТФ присоединяет янтарную кислоту (сукцинат) к коферменту А, при этом образуются аденозиндифосфат (АДФ) и неорганический фосфат. Под действием пируваткиназы АДФ реагирует с фосфоенолпируватом с образованием пирувата и АТФ. Далее пируват в присутствии восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) под действием L-лактат-дегидрогеназы

восстанавливается до L-лактата, при этом образуется соединение НАД⁺, обладающее, в отличие от восстановленной формы, способностью к поглощению УФ-света при длине волны 340 нм.

Количество НАД⁺, которое образуется в ходе ферментативной реакции, эквивалентно исходному количеству янтарной кислоты.

Рабочие растворы готовились согласно методикам фирмы–производителя Megazyme (Ирландия). При проведении расчетов учитывалась концентрация стандартного раствора янтарной кислоты, который содержится в наборе реактивов. Расчет концентрации янтарной кислоты в образцах проводился с использованием уравнения:

$$YK=(A/As) \times YKs,$$

где *YK* и *YKs* – концентрация янтарной кислоты в образце и стандарте соответственно, г/л;

A и *As* – оптическая плотность раствора образца и стандарта соответственно при длине волны 340 нм.

2.2.15 Определение содержания ПГА

Процесс экстракции ПГА из биомассы *C. necator* включал следующие стадии [180]: растворение ПГА в СНСl₃ путем перемешивания на термошейкере при 37 °С в течение 12 ч; отделение раствора ПГА от клеточного дезинтеграта фильтрованием; выделение ПГА из раствора СНСl₃ осаждением изопропиловым спиртом; последующее многократное растворение ПГА в СНСl₃ и осаждение изопропиловым спиртом; высушивание при 60 °С до постоянной массы и взвешивание.

2.2.16 Определение концентрации фурфурола, оксиметилфурфурола и муравьиной кислоты в кислотных гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*

Анализ содержания фурфурола, оксиметилфурфурола и муравьиной кислоты (продуктов трансформации сахаров) в кислотных гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1 проводился с использованием метода ВЭЖХ на хроматографе Knauer Smartline Pump 1000 с УФ-детектором, элюент – 5 мМ раствор серной кислоты, скорость потока 0,6 мл/мин, температура термостата колонок 60 °С.

2.2.17 Оценка токсичности гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с использованием иммобилизованных клеток фотобактерий *P. phosphoreum*

Оценка токсичности гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* С-1 проводилась согласно известному способу [181] с использованием иммобилизованных в криогель ПВС клеток фотобактерий *P. phosphoreum*, полученных в соответствии с известной

методикой [181]. Для анализа токсичности проб к одной грануле с иммобилизованными клетками *P. phosphoreum*, помещенной в кювету люминометра, добавлялось 1000 мкл 2% раствора NaCl. После 1-2 минут термостатирования регистрировались показания аналитического сигнала (I_0). В другую кювету вносилось 900 мкл 2% раствора NaCl и 100 мкл анализируемой пробы. После экспонирования пробы в течение 30 мин снова регистрировалась величина аналитического сигнала ($I_{\text{ост}}$). На основе полученных данных рассчитывалось тушение сигнала биолуминесценции как процентное отношение разницы I_0 и $I_{\text{ост}}$ к I_0 .

2.2.18 Определение кинетических параметров процессов

При проведении расчетов предполагалось, что изучалась закрытая (периодическая) система, в которой существенные для роста компоненты в процессе роста клеток не поступали в систему дополнительно и не покидали ее в течение каждого цикла. В закрытой системе скорость роста клеток в конечном итоге стремится к нулю либо из-за недостатка субстрата, либо из-за ингибирования продуктом при его дальнейшем накоплении [182].

С учетом вышеизложенного положения *удельная скорость роста* (μ) клеток представляет собой скорость роста единицы популяции:

$$dC/dt = \mu \times C,$$

где t – время роста культуры, сут или ч;

C – концентрация клеток в момент времени t , г/л;

μ – удельная скорость роста клеток, сут⁻¹ или ч⁻¹.

На участке экспоненциального (логарифмического) роста удельная скорость роста постоянна, она определялась из уравнения:

$$\ln C = \ln C_0 + \mu \times t,$$

где C_0 – начальная концентрация клеток, г/л.

Закон постоянного экспоненциального роста выполняется, если условия окружающей среды и состав биомассы остаются постоянными. Если скорость роста не подчиняется этому закону, то не выполняется, либо одно, либо оба из вышеперечисленных условий.

Показатели конверсии субстрата Y_i рассчитывались по формуле:

$$Y_i = \frac{\sum_{j=1}^n M_j}{\sum_{j=1}^n S_j} = \frac{\Delta M}{\Delta S},$$

где i – условное обозначение соответствующего коэффициента конверсии;

$j = 1 \dots n$ – число циклов, в течение которых происходила трансформация субстрата;

M – концентрация конечного продукта трансформации субстрата, г/л;

S – концентрация субстрата, потребленного в процессе культивирования клеток г/л.

Скорости накопления Q_i (*скорость накопления продукта Q_p* (продуктивность процесса по продукту), г/л/ч, *и скорость накопления биомассы клеток (продуктивность процесса по биомассе) Q_c* , мг сух. в-в/л/сут или мг сух. в-в/л/ч) рассчитывались по формулам:

$$Q_p = P/t,$$

$$Q_c = C/t,$$

где P – концентрация продукта в момент времени t , г/л,

C – концентрация клеток в момент времени t , мг сух. в-в/л.

Продуктивность биокатализатора была рассчитана по формуле:

$$\Pi_{кат} = \frac{P \times (V_{реакт} + V_{гран})}{t \times m_{кат}} \times 1000,$$

где $\Pi_{кат}$ – продуктивность биокатализатора, (г Р/ч/кг сух. в-в биокатализатора),

t – время проведения процесса, ч,

P – концентрация продукта, накопившаяся в среде за время t , г/л,

$V_{реакт}$ – объем среды в реакторе, л,

$V_{гран}$ – объем среды в гранулах, л,

$m_{кат}$ – масса гранул катализатора в реакторе, г сух. в-в.

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

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Ранее уже было отмечено (см. п. 1.1), что использование сточных вод, богатых биоорганическими соединениями, которые могут быть использованы в качестве питательных сред для культивирования микроводорослей, является весьма перспективным, поскольку позволяет объединить технологии биологической очистки вод и накопления биомассы микроводорослей, являющейся ценным сырьем для получения различных промышленных продуктов. Следует, однако, отметить, что не все виды микроводорослей способны расти в среде сточных вод. Самыми перспективными, как уже было отмечено ранее (см. п.1.1), являются микроводоросли рода *Chlorella*. Целью данной части работы является разработка и исследование возможностей применения нового подхода к осуществлению процесса накопления биомассы клеток микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах разного состава.

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

На первом этапе исследований был проведен скрининг и изучены кинетические параметры процесса накопления биомассы различных образцов на примере клеток зеленых микроводорослей *C. vulgaris* с целью выбора штамма с высокой удельной скоростью роста (μ) и высокими значениями продуктивности (скорости) процесса по биомассе (Q_C).

В первую очередь был проведен выбор наиболее продуктивного по биомассе и лучшего по удельной скорости роста штамма микроводорослей *C. vulgaris* среди 5 культур (Таблица 9), полученных из разных коллекций РФ. Использовалась для этого питательная среда Тамийя с добавлением 5 г/л глюкозы (см. п. 2.2.1).

Таблица 9 – Значения удельной скорости роста клеток (μ) и средней скорости накопления биомассы (Q_C) исследуемых штаммов микроводорослей *C. vulgaris* в питательной среде Тамийя с добавлением 5 г/л глюкозы

Штамм	μ , сут ⁻¹	Q_C , мг сух. в-в/л/сут
С-1	0,42±0,02	306±10
С-2	0,36±0,01	149±5
С-7	0,29±0,01	86±3
С-75	0,37±0,01	152±6
С-82	0,34±0,01	134±5

Как видно из Таблицы 9, наибольшими значениями удельной скорости роста клеток и скоростью накопления биомассы характеризовался штамм *C. vulgaris* С-1, в связи с чем именно он использовался в дальнейших экспериментах.

Далее была исследована кинетика накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* С-1 (для удобства в дальнейшем обозначение штамма указываться не будет) в сточных водах различного состава (Рисунки 3, 4). Для проведения исследований были выбраны наиболее распространенные и значимые с практической точки зрения разновидности сточных вод: пищевого производства, агропромышленного комплекса и бытовых стоков. При этом были использованы как модельные среды, так и сточные воды реальных производственных предприятий, предоставленные по запросу МГУ имени М.В. Ломоносова (см. п. 2.2.1).

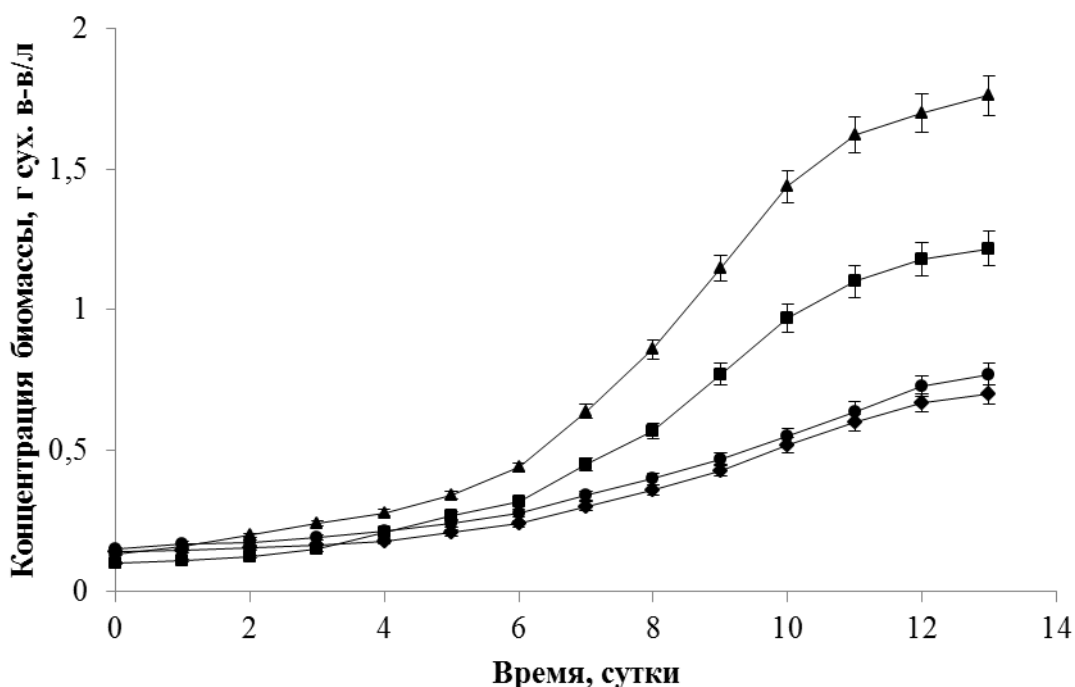


Рисунок 3 – Кинетика накопления биомассы клеток *C. vulgaris* в сточных водах №1 (◆), №2 (▲), №3 (●) и №4 (■) (см. п.2.2.1) при исходной концентрации биомассы клеток *C. vulgaris* 0,10-0,14 г сух. в-в/л

Из полученных данных следовало, что после 13 сут культивирования было отмечено накопление биомассы свободных клеток микроводорослей *C. vulgaris* в концентрациях более $0,55 \pm 0,02$ г сух. в-в/л во всех использованных видах сточных вод. Наибольшее значение концентрации биомассы (до $1,70 \pm 0,06$ г сух. в-в/л) было зафиксировано в случае выращивания клеток *C. vulgaris* в сточной воде №2, богатой сахарозой.

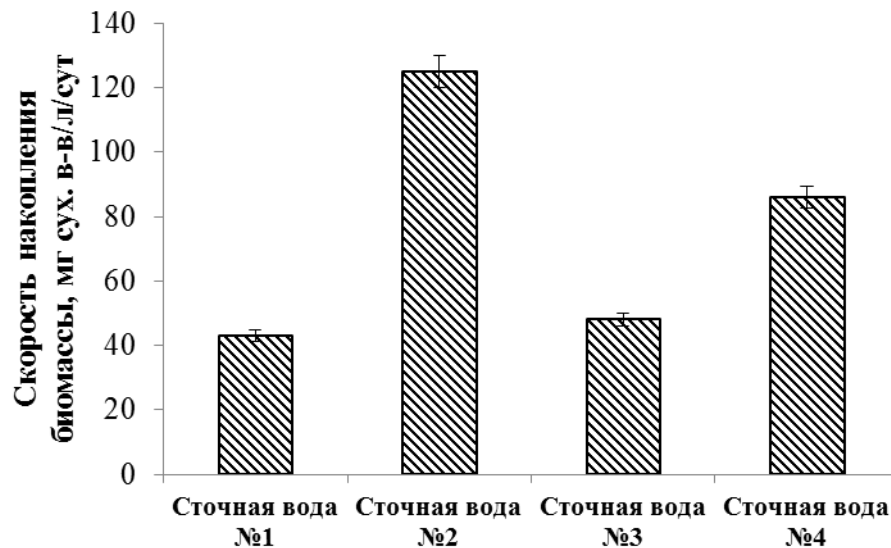


Рисунок 4 – Средняя скорость накопления за 13 сут биомассы клеток *C. vulgaris*, мг сух. в-в/л/сут, в сточных водах №1 - №4 (см. п. 2.2.1) при исходной концентрации клеток *C. vulgaris* 0,10-0,14 г сух.в-в/л

Из литературы известно, что клетками микроводорослей потребляются не все органические субстраты, наиболее пригодными для них являются отдельные сахара, спирты и органические кислоты [22-25]. Таким образом, очевидно, что в сточных водах, содержащих наиболее подходящие органические источники углерода, наблюдался более интенсивный - миксотрофный рост клеток микроводорослей, приводящий к большему накоплению их биомассы.

Следует отметить, что интенсивность роста клеток *C. vulgaris* оказалась чувствительна к их исходной концентрации в среде. Так, активный рост клеток начинался именно при достижении их концентрации 0,2-0,4 г сух. в-в/л (Рисунок 3).

Отмеченная по результатам экспериментов зависимость интенсивности роста клеток микроводорослей от их исходной концентрации в целом совпадает с результатами исследователей, выращивающих микроводоросли на модельных «классических» средах [183, 184].

Анализ полученных результатов позволил выдвинуть предположение о возможности увеличения средней скорости накопления биомассы, если исходную концентрацию клеток увеличить до 0,4 г сух. в-в/л (Рисунки 5, 6). В связи с этим далее была исследована кинетика роста клеток в сточных водах при данном значении $S_{БМ0}$. Наилучшие показатели роста клеток в течение 8 суток ($Q_C=210\pm 8$ мг сух. в-в/л/сут) были получены при использовании сточной воды №2, содержащей сахарозу, при этом прирост биомассы составил $1,68\pm 0,05$ г сух. в-в/л.

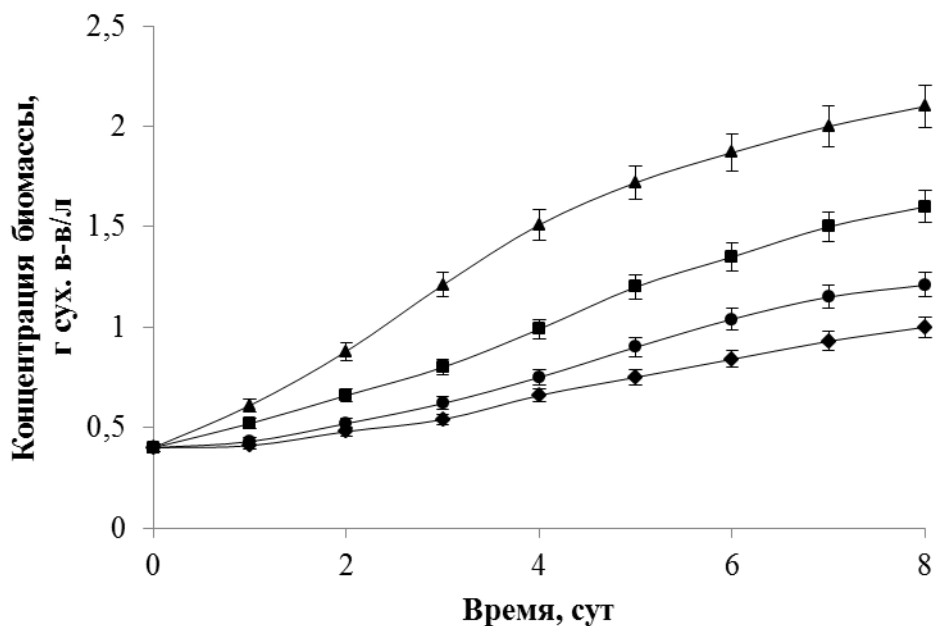


Рисунок 5 – Кинетика накопления биомассы клеток *C. vulgaris* в сточных водах №1 (◆), №2 (▲), №3 (●) и №4 (■) (см. п. 2.2.1) при исходной концентрации биомассы клеток *C. vulgaris* 0,40 г сух. в-в/л

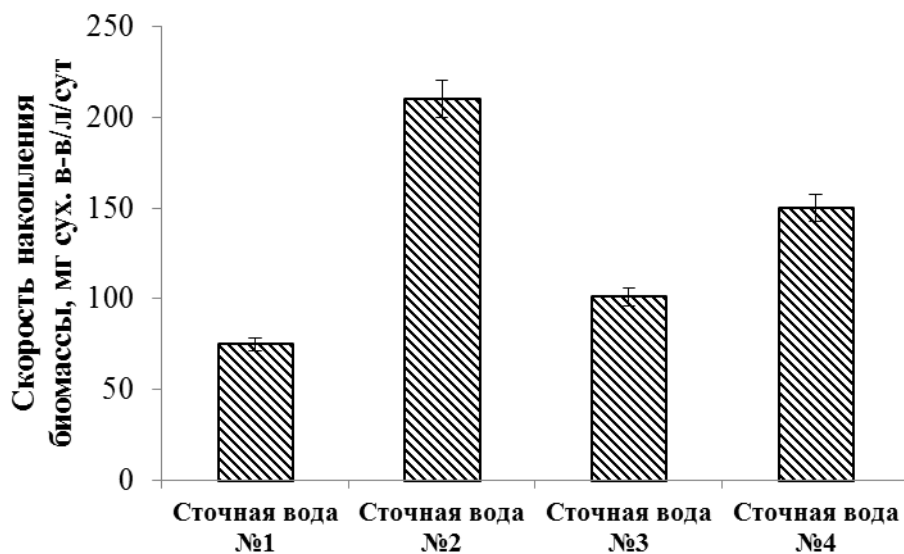


Рисунок 6 – Средняя скорость накопления за 8 сут биомассы клеток *C. vulgaris*, мг сух. в-в/л/сут, в сточных водах №1 - №4 (см. п. 2.2.1) при исходной концентрации клеток *C. vulgaris* 0,4 г сух. в-в/л

Был проведен анализ состава основных биоорганических компонентов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, выращенных на «классической» среде Тамия и в указанных выше сточных водах (Таблица 10).

Таблица 10 – Состав основных биоорганических компонентов биомассы клеток *C. vulgaris*, накопленной на среде Тамийя и в различных сточных водах (см. п.2.2.1)

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

Как известно, биохимический состав клеток фототрофных микроорганизмов зависит от условий их культивирования [85, 185]. Согласно полученным данным, максимальная доля белков в биомассе клеток накапливалась при использовании сточной воды №4, а наибольшая доля липидов – в сточной воде №3. При этом 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÷55 % сухого веса), что делает ее весьма привлекательным субстратом для дальнейшей биокаталитической трансформации микроорганизмами в различные коммерчески значимые продукты, а указанные виды сточных вод – пригодной средой для накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, богатой углеводами.

Таким образом, показано, что с использованием различных типов сточных вод возможно наращивание биомассы микроводорослей отобранного штамма *C. vulgaris*, при этом скорость накопления биомассы зависит от состава сточных вод и концентрации клеток в системе, активный рост клеток начинается при концентрации биомассы 0,2-0,4 г сух. в-в/л.

Результаты анализа изменения величин ХПК в процессе роста биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в сточных водах (Рисунок 7) свидетельствовали о том, что за 8 суток культивирования в зависимости от среды происходило снижение ХПК растворов в 2-8 раз со средней скоростью снижения 51-179 мг/л/сут. Наилучшие результаты были получены на сточной воде №2.

Одним из вариантов оптимизации исследуемого процесса, с точки зрения максимизации наиболее значимых показателей (скорости накопления биомассы, и, как следствие, скорости снижения ХПК) может быть предложено использование в качестве инокулята иммобилизованной биомассы в исходно высокой концентрации.

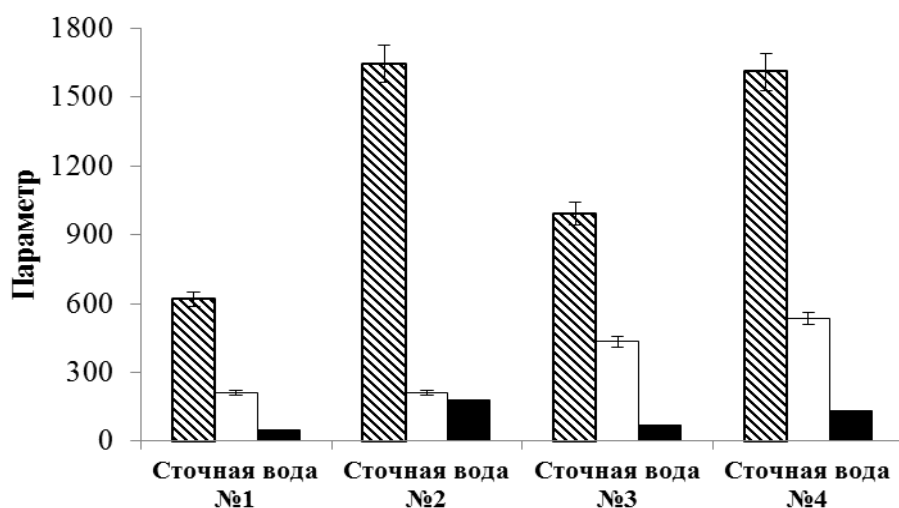


Рисунок 7 – Изменение ХПК растворов в процессе накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* в сточных водах при исходной концентрации клеток во всех средах 0,4 г сух.в-в/л (заштрихованные столбцы - начальное значение ХПК (мг/л), белые столбцы - конечное значение ХПК (мг/л)) и средняя скорость снижения ХПК (мг/л/сут) в этих же средах (черные столбцы). Период культивирования – 8 суток

В связи с этим далее исследовалась возможность иммобилизации клеток и использования их в иммобилизованном виде для создания исходно высокой концентрации клеток *C. vulgaris* в реакторе. Этому посвящен следующий раздел данной работы.

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

Одним из преимуществ использования иммобилизованных клеток различных микроорганизмов является возможность значительного увеличения плотности культуры в реакторе при ее равномерном распределении по объему, что, в свою очередь, позволяет интенсифицировать основной процесс.

Согласно литературным данным (см. п. 1.1), свободные клетки рода *Chlorella* могут накапливаться в среде в результате культивирования иммобилизованного инокулята. При выборе метода иммобилизации и носителя большое внимание уделяется сохранению жизнеспособности иммобилизованной биомассы. Для иммобилизации микроводорослей наиболее часто применяют метод включения клеток в матрицу гелевых носителей, главным образом Са-альгинатного геля. В последнее время при иммобилизации микроорганизмов (бактерий, мицелиальных грибов, дрожжей) в качестве носителей часто используют синтетические гели, наиболее интересным из которых по ряду объективных причин считается криогель поливинилового спирта (ПВС) [181, 186,187].

Криогель ПВС представляет собой макропористый гетерофазный гель, формирование которого происходит в результате замораживания, выдерживания в замороженном состоянии и последующего оттаивания водного раствора полимера. Порообразователем при этом служат кристаллы замораживаемой воды [188]. Криогель ПВС эффективно выполняет роль криопротектора для клеток микроорганизмов, изменяя свойства растворов электролитов во время замораживания и при дальнейшем оттаивании [188], при этом сохраняется жизнеспособность иммобилизованных клеток на высоком уровне. Наряду с основными преимуществами биокатализаторов, получаемых в результате иммобилизации клеток микроорганизмов в криогель ПВС, выделяемыми в процессе их применения (стабильность, продуктивность), известна также возможность их достаточно длительного хранения в замороженном состоянии [71].

В связи с этим в данной работе была исследована возможность иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* в гелевую матрицу, при этом в качестве носителя был выбран именно криогель ПВС.

Предварительно был проведен сравнительный анализ двух подходов к иммобилизации в криогель ПВС клеток микроводорослей *C. vulgaris*: 1) иммобилизации клеток методом их абсорбции в образцы криогеля ПВС, заранее полученные в ходе процесса замораживания-оттаивания растворов ПВС и 2) иммобилизации клеток методом их включения в криогель ПВС при предварительном смешивании раствора полимера и биомассы клеток с последующим формированием гранул криогеля ПВС с иммобилизованными клетками. В результате было установлено, что использование в качестве инокулята гранул с включенными клетками микроводорослей позволяет накапливать в 1,7 раза больше биомассы свободных клеток за одно и то же время по сравнению с использованием в качестве инокулята гранул с абсорбированными клетками. В связи с этим именно метод включения в криогель ПВС использовался в дальнейших экспериментах по иммобилизации клеток *C. vulgaris*.

Из литературных данных известно, что на конечные характеристики иммобилизованных клеток в значительной степени влияет концентрация раствора ПВС, используемого для их иммобилизации [189], поскольку она определяет степень пористости и размер пор в матрице носителя. Экспериментальный подбор строго определенной концентрации раствора полимера для приготовления на его основе суспензии клеток и формирования криогеля ПВС обеспечивает такую пористость матрицы, при которой происходит незатрудненный массообмен веществ, обеспечивающий клетки всем необходимым для их роста и выхода нарастающих клеток из крупных пор матрицы в среду при культивировании клеток после криоконсервации [189].

Было исследовано влияние концентрации раствора ПВС на характеристики получаемого образца иммобилизованных клеток микроводорослей *C. vulgaris*. В экспериментах с целью определения оптимальной концентрации раствора ПВС, используемого для иммобилизации клеток *Chlorella*, была проварьирована концентрация полимера в диапазоне 10÷20%. Для приготовления растворов полимера были использованы питательная среда Тамийя, специфичная для выращивания клеток микроводорослей рода *Chlorella*, и стерильная водопроводная вода с добавлением в каждом случае криопротектора в оптимальной для процессов иммобилизации в криогель ПВС концентрации - 3% глицерина [181] и без такового. Как известно, применение в качестве основы для получения растворов ПВС различных сред, а также введение добавок питательных веществ в состав образцов гранул с иммобилизованными клетками может существенно повлиять на сохранение их жизнеспособности в процессе иммобилизации [190]. 4%-ная концентрация клеток (по сухим веществам) в растворе полимера была использована в этих экспериментах, так как известно, что при хранении биомассы различных микроорганизмов, иммобилизованных в криогель ПВС, максимальную жизнеспособность клеток обеспечивает именно такая их концентрация в формирующихся гранулах [71]. Для формирования криогеля ПВС было решено замораживать и выдерживать образцы иммобилизованных клеток микроводорослей при -70°C . Из литературных данных известно, что снижение температуры ниже -80°C приводит к тому, что структурирование криогеля ПВС сопровождается получением в конечном итоге матрицы с порами меньшего размера [191], что затрудняет выход клеток из состояния криоконсервации, лимитирует массообменные процессы, делает практически невозможным выход клеток из матрицы носителя и их использование в качестве инокулята. В свою очередь, проведение процесса иммобилизации клеток при температуре выше -70°C приводит к уменьшению скорости замораживания [188] суспензии клеток и в результате к понижению уровня их выживаемости в процессе криохранения. В качестве основного параметра, отражающего энергетический статус клеток и суммарно характеризующего физиологическое состояние клеток в полученных образцах гранул, контролировалась концентрация внутриклеточного АТФ на всех этапах проведения процесса иммобилизации (Таблица 11).

Все полученные образцы иммобилизованных клеток культивировались в сточной воде №2, богатой сахарозой (концентрация иммобилизованных клеток *C. vulgaris* в среде была 0,4 г сух. в-в/л). В ходе культивирования наряду с концентрацией внутриклеточного АТФ в иммобилизованных клетках *C. vulgaris* этот же параметр определялся и в культуральной жидкости (Таблица 11), чтобы оценить способность клеток к пролиферации после их иммобилизации в криогель ПВС (криоконсервирования).

Таблица 11 – Изменение концентрации внутриклеточного АТФ ($\times 10^{-7}$ моль/г сух. в-в) в препарате иммобилизованных в криогель ПВС клеток *C. vulgaris* в ходе их иммобилизации, хранения и культивирования в сточной воде № 2 (концентрация иммобилизованных клеток *C. vulgaris* в среде 0,4 г сух. в-в/л), а также в культуральной жидкости ($\times 10^{-10}$ моль/мл) в зависимости от концентрации ПВС в исходном растворе

Концентрация раствора ПВС, %	20		15	10		
Среда для приготовления раствора ПВС	Стерильная водопроводная вода				Среда Тамийя	
Добавки	3% глицерина	Без добавок			3% глицерина	
АТФ клеток до смешения с раствором ПВС	29,31 ± 1,17					
АТФ в суспензии клеток в растворе ПВС	2,45 ± 0,09	2,55 ± 0,10	2,82 ± 0,12	3,99 ± 0,16	9,73 ± 0,41	9,96 ± 0,35
Время хранения при -70 ⁰ С, сут	АТФ в иммобилизованном препарате в результате криохранения					
2	0,81 ± 0,03	0,45 ± 0,01	0,94 ± 0,04	2,42 ± 0,10	9,02 ± 0,36	9,42 ± 0,35
24	0,86 ± 0,03	0,55 ± 0,02	0,82 ± 0,03	1,00 ± 0,03	9,11 ± 0,34	9,43 ± 0,34
53	0,91 ± 0,04	0,54 ± 0,02	0,71 ± 0,03	0,60 ± 0,02	9,12 ± 0,33	9,35 ± 0,29
550	0,15 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,43 ± 0,02	8,99 ± 0,40	9,12 ± 0,31
Время культивирования в сточной воде №2, сут	АТФ в иммобилизованном препарате					
4	0,91 ± 0,03	0,66 ± 0,03	1,08 ± 0,04	2,18 ± 0,08	9,91 ± 0,41	10,18 ± 0,41
8	0,75 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,67 ± 0,03	1,58 ± 0,06	9,56 ± 0,40	9,99 ± 0,35
	АТФ в культуральной жидкости					
4	0,52 ± 0,02	0,81 ± 0,03	0,91 ± 0,04	2,33 ± 0,14	7,98 ± 0,21	8,12 ± 0,19
8	1,02 ± 0,04	0,92 ± 0,04	1,82 ± 0,07	6,12 ± 0,22	14,91 ± 0,39	15,01 ± 0,41

На основании анализа данных Таблицы 11 был сделан ряд следующих выводов:

- использование для приготовления раствора ПВС стерильной водопроводной воды является нежелательным, так как уже на стадии смешивания биомассы клеток *C. vulgaris* с таким раствором полимера наблюдается сильное снижение концентрации внутриклеточного АТФ;

- введение в состав иммобилизованного препарата глицерина не играет определяющей роли в сохранении жизнеспособности клеток;

- наилучшей концентрацией раствора полимера, используемого для приготовления образцов иммобилизованных клеток *C. vulgaris*, подлежащих криоконсервированию, с точки зрения уровня их выживания и одновременно способности служить инокулятом для получения свободной биомассы клеток микроводорослей при дальнейшем переносе их в питательную среду, является концентрация 10%;

- иммобилизация в криогель ПВС позволяет длительно хранить клетки микроводорослей *C. vulgaris* в замороженном виде (не менее 550 сут), обеспечивая при этом сохранение у них достаточно высокого энергетического уровня (концентрация АТФ).

Однако использование для иммобилизации клеток *C. vulgaris* раствора ПВС с концентрацией 10% и выше, очевидно, приводит к формированию прочной матрицы с размером пор, не позволяющим клеткам после размораживания и переноса в питательные среды выступать в качестве хорошего инокулята, так как новые генерации клеток не могут свободно покинуть матрицу через сформированные поры.

С учетом вышесказанного было решено проварьировать концентрации раствора ПВС, используемого для иммобилизации клеток микроводорослей, в более узком интервале 5÷8%.

Полученные образцы иммобилизованных клеток также культивировались в сточной воде №2 (исходная концентрация иммобилизованных клеток *C. vulgaris* в среде - 0,4 г сух. в-в/л). В ходе процесса контролировалась концентрация внутриклеточного АТФ для иммобилизованных и накапливающихся в культуральной жидкости свободных клеток *C. vulgaris*, также определялась концентрация биомассы свободных клеток, рассчитывалась скорость накопления биомассы *C. vulgaris* (Таблица 12, Рисунки 8, 9).

Из полученных данных следует, что оптимальной концентрацией носителя для приготовления образцов иммобилизованных клеток *C. vulgaris*, подлежащих криоконсервированию, как с точки зрения их выживаемости, так и способности служить хорошим инокулятом для получения биомассы свободных клеток микроводорослей при дальнейшем переносе их в питательные среды является концентрация 7%. Большая концентрация полимера, вероятно, приводила к формированию матрицы с меньшим размером пор, что усложняло выход клеток из носителя в среду.

Таблица 12 – Изменение концентрации внутриклеточного АТФ ($\times 10^{-7}$ моль/г сух. в-в) в препарате иммобилизованных в криогель ПВС клеток *C. vulgaris* в ходе их иммобилизации, хранения и последующего культивирования в сточной воде № 2 (концентрация иммобилизованных клеток *C. vulgaris* в среде 0,4 г сух. в-в/л), а также АТФ в культуральной жидкости ($\times 10^{-10}$ моль/мл) в зависимости от концентрации ПВС в исходном растворе

Концентрация раствора ПВС, %	5	6	7	8
АТФ в суспензии клеток в растворе ПВС	15,1 ± 0,6	13,9 ± 0,6	12,9 ± 0,6	11,9 ± 0,7
АТФ в иммобилизованном препарате через 3 сут хранения при -70 °С	11,8 ± 0,3	10,2 ± 0,3	11,9 ± 0,5	11,0 ± 0,5
АТФ в иммобилизованном препарате через 3 сут культивирования	11,1 ± 0,3	11,2 ± 0,4	12,5 ± 0,6	11,4 ± 0,6
АТФ в культуральной жидкости через 3 сут культивирования	7,9 ± 0,2	13,2 ± 0,3	19,0 ± 0,5	11,7 ± 0,2

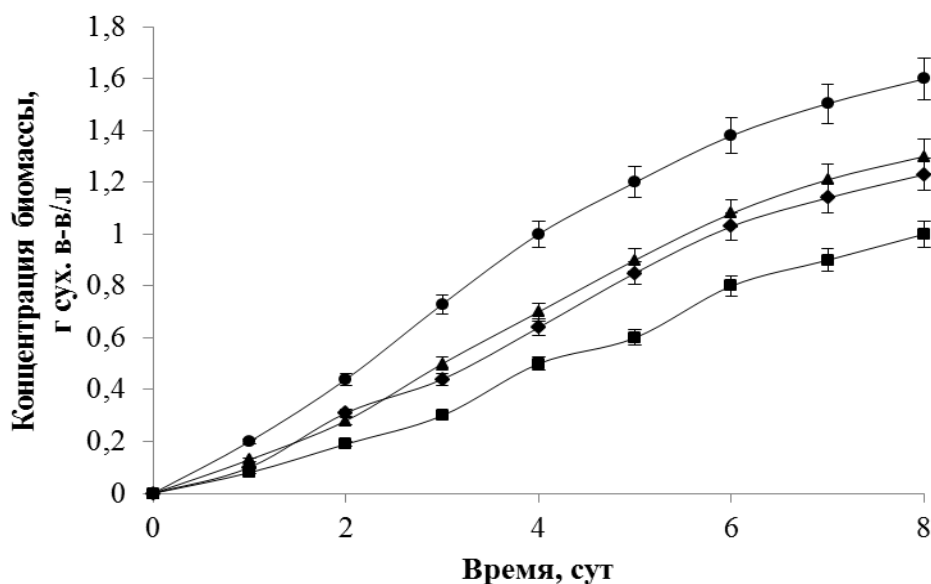


Рисунок 8 – Кинетика накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* в сточной воде №2 (см. п. 2.2.1) при концентрациях ПВС в растворе, используемом для получения иммобилизованного препарата на основе клеток *C. vulgaris*, 5 (■), 6 (▲), 7 (●), 8 (◆) % (концентрация иммобилизованных клеток *C. vulgaris* в среде 0,4 г сух. в-в/л)

Снижение концентрации полимера ниже 7% способствовало формированию матрицы, предположительно, с более крупными порами, через которые клетки легко могли выходить из носителя в среду и выполнять роль инокулята, но при этом снижалась степень выживаемости клеток при замораживании/оттаивании и их криохранении, поскольку,

очевидно, уменьшалась криопротекторная эффективность самого ПВС в результате снижения его концентрации в микроокружении клеток в процессе иммобилизации.

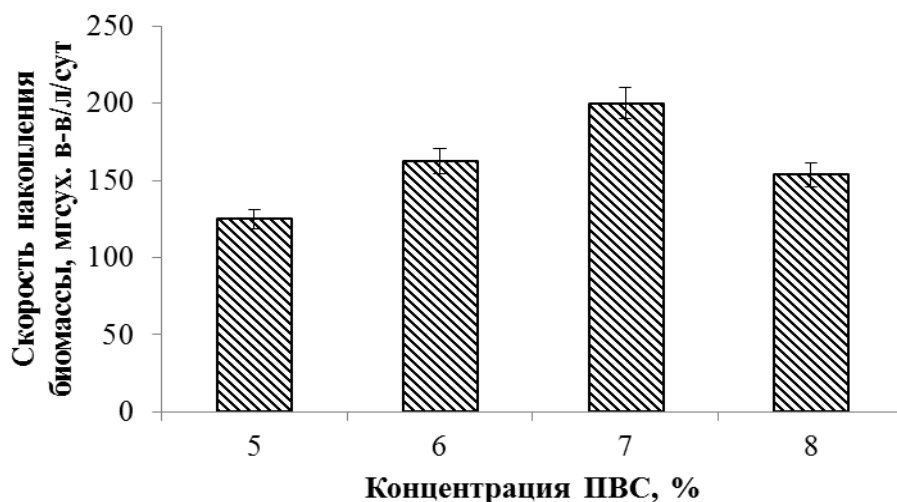


Рисунок 9 – Средняя скорость накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris*, мг сух. в-в/л/сут, в сточной воде №2 (см. п. 2.2.1) при концентрациях ПВС в растворе, используемом для получения иммобилизованного препарата на основе клеток *C. vulgaris*, 5, 6, 7, 8 % (концентрация иммобилизованных клеток *C. vulgaris* в среде 0,4 г сух. в-в/л)

Таким образом, было установлено, что при внесении в сточную воду №2 иммобилизованных клеток *C. vulgaris* в концентрации 0,4 г сух. в-в/л максимальная средняя скорость накопления их биомассы $Q_C=200\pm 9$ мг сух. в-в/л/сут соответствует образцу с исходной концентрацией раствора ПВС - 7%.

В связи с вышесказанным в дальнейших исследованиях для иммобилизации клеток *C. vulgaris* было решено использовать растворы ПВС с концентрацией 7 %.

При проведении сравнительного анализа значений средней за 8 суток скорости накопления биомассы при одинаковой ее начальной концентрации - 0,4 г сух. в-в/л и при использовании сточной воды №2 (Рисунки 6 и 9), было отмечено, что при использовании в качестве инокулята клеток в иммобилизованном виде (7% ПВС) значение параметра Q_C снижается не более, чем на $5,0\pm 0,2\%$ по сравнению с аналогичным процессом на основе свободных клеток. Это свидетельствует о высокой жизнеспособности иммобилизованных клеток, характеристикой которой в данном случае является именно показатель скорости накопления биомассы – Q_C .

С целью возможного повышения значений основных параметров исследуемого процесса было решено увеличить концентрацию иммобилизованных клеток, вносимых в среду для накопления биомассы клеток *C. vulgaris*, до $0,8\div 1,6$ г сух. в-в/л. В качестве питательных сред были использованы сточные воды №1-№4 (Таблица 13, Рисунки 10, 11).

Таблица 13 – Изменение концентрации внутриклеточного АТФ ($\times 10^{-7}$ моль/г сух. в-в) в препарате иммобилизованных в 7% криогель ПВС клеток *S. vulgaris* при использовании их в качестве инокулята в различных средах, а также АТФ в культуральной жидкости ($\times 10^{-10}$ моль/мл) в зависимости от исходной концентрации иммобилизованного инокулята. Составы сточных вод указаны в п.2.2.1.

Концентрация иммобилизованных клеток <i>S. vulgaris</i> , г сух. в-в/л	0,8	1,2	1,6
Сточная вода №1			
АТФ в иммобилизованном инокуляте при внесении в среду	$12,2 \pm 0,4$		
АТФ в иммобилизованном инокуляте через 3 сут культивирования	$12,4 \pm 0,5$	$12,5 \pm 0,5$	$12,4 \pm 0,6$
АТФ в культуральной жидкости через 3 сут культивирования	$10,5 \pm 0,6$	$15,2 \pm 0,8$	$16,3 \pm 0,9$
Сточная вода №2			
АТФ в иммобилизованном инокуляте при внесении в среду	$12,3 \pm 0,6$		
АТФ в иммобилизованном инокуляте через 3 сут культивирования	$12,6 \pm 0,5$	$12,8 \pm 0,5$	$12,9 \pm 0,7$
АТФ в культуральной жидкости через 3 сут культивирования	$31,6 \pm 1,3$	$42,7 \pm 1,8$	$44,3 \pm 2,2$
Сточная вода №3			
АТФ в иммобилизованном инокуляте при внесении в среду	$12,5 \pm 0,7$		
АТФ в иммобилизованном инокуляте через 3 сут культивирования	$12,0 \pm 0,4$	$12,3 \pm 0,7$	$12,1 \pm 0,6$
АТФ в культуральной жидкости через 3 сут культивирования	$15,0 \pm 0,5$	$20,6 \pm 0,9$	$22,1 \pm 1,1$
Сточная вода №4			
АТФ в иммобилизованном инокуляте при внесении в среду	$12,0 \pm 0,6$		
АТФ в иммобилизованном инокуляте через 3 сут культивирования	$12,3 \pm 0,7$	$12,1 \pm 0,6$	$11,9 \pm 0,6$
АТФ в культуральной жидкости через 3 сут культивирования	$22,1 \pm 0,8$	$30,0 \pm 1,3$	$31,9 \pm 1,4$

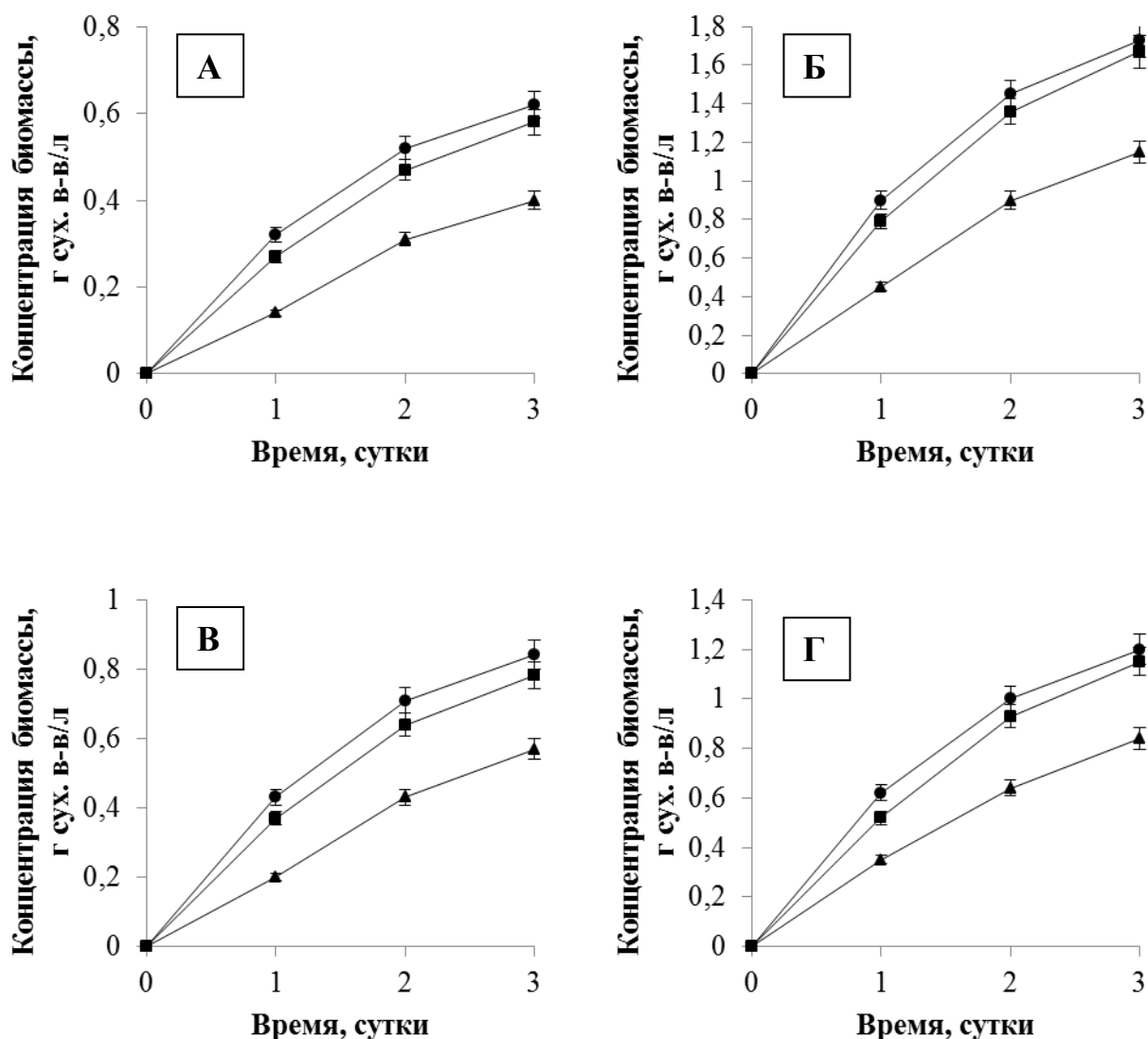


Рисунок 10 – Кинетика накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* в сточных водах №1 (А), №2 (Б), №3 (В) и №4 (Г) при варьировании исходной концентрации иммобилизованных клеток: 0,8 (▲), 1,2 (■) и 1,6 (●) г сух. в-в/л

Из полученных данных следует, что во всех средах при увеличении исходной концентрации иммобилизованных клеток до 1,2 г сух. в-в/л наблюдалось повышение средней (за 3 суток) скорости накопления биомассы. При этом введение в среду иммобилизованных клеток в концентрации выше 1,2 г сух. в-в/л не представлялось целесообразным, поскольку это практически не способствовало увеличению скорости накопления биомассы клеток *C. vulgaris*.

Таким образом, оптимальной исходной концентрацией иммобилизованных клеток можно считать значение – 1,2 г сух. в-в/л.

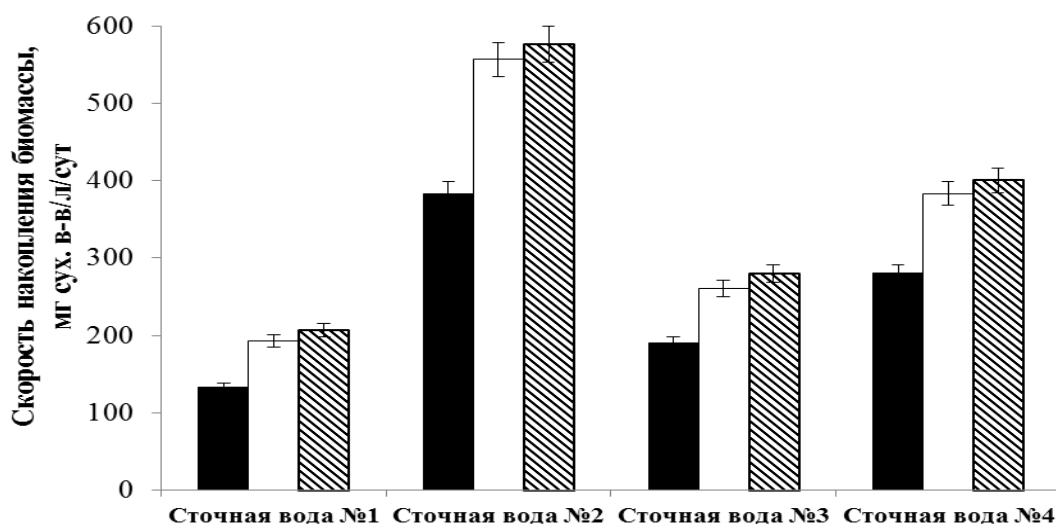


Рисунок 11 – Средняя скорость накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris*, мг сух. в-в/л/сут, в сточных водах при варьировании исходной концентрации иммобилизованных клеток: 0,8 (черные столбцы), 1,2 (белые столбцы) и 1,6 (заштрихованные столбцы) г сух. в-в/л

Результаты анализа изменения величин ХПК в процессе роста биомассы микроводорослей в сточных водах (Рисунок 12) свидетельствовали о том, что за 3 суток культивирования в зависимости от среды происходило снижение ХПК растворов в 2-8 раз со средней скоростью снижения 139-479 мг/л/сут. Наилучшие результаты были получены на сточной воде №2.

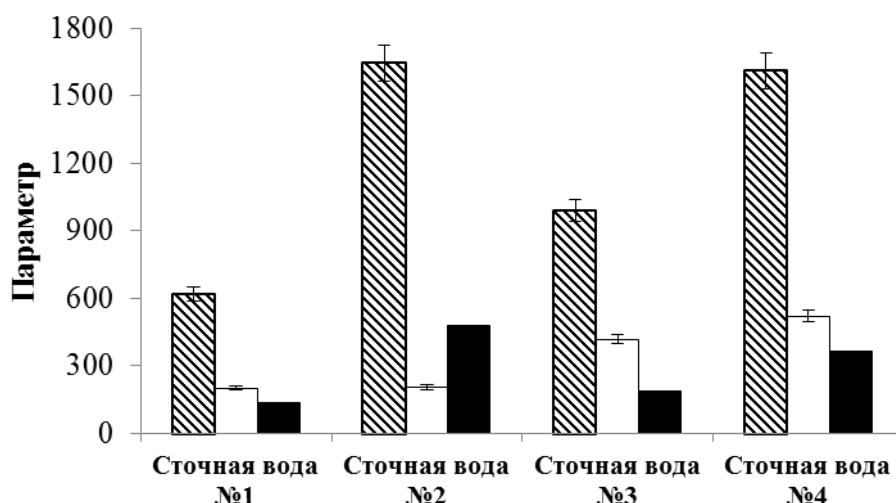


Рисунок 12 – Изменение ХПК растворов в процессе накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* в сточных водах при концентрации внесенных во все среды иммобилизованных клеток *C. vulgaris* 1,2 г сух. в-в/л (заштрихованные столбцы - начальное значение ХПК (мг/л), белые столбцы - конечное значение ХПК (мг/л) и средняя скорость снижения ХПК (мг/л/сут) в этих же средах (черные столбцы). Период культивирования – 3 суток

Далее была исследована возможность многократного использования разработанного иммобилизованного инокулята для накопления биомассы клеток *C. vulgaris* в сточных водах различного состава путем замены питательной среды на свежую (Рисунки 13, 14).

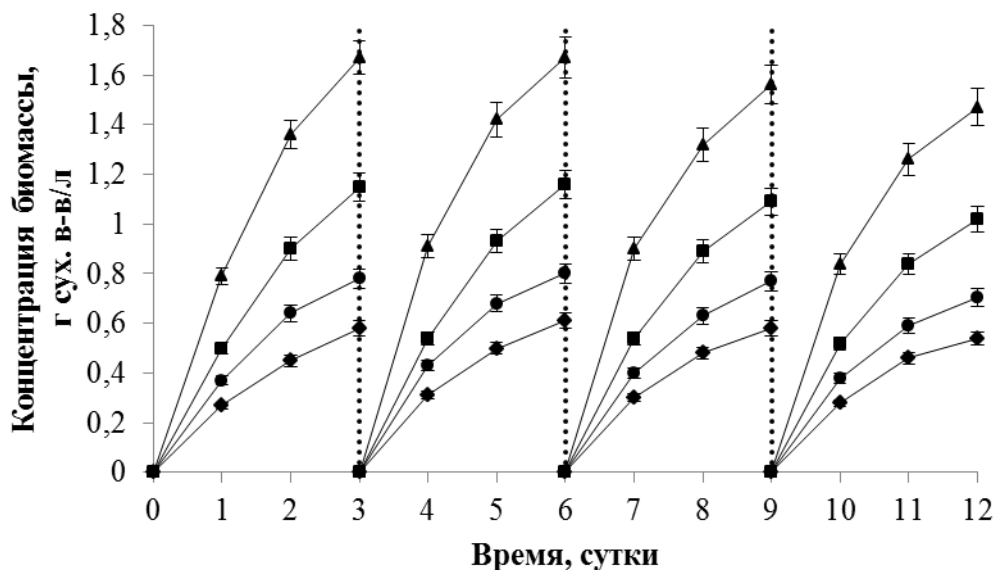


Рисунок 13 – Кинетика накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* в сточных водах №1 (♦), №2 (▲), №3 (●) и №4 (■) при концентрации внесенных во все среды иммобилизованных клеток *C. vulgaris* 1,2 г сух. в-в/л (пунктиром отмечено время замены среды в реакторе) в периодическом процессе

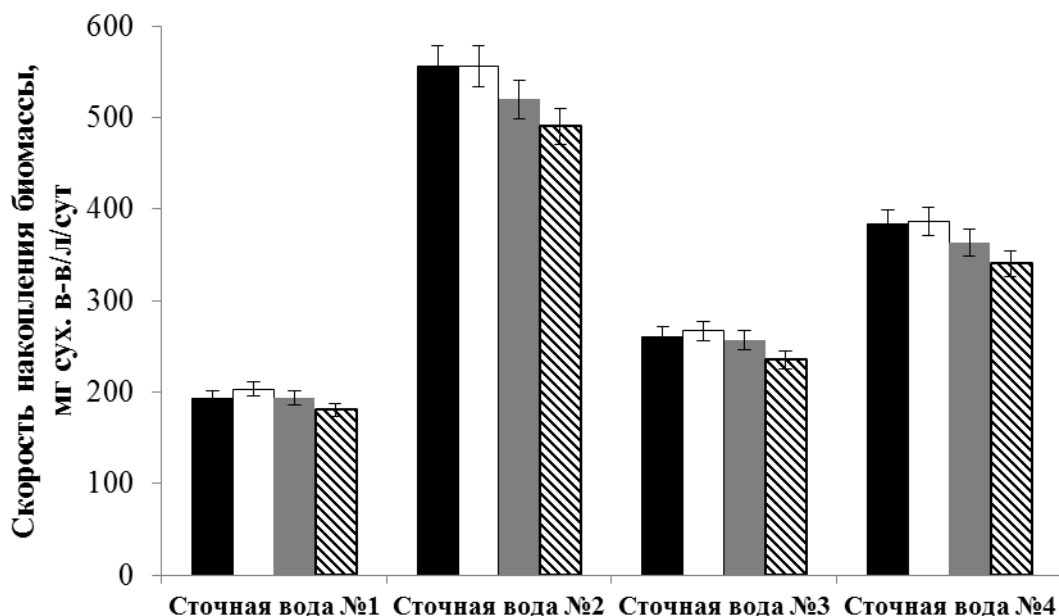


Рисунок 14 – Средняя скорость накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris*, мг сух.в-в/л/сут, в сточных водах №1- №4 при концентрации внесенных во все среды иммобилизованных клеток *C. vulgaris* 1,2 г сух. в-в/л (черные столбцы – 1-ый, белые столбцы – 2-ой, серые столбцы – 3-ий, заштрихованные столбцы – 4-ый цикл культивирования)

Из представленных данных видно, что разработанный иммобилизованный препарат на основе включенных в криогель ПВС клеток *C. vulgaris* может успешно применяться в качестве «многоразового» инокулята для накопления биомассы *C. vulgaris* в различных средах, в частности в сточных водах. При этом показатели скорости роста клеток почти не изменяются при их использовании на протяжении 4-х рабочих циклов.

Биомасса свободных клеток *C. vulgaris*, полученная в результате культивирования иммобилизованных в криогель ПВС клеток *C. vulgaris* в различных сточных водах, была сконцентрирована центрифугированием и использована для сравнительного анализа её биохимического состава с составом клеток, которые выращивались в тех же средах при использовании инокулята в виде свободных клеток используемого штамма (Таблица 14).

Таблица 14 – Состав основных биоорганических компонентов биомассы клеток *C. vulgaris*, накапливающейся в результате культивирования иммобилизованных в криогель ПВС клеток *C. vulgaris* в сточных водах различного состава (см. п.2.2.1)

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

Сравнение данных Таблиц 10 и 14 показало, что содержание липидов, углеводов и белков было практически идентичным друг другу, подтвердив, таким образом, возможность использования иммобилизованного инокулята вместо инокулята в виде свободных клеток для накопления биомассы микроводорослей *C. vulgaris* без изменения ее биохимического состава, постоянство которого крайне важно для трансформации получаемой биомассы в различные конечные продукты в промышленных условиях при реализации отработанных технологических режимов.

Таким образом, был разработан оригинальный способ иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* включением их в криогель ПВС, который может эффективно использоваться для получения иммобилизованного инокулята, пригодного для эффективного многократного накопления биомассы свободных клеток *C. vulgaris* в различных средах, в частности, сточных водах.

Анализ полученных результатов позволил сформулировать следующие выводы:

- оптимизированы условия применения разработанного способа для иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* в криогель ПВС: исходная концентрация раствора ПВС

– 7%, концентрация биомассы – 4% по сухим веществам, среда для приготовления исходного раствора ПВС – среда Тамийя, температура формирования и хранения гранул -70°C.

- предложен и оптимизирован новый подход к наращиванию биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в процессе очистки сточных вод, при этом гранулы с иммобилизованными клетками могут быть эффективно многократно использованы в качестве инокулята, проанализированы кинетические параметры реализованного биотехнологического процесса.

За 1 цикл при оптимальной концентрации иммобилизованных клеток – 1,2 г сух. в-в/л, может быть получено в зависимости от среды культивирования до 0,6÷1,7 г сух. в-в/л биомассы микроводорослей, а ХПК - снижено в 2-8 раз, средняя скорость накопления биомассы (Q_C) – 203÷557 мг сух. в-в /л/сут. За 4 рабочих цикла показатели Q_C снижаются не более, чем на 12-13 %. Полученная при этом биомасса характеризуется постоянством доли углеводов в её составе, обеспечивающим возможность ее последующей трансформации в коммерчески значимые продукты.

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

При разработке комплексных подходов и оптимизации биотехнологических процессов, содержащих стадии накопления биомассы микроводорослей и ее последующую биотрансформацию, очевидно, следует ориентироваться на целевой продукт и, наоборот, целесообразность получения того или иного целевого продукта часто определяется характеристиками и биохимическим составом биомассы, предлагаемой в качестве исходного сырья.

При проведении исследований, связанных с наращиванием микроводорослей *C. vulgaris* в процессе очистки наиболее значимых, с практической точки зрения, вариантов сточных вод, было установлено, что полученная биомасса характеризуется относительным постоянством биохимического состава (Таблицы 10, 14), при этом 50-55% биомассы представлено углеводами. Таким образом, основным ориентиром при выборе целевых продуктов и методов предварительной обработки биомассы в данном случае является поиск оптимальных путей и исследование возможностей дальнейшей биотрансформации именно углеводной части биомассы микроводорослей. В настоящее время с целью расширения спектра конечных продуктов проводится ряд исследований, направленных на оптимизацию биотрансформации именно углеводных компонентов биомассы микроводорослей, однако закономерности протекания всех этих процессов до сих пор недостаточно изучены и интересны с научной точки зрения.

Известно, что после извлечения липидов – основного компонента производства биодизельного топлива, оставшуюся часть биомассы микроводорослей, содержащую углеводы и белки, возможно подвергнуть дальнейшей биотрансформации. При этом при проведении процессов биотрансформации углеводов предпочтительным является предварительная обработка сырья с целью получения максимального количества ВС, которые на последующих стадиях могут выступать в качестве исходных компонентов для получения широкого спектра химических соединений [11-16]. Таким образом, предварительная обработка исходного сырья является одной из ключевых стадий получения целевых продуктов, поскольку её эффективностью определяется концентрация образующихся в результате моносахаридов, пригодных для последующей конверсии различными микроорганизмами.

Целью данного этапа работы являлось проведение, сравнительный анализ эффективности разных способов и оптимизация предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной в сточных водах, с точки зрения получения максимальной концентрации ВС и глюкозы из углеводных компонентов биомассы.

Для проведения экспериментов в качестве питательной среды для накопления биомассы *C. vulgaris* использовалась сточная вода № 2, на которой по результатам ранее проведенных исследований была установлена возможность наращивания максимального количества биомассы (см. п. 3.1.1).

Из литературных данных известно, что биомасса микроводорослей *C. vulgaris* содержит в своем составе главным образом целлюлозу, крахмал, а также гемицеллюлозы, хитино- и пектиноподобные вещества [92]. Таким образом, при изучении возможностей проведения эффективной предобработки такого сырья, с точки зрения получения максимального количества ВС, решено было ориентироваться на химические реакции гидролиза его углеводных компонентов, а при выборе оптимального режима проведения обработки - принимать во внимание особенности известных биотехнологических процессов переработки целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, а также процессов переработки хитин-, пектин- и крахмалсодержащей биомассы.

Как известно из литературы, большинство способов предобработки возобновляемой биомассы зависит от прочности клеток, сводится к её дезинтеграции за счет внешних воздействий и осуществляется с использованием различных физических, химических и ферментативных методов, а также при их комбинировании [73-75]. При оптимизации процессов предобработки основными показателями их эффективности, с кинетической точки зрения, являются максимальная начальная скорость гидролиза углеводов до ВС (V_0), высокая

средняя продуктивность процесса по ВС и глюкозе ($Q_{ВС}$ и $Q_{ГЛ}$) и возможность получения высоких концентраций ВС и глюкозы ($C_{ВС}$ и $C_{ГЛ}$) с максимальными их выходами от общего количества углеводов ($Y_{ВС}$ и $Y_{ГЛ}$).

3.2.1 Неферментативные способы предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*

Одним из известных, экономически обоснованных и широкоиспользуемых способов предобработки целлюлозосодержащей биомассы является кислотный гидролиз. В связи с этим данный способ был выбран в качестве отправной точки при проведении исследований процессов предобработки биомассы микроводорослей *C.vulgaris*, накопленной на сточных водах, с точки зрения получения максимальной концентрации ВС и глюкозы из углеводных компонентов биомассы.

Согласно литературным данным, применение кислотного гидролиза при правильном подборе условий позволяет получить достаточно высокие выходы ВС (Таблица 4). Скорость и полнота протекания процесса зависят, главным образом, от химической природы кислоты, ее концентрации, температуры и длительности проведения реакции [74, 78]. Однако известно, что при действии кислот-катализаторов в условиях высоких температур одновременно с гидролизом полисахаридов происходит и превращение образующихся моносахаридов в различные продукты, к числу которых относятся такие токсичные соединения, как оксиметилфурфурол, фурфурол, муравьиная кислота и др. [74, 78]. В этой связи, основной принцип в подборе условий кислотного гидролиза полисахаридов заключается в подборе оптимальных условий, обуславливающих максимально возможную полноту протекания реакции образования и накопления моносахаридов при их минимальной дальнейшей конверсии в токсичные соединения.

Исходя из литературных данных, кислотный гидролиз проводился под действием растворов разбавленных минеральных кислот – H_2SO_4 или HCl , наиболее широко применяемых для гидролиза возобновляемого сырья [192, 193]. В исследовании варьировались: концентрация кислоты (0,4÷2,0 н), температура и давление ($108^{\circ}C$ – 0,5 ати, $121^{\circ}C$ – 1 ати) и продолжительность процесса обработки биомассы (25÷70 мин). Исходная концентрация биомассы во всех растворах была одинаковой и составляла 20 г сух. в-в/л. С учетом того, что суммарное содержание углеводов в биомассе составляло $55,5 \pm 2,5$ % от ее сухого веса, то, следовательно, концентрация углеводов в растворах была $11,1 \pm 0,5$ г/л. Эффективность кислотного гидролиза оценивалась по концентрации накапливающихся в ходе процесса ВС и глюкозы, рассчитывались также выходы данных веществ ($Y_{ВС}$ и $Y_{ГЛ}$) в % от исходного количества углеводов (Рисунки 15, 16).

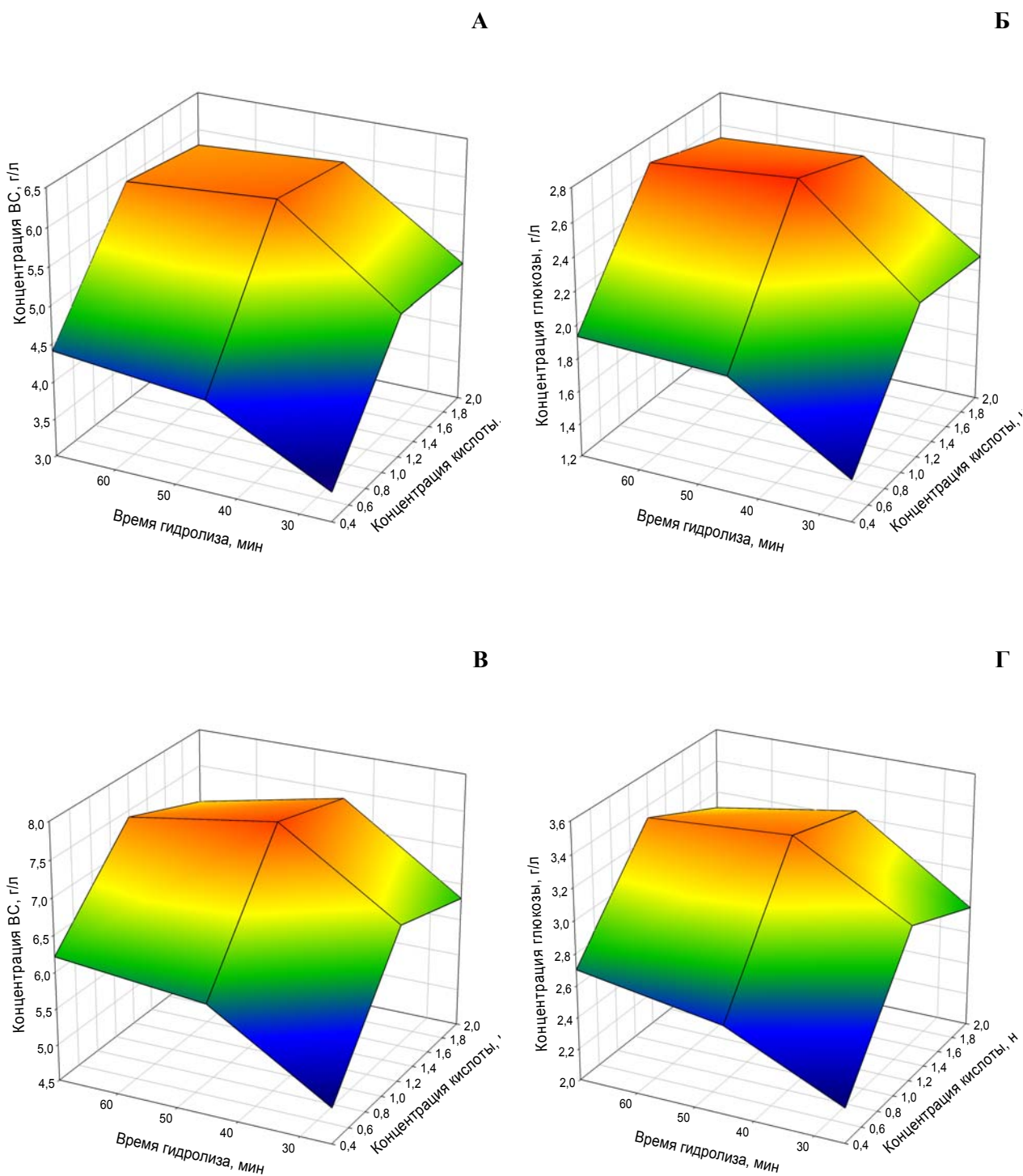


Рисунок 15 – Зависимость концентраций ВС (А, В) и глюкозы (Б, Г), накапливающихся в среде, от времени и концентрации кислоты при проведении кислотного гидролиза полисахаридов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с использованием 0,4÷2,0 н растворов H_2SO_4 в течение 25÷70 мин при следующих температурах проведения процесса: А, Б – 108⁰С (0,5 ати), В, Г – 121⁰С (1 ати)

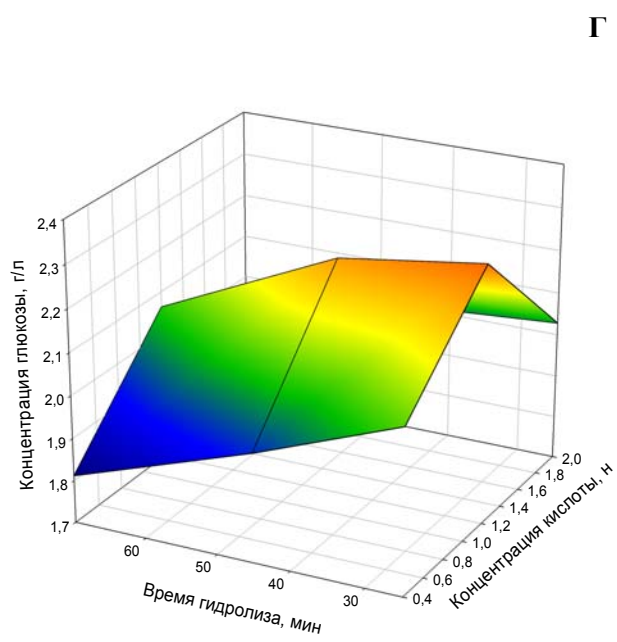
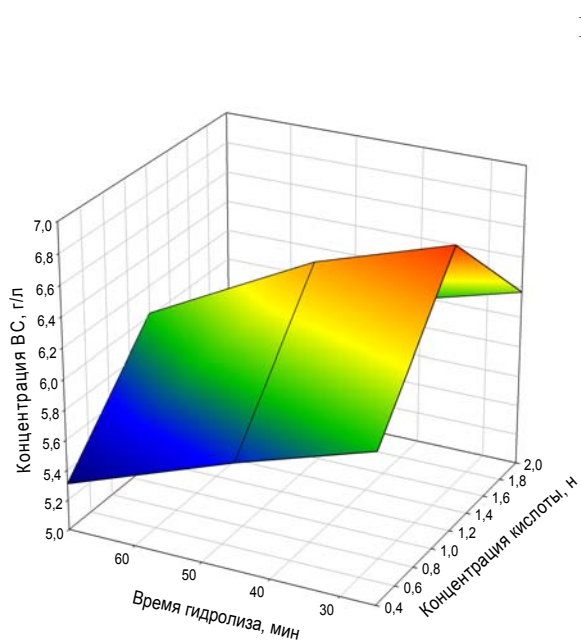
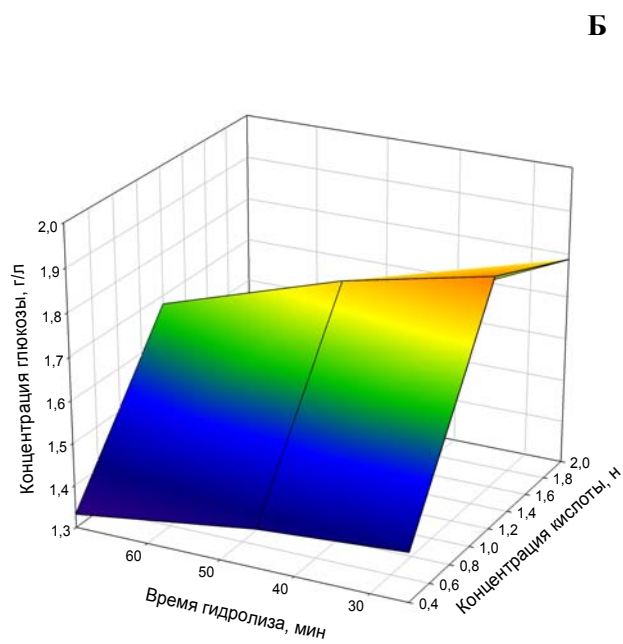
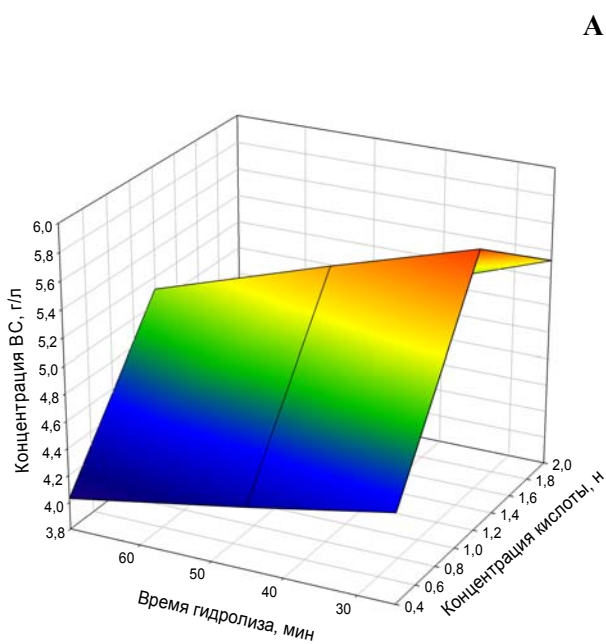


Рисунок 16 – Зависимость концентраций ВС (А, В) и глюкозы (Б, Г), накапливающихся в среде, от времени и концентрации кислоты при проведении кислотного гидролиза полисахаридов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с использованием 0,4÷2,0 н растворов HCl в течение 25÷70 мин при следующих температурах проведения процесса: А, Б – 108⁰С (0,5 ати), В, Г – 121⁰С (1 ати)

Анализ полученных данных (Рисунки 15, 16) позволил сделать следующие основные выводы:

- при увеличении концентрации кислот от 0,4 до 1,2 н наблюдалось повышение концентраций ВС и глюкозы, накапливающихся в среде, в зависимости от температуры и длительности проведения процессов в 1,3 ÷ 1,5 раза – при использовании растворов H₂SO₄ и в 1,1 ÷ 1,3 раза – при использовании растворов HCl. Дальнейшее повышение концентрации кислот не приводило к увеличению выходов ВС и глюкозы;

- повышение температуры от 108 до 121⁰С способствовало увеличению концентраций ВС и глюкозы в зависимости от концентрации кислоты и длительности проведения процессов в 1,2 ÷ 1,5 раза в случае применения растворов H₂SO₄ и в 1,1 ÷ 1,5 раза – при использовании растворов HCl;

- при использовании растворов H₂SO₄ увеличение длительности процессов от 25 до 45 мин приводило к повышению концентраций ВС и глюкозы в 1,1 ÷ 1,3 раз в зависимости от концентрации кислоты и температуры гидролиза, однако дальнейшее увеличение продолжительности процессов до 70 мин не способствовало повышению концентраций ВС и глюкозы, накапливающихся в среде. В случае использования растворов HCl максимальная концентрация сахаров накапливалась в течение первых 25 мин, и дальнейшее увеличение длительности процессов приводило к уменьшению выходов ВС и глюкозы.

Оптимальные условия кислотного гидролиза полисахаридов в составе биомассы микроводорослей *C. vulgaris* под действием растворов H₂SO₄ и HCl, основанные на данных Рисунков 15 и 16, представлены в Таблице 15.

Таблица 15 – Основные характеристики кислотного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в оптимальных условиях

Концентрация кислоты	Температура, °С	Время, мин	ВС		Глюкоза	
			С _{ВС} , г/л	Y _{ВС} , %	С _{ГЛ} , г/л	Y _{ГЛ} , %
1,2 н H ₂ SO ₄	121	45	7,71±0,27	69,46±2,39	3,38±0,08	30,45±0,71
1,2 н HCl		25	6,86±0,25	61,80±2,20	2,30±0,07	20,72±0,59

Сравнительный анализ результатов, полученных при кислотном гидролизе биомассы микроводорослей *C. vulgaris* под действием растворов неорганических кислот, показал, что хотя в случае применения HCl максимальные концентрации ВС и глюкозы при прочих равных условиях накапливались почти в 2 раза быстрее, по своей величине они оказались в 1,1 и 1,5 раза меньше, чем при использовании H₂SO₄. В связи с этим в последующих

экспериментах для кислотного гидролиза биомассы *C. vulgaris* использовалась именно H_2SO_4 .

Поскольку известно, что биомасса микроводорослей *C. vulgaris* в отличие от лигноцеллюлозосодержащего сырья состоит из мелких клеток, имеющих размер в 4÷6 мкм, то необходимость в проведении какой-либо предварительной обязательной дезинтеграции клеток перед кислотным гидролизом, с экономической точки зрения, исходно не представлялась целесообразной. Однако с целью возможного увеличения эффективности процесса кислотного гидролиза было решено исследовать влияние на выходы ВС и глюкозы предварительной механической деструкции клеток *C. vulgaris*, так как из литературы известно, что в ряде случаев такую обработку с использованием ступок с абразивом, шаровых мельниц проводят с целью повышения эффективности дезинтеграции биомассы [73, 77, 97]. Деструкцию клеток можно осуществлять и специальными методами инструментальной дезинтеграции (ультразвуковая или баллистическая дезинтеграция), однако, эти методы характеризуются большими энергетическими и экономическими затратами за счет высоких показателей энергозатрат и амортизации оборудования. Анализ имеющейся информации относительно строения клеток микроводорослей и оценка экономических затрат на проведение дезинтеграции клеток различными методами позволили сделать вывод о том, что наиболее целесообразной перед проведением кислотного гидролиза может быть дезинтеграция биомассы микроводорослей с использованием шаровой мельницы Mini-BeadBeater-24, которая и была проведена (размер стеклянных бус 0,5 мм, скорость вращения ротора 3000 об/мин, в ячейки объемом 0,5 мл загрузка биомассы составляла по 80 мг по сух. в-вам).

С целью установления оптимальной длительности процедуры механической дезинтеграции биомассы было проварьировано время работы шаровой мельницы. Степень дезинтеграции биомассы оценивалась микробиологическим методом с использованием счетной камеры Горяева и рассчитывалась как процентное отношение разницы значений количества целых клеток в образце определенного объема до и после дезинтеграции в течение определенного промежутка времени к исходному количеству клеток (Рисунок 17).

Согласно полученным данным (Рисунок 17) была выбрана оптимальная длительность дезинтеграции клеток – 4 мин, и за это время в результате механического воздействия на клетки клеточная стенка 98,5% биомассы подверглась успешной деструкции. Дезинтегрированная таким образом биомасса *C. vulgaris* далее подвергалась кислотному гидролизу (Рисунок 18).

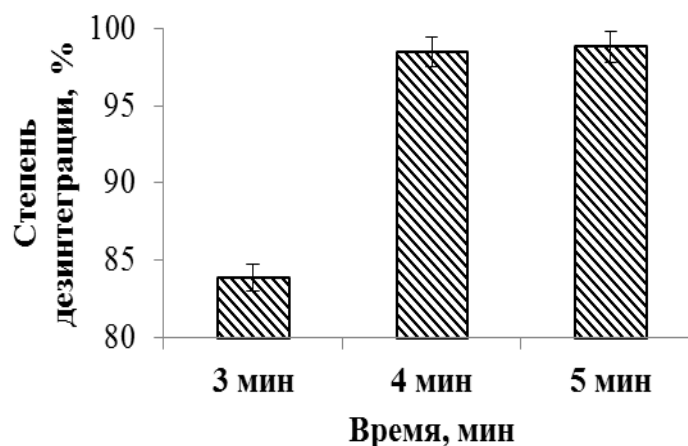


Рисунок 17 - Показатель степени дезинтеграции клеток микроводорослей *C. vulgaris* при варьировании длительности их обработки на шаровой мельнице

Из полученных результатов (Рисунок 18) следовало, что, максимальные концентрации ВС и глюкозы, так же как и при гидролизе необработанной на шаровой мельнице биомассы, были получены при 121⁰С при использовании 1,2н H₂SO₄ (~6%-ный раствор). При этом предварительная механическая деструкция клеток способствовала заметному увеличению продуктивности процесса кислотного гидролиза. Максимальные выходы ВС и глюкозы, равные 76,13±2,41% и 40,99±1,09% от общего содержания углеводов соответственно, достигались в течение 25 мин (длительность процесса гидролиза сократилась почти в 2 раза), при этом они оказались соответственно в 1,1 и 1,3 раза выше, чем при кислотном гидролизе биомассы *C. vulgaris*, необработанной на шаровой мельнице.

Сравнительный анализ полученных результатов кислотного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с предварительной деструкцией клеток биомассы на шаровой мельнице с известными из литературы данными (Таблица 4) в целом свидетельствует об эффективности предложенного подхода, полученные результаты сопоставимы с лучшими из известных в литературе, которые соответствуют показателям процесса кислотного гидролиза биомассы *C. vulgaris*, накопленной в специально подобранных условиях и, следовательно, отличающейся более высоким содержанием углеводов. Именно поэтому в ходе гидролиза в известных из литературы случаях обеспечиваются более высокие конечные концентрации ВС, однако при проведении гидролиза используются более высокие температуры (до 180⁰С), что эквивалентно повышению энергозатрат.

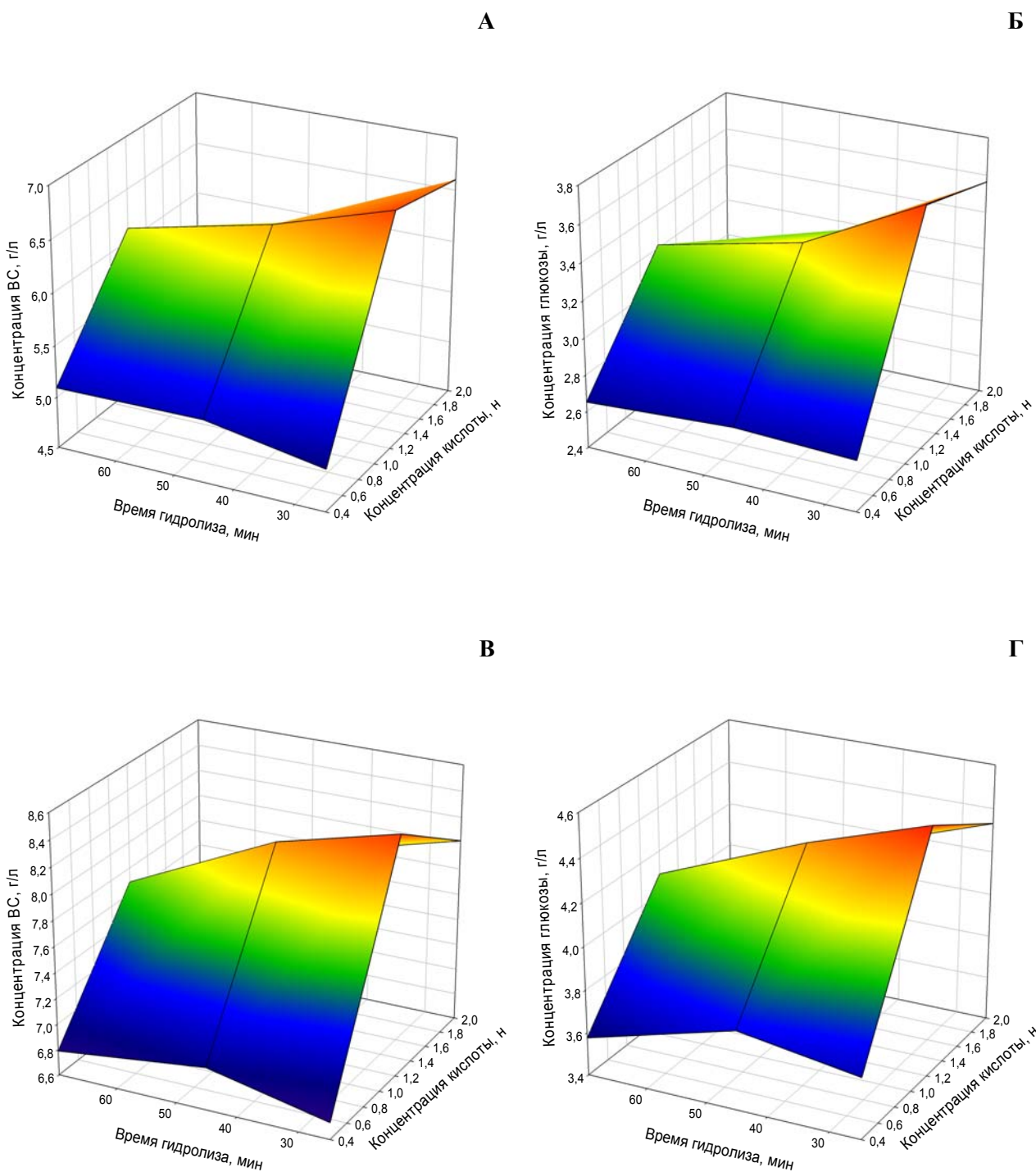


Рисунок 18 – Зависимость концентраций ВС (А, В) и глюкозы (Б, Г), накапливающихся в среде, от времени и концентрации H₂SO₄ при проведении кислотного гидролиза полисахаридов механически дезинтегрированной биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с использованием 0,4÷2,0 н растворов H₂SO₄ в течение 25÷70 мин при следующих температурах проведения процесса: А, Б – 108 °С (0,5 ати); В, Г – 121 °С (1 ати)

Помимо кислотного гидролиза для предобработки биомассы теоретически возможно использование и щелочного способа, который однако, согласно литературным данным, обеспечивает гораздо более низкие показатели эффективности процесса предобработки (Таблица 4) в сравнении с кислотным гидролизом, поэтому данный подход в работе не применялся.

Таким образом, после проведения исследований и сравнительного анализа неферментативных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (при исходной концентрации 20 г сух. в-в/л) можно утверждать, что лучшие результаты по основным параметрам ($C_{BC}=8,45\pm 0,27$ г/л, $C_{ГЛ}=4,55\pm 0,12$ г/л, $Y_{BC}=76,13\pm 2,41\%$, $Q_{BC}=20,12\pm 0,64$ г/л/ч, $Y_{ГЛ}=40,99\pm 1,09\%$, $Q_{ГЛ}=10,83\pm 0,29$ г/л/ч) могут быть получены при предварительной дезинтеграции биомассы на шаровой мельнице в течение 4 мин с последующим ее кислотным гидролизом 1,2н раствором H_2SO_4 в течение 25 минут при температуре $121^{\circ}C$.

Поскольку в ходе последующей биотехнологической трансформации предварительно гидролизованной биомассы микроводорослей предполагается использование клеток продуцентов различных конечных продуктов, то при оптимизации процессов предобработки биомассы помимо основных показателей процесса гидролиза на первый план выходят показатели уровня токсичности полученных образцов гидролизатов.

В связи с этим далее был проведен анализ концентраций веществ - возможных продуктов трансформации сахаров, обладающих токсичностью для клеток микроорганизмов (муравьиной кислоты, оксиметилфурола и фурфурола), в образцах, полученных после проведения кислотного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (исходная концентрация - 20 г сух. в-в/л). Результаты анализа представлены на Рисунке 19.



Рисунок 19 - Концентрации некоторых продуктов трансформации моносахаров, обладающих токсической активностью и накапливающихся в ходе проведения кислотного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris*

Данные, представленные на Рисунке 19, свидетельствуют о том, что после проведения кислотного гидролиза механически дезинтегрированной биомассы *C. vulgaris* в полученном растворе присутствуют соединения, которые могут потенциально оказывать негативное влияние на характеристики биокатализаторов, использование которых предполагается на стадиях трансформации ВС и глюкозы в различные продукты. Анализ полученных данных с известными из литературы результатами анализа компонентов кислотных гидролизатов микро- и макроводорослей [74, 78, 194] позволил утверждать, что процентное содержание данных токсичных соединений в кислотных гидролизатах в целом сопоставимо.

Ранее в лаборатории Экобиокатализа Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова был разработан биочувствительный элемент на основе иммобилизованных в криогель ПВС клеток фотобактерий *P. phosphoreum*. Были изучены характерные отклики тушения биолюминесценции этих иммобилизованных клеток на присутствие различных экотоксикантов (ионы тяжелых металлов, производные фенола, фосфорорганические пестициды) в проточных и стационарных условиях [181]. При экспонировании такого биочувствительного элемента в течение 30 мин в растворе, полученном после проведения в оптимальных условиях кислотного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, отмечено тушение сигнала биолюминесценции на 15%.

Таким образом, интересным, с научной и практической точек зрения, является поиск и исследование возможностей предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, с получением образцов с высокими концентрациями ВС, характеризующихся при этом меньшей токсичностью.

3.2.2 Ферментативная обработка биомассы микроводорослей *C. vulgaris*

Известно, что высокой специфичностью, минимальным количеством побочных продуктов и мягкими условиями проведения характеризуются процессы ферментативной предобработки различных типов биомассы. В настоящее время для этих целей используются различные карбогидразы (КФ 3.2.1), катализирующие гидролитическое расщепление О-гликозидной связи. Это связано с тем, что в отличие от химических и физических методов, их использование позволяет получать относительно высокие выходы сахаров при сравнительно мягких условиях проведения реакции (при атмосферном давлении и температуре не выше 70⁰С), при этом получаемые гидролизаты практически не содержат нежелательных побочных продуктов гидролиза [195]. Недостатками данного способа предобработки являются более высокие, по сравнению с кислотным гидролизом, экономические затраты из-за достаточно высокой стоимости чистых ферментных препаратов

и большие временные затраты на проведение самого процесса гидролиза. Эффективным способом преодоления этих недостатков считается применение комплексных ферментных препаратов, позволяющих значительно повысить эффективность гидролиза.

В этой связи в настоящее время исследователями проводится активный поиск способов предобработки биомассы микроводорослей, накопленной в разных средах, с использованием ферментов и их комплексов с целью получения высоких выходов ВС и минимизации экономических и временных затрат [75, 97]. Подбор ферментов для гидролиза полисахаридов в составе той или иной биомассы осуществляется с учетом химической природы присутствующих углеводов. Как отмечалось ранее (см. п. 1.3), углеводы микроводорослей *C. vulgaris* представлены главным образом крахмалом, целлюлозой и некоторыми другими полисахаридами, входящими в состав клеточной стенки [74, 86, 96]. В настоящее время в результате выполнения научных работ становятся известными все новые карбогидразы, многие из них характеризуются высокой каталитической активностью и достаточно низкой себестоимостью в расчете на единицу активности. Однако многие вопросы, связанные с ферментативными методами предобработки биомассы микроводорослей, остаются открытыми. Из литературы известно, что для эффективного практического использования ферментативного гидролиза целлюлозосодержащей биомассы обычно требуется применение различных способов повышения реакционной способности исходного сырья [195], однако не установлено какие именно способы и условия их применения наиболее эффективны для биомассы микроводорослей. Кроме того до сих пор нет точных данных относительно оптимального набора и соотношения ферментов, которые нужно использовать для получения максимальных выходов ВС при обработке биомассы микроводорослей. Так как известно, что биохимический состав биомассы может сильно варьироваться в зависимости от условий культивирования клеток, то считается, что для осуществления эффективной предобработки биомассы с использованием ферментов каждый раз необходимо подбирать определенные их комбинации и условия повышения реакционной способности биомассы с учетом имеющихся данных о ее составе.

В связи с вышесказанным далее было решено исследовать возможности проведения ферментативной предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточной воде №2 (см. п. 2.2.1), с целью осуществления наиболее полной деструкции клеточных полисахаридов и получения образцов гидролизатов с высокими концентрациями ВС, характеризующихся при этом минимальной токсичностью.

Так как повышение реакционной способности биомассы перед проведением ее ферментативного гидролиза в ряде случаев может способствовать увеличению конечного выхода ВС, то была исследована зависимость эффективности ферментативного гидролиза

полисахаридов клеток микроводорослей *C. vulgaris* от различных способов ее предобработки.

Было исследовано влияние условий проведения предварительного термолиза биомассы *C. vulgaris*, подвергающейся ферментативному гидролизу, на выходы ВС.

При проведении экспериментов биомасса *C. vulgaris* ресуспендировалась в Na-ацетатном буфере (рН 5,5), после чего проводился ее термолиз (нагрев и выдерживание). Первоначально были выбраны следующие условия термолиза: 30 мин при 108⁰С (0,5 ати). Исходная концентрация субстрата, как и в предыдущих экспериментах, была 20 г сух. в-в/л (содержание углеводов в приготовленных суспензиях составляло 11,1±0,5 г/л). В этих условиях уже происходила частичная деструкция полисахаридов клеток с накоплением в среде 0,99±0,02 г/л ВС (8,92±0,21 % от общего содержания углеводов). Наличия глюкозы в среде обнаружено не было.

Полученные среды, содержащие биомассу микроводорослей *C. vulgaris* после проведения ее предобработки термолизом, использовались далее для проведения ферментативного гидролиза.

На основании данных о том, что в состав углеводов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточной воде №2, входит целлюлозы – 23,5±0,9% (от сух. биомассы) и крахмала – 21,9±0,8% (от сух. биомассы), для проведения экспериментов были отобраны два коммерческих ферментных препарата: (Ц) – целлюлазный комплекс (продуцент - *Trichoderma viride*) и (А) – ферментный комплекс, содержащий α-амилазу (продуцент - *Aspergillus oryzae*).

Были составлены различные комбинации этих двух ферментов (Ц+А), и определены их оптимальные концентрации, необходимые для проведения ферментативного гидролиза биомассы *C. vulgaris*. Исходные условия проведения ферментативного гидролиза были следующие: рН 5,5, температура 37⁰С (Рисунок 20).

Анализ полученных данных показал, что при использовании смеси ферментов Ц и А, взятых в концентрации 8 мг/г сух. в-в биомассы и 2 мг/г сух. в-в биомассы соответственно, концентрация ВС, накапливающаяся за 20 ч, составляла 8,35±0,26 г/л. Дальнейшее увеличение концентраций Ц и А не приводило к существенному увеличению концентраций ВС. В связи с этим смесь ферментов [Ц (8 мг/г сух. в-в биомассы) + А (2 мг/г сух. в-в биомассы)] использовалась в дальнейших экспериментах для проведения ферментативного гидролиза полисахаридов биомассы клеток *C. vulgaris*.

Далее были определены оптимальные условия (температура, рН) проведения ферментативного гидролиза полисахаридов биомассы *C. vulgaris* с использованием подобранной комбинации (Ц+А) (Рисунок 21).

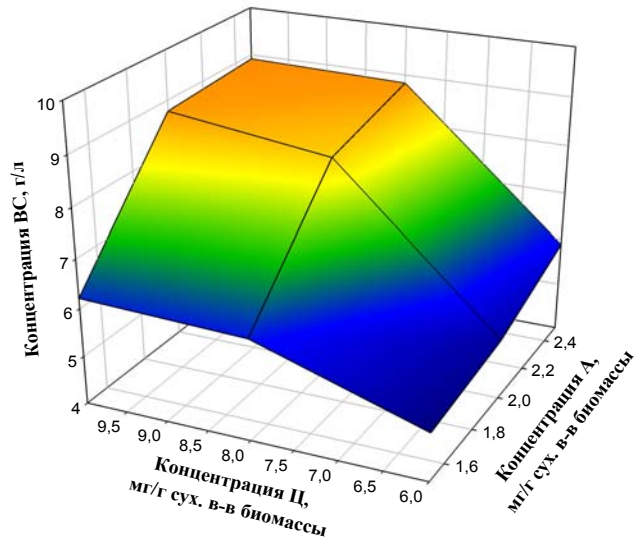


Рисунок 20 - Значения концентраций ВС, накапливающихся в среде, при проведении ферментативного гидролиза полисахаридов термически предобработанной при 108⁰С (0,5 ати) в течение 30 мин биомассы микроводорослей *C. vulgaris* при одновременном использовании ферментных препаратов Ц и А (температура 37 °С, рН 5,5, 20 ч) в разных концентрациях

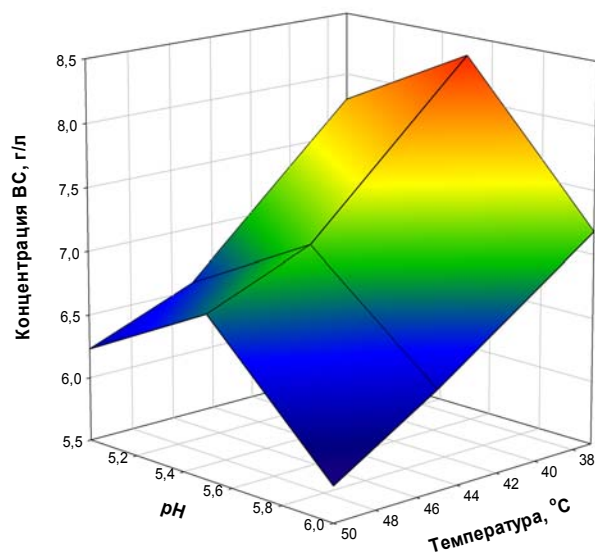


Рисунок 21- Значения концентраций ВС, накапливающихся в среде, при варьировании температуры и рН среды при проведении 20-часового ферментативного гидролиза полисахаридов термически предобработанной при 108⁰С (0,5 ати) в течение 30мин биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с использованием оптимизированной комбинации (Ц+А)

Как видно из полученных результатов, наилучшими условиями проведения процесса, с точки зрения накопления максимального количества ВС в гидролизатах, были: температура 37 °С и pH 5,5.

С целью изучения возможности повышения концентрации ВС, накапливающихся в процессе ферментативного гидролиза, к оптимизированной комбинации (Ц+А), по которой были получены наилучшие результаты в плане концентрации ВС, добавлялся в концентрации 2 мг/г сух. в-в биомассы один из следующих ферментных препаратов с: (К) – ксиланазной (продуцент *T. viride*), (М) - маннаназной (продуцент *Aspergillus niger*), (П) – пектиназной (продуцент *Aspergillus niger*) или (Х) - хитиназной (продуцент *T. viride*) активностью. На Рисунке 22 приведена кинетика накопления ВС в ходе ферментативного гидролиза термически обработанной биомассы микроводорослей *C. vulgaris* под действием различных смесей препаратов карбогидраз.

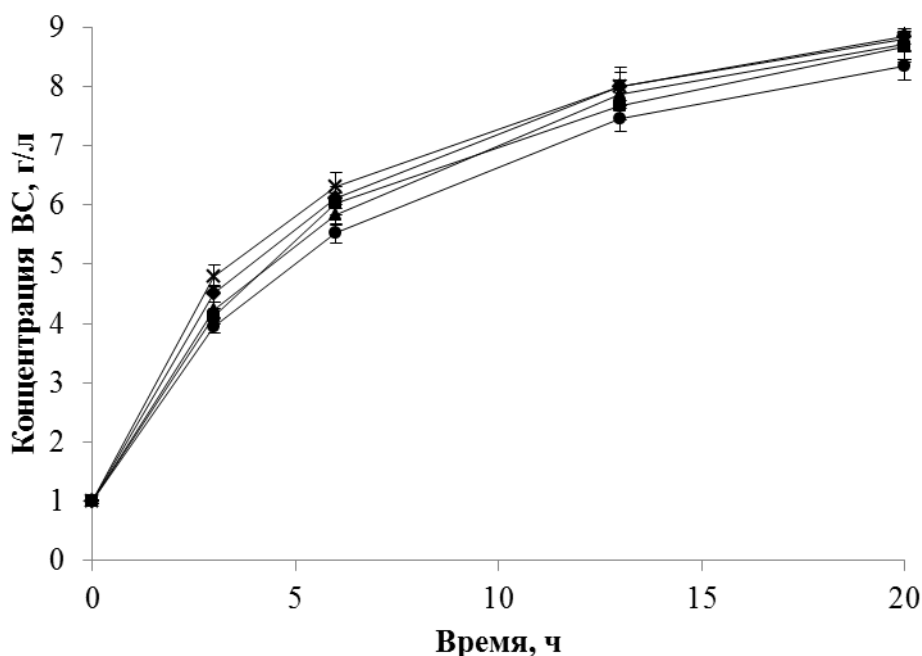


Рисунок 22 – Кинетика накопления ВС в ходе ферментативного гидролиза термически предобработанной при 108⁰С (0,5 ати) в течение 30 мин биомассы микроводорослей *C. vulgaris* под действием (●) Ц+А, (■) Ц+А+М, (▲) Ц+А+К, (◆) Ц+А+П, (×) Ц+А+Х

Из полученных результатов (Рисунок 22) следовало, что добавление к комплексу (Ц+А) других препаратов карбогидраз, применение которых было апробировано с учетом информации о структуре клеточной стенки *C. vulgaris* [92], не приводило к значительному улучшению характеристик процесса ферментативного гидролиза, связи с чем их внесение было сочтено экономически нецелесообразным.

Таким образом, ферментный комплекс, состоящий из Ц (8 мг/г сух. в-в биомассы) и А (2 мг/г сух. в-в биомассы) при проведении ферментативного гидролиза при температуре 37⁰С и рН 5,5 оказался лучшим с точки зрения достижения максимальных значений концентраций ВС и использовался в последующих экспериментах для проведения ферментативного гидролиза биомассы клеток *C. vulgaris*.

С целью исследования возможности дальнейшего повышения эффективности ферментативного гидролиза были проварьированы условия термолиза - температура и продолжительность процесса предобработки клеток перед ферментативным гидролизом (Рисунок 23).

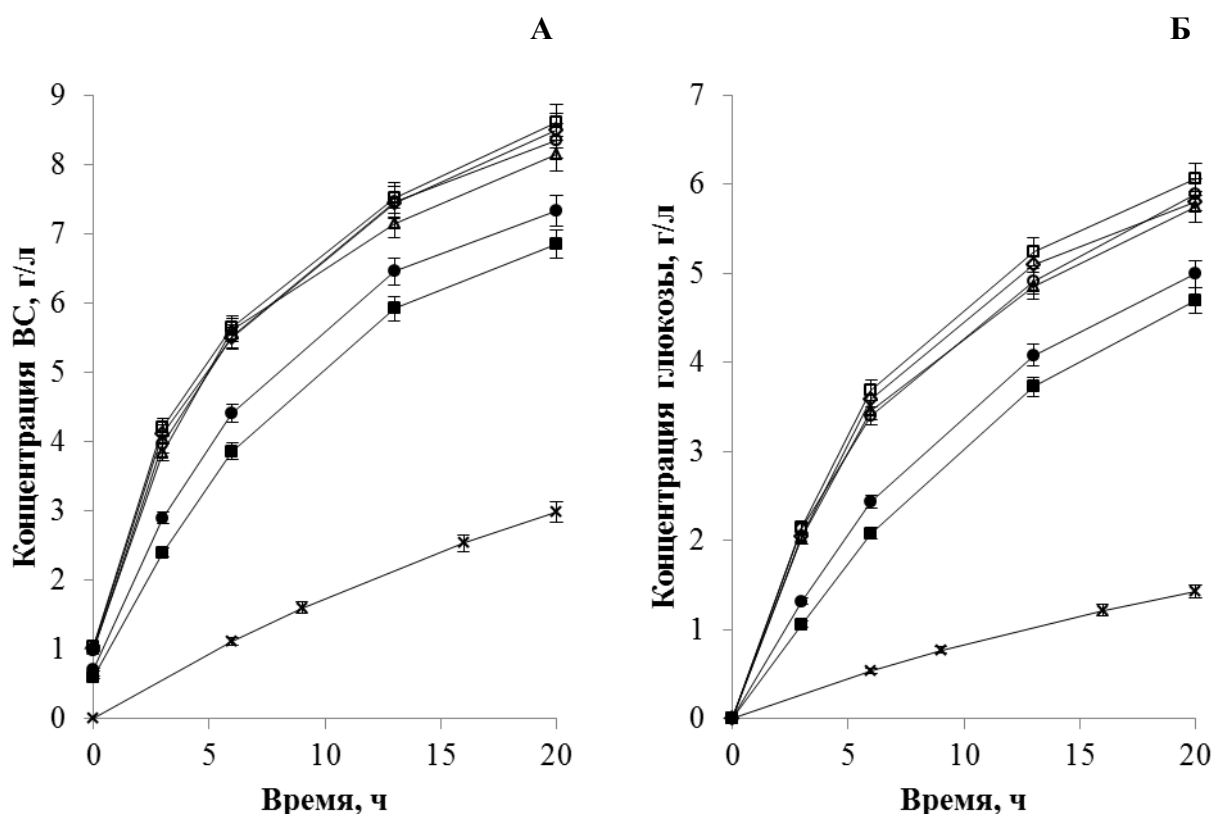


Рисунок 23 – Кинетика накопления ВС (А) и глюкозы (Б) в ходе ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, термически предобработанной при 108⁰С (0,5 ати) в течение (■) 15 мин, (○) 30 мин, (Δ) 60 мин, при 121⁰С (1 ати) в течение (●) 15 мин, (□) 30 мин, (◇) 60 мин и (×) без предварительной термической предобработки

Как оказалось, для эффективной предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris* достаточным является проведение термолиза при 108⁰С в течение 30 мин. Дальнейшее повышение температуры и длительности процесса практически не приводило к изменениям конечных характеристик процесса. В качестве контроля в этой серии экспериментов также были проведены опыты, в которых ферментативному гидролизу

подвергалась биомасса микроводорослей *C. vulgaris* без предварительного термолиза (Рисунок 23).

Ферментативный гидролиз нетермолизованной биомассы микроводорослей *C. vulgaris* характеризовался достаточно низкими значениями начальной скорости процесса ($V_0=0,19\pm 0,01$ г/л/ч) и конечных выходов ВС ($Y_{BC}=26,85\pm 0,82\%$ от общего содержания углеводов) и глюкозы ($Y_{GL}=12,88\pm 0,39\%$ от общего содержания углеводов). А при проведении предварительного термолиза биомассы при 108°C в течение 30 мин начальная скорость ферментативного гидролиза была в 5,2 раза выше и составляла $V_0=0,99\pm 0,03$ г/л/ч. При этом уже к 20 ч проведения процесса, конечный выход ВС был выше в 2,8 раза ($Y_{BC}=75,23\pm 2,33\%$), выход глюкозы выше - в 4,1 раза ($Y_{GL}=52,97\pm 1,42\%$), при этом продуктивности процесса по ВС и глюкозе составляли: $Q_{BC}=0,37\pm 0,01$ г/л/ч и $Q_{GL}=0,29\pm 0,01$ г/л/ч, а показатели максимальных концентраций принимали следующие значения: $C_{BC}=8,35\pm 0,26$ г/л, $C_{GL}=5,88\pm 0,16$ г/л.

Таким образом, предобработка биомассы клеток микроводорослей *C. vulgaris* термолизом способствовала значительному повышению эффективности последующего ферментативного гидролиза, что, безусловно, связано с тем, что в указанных условиях происходит частичное разрушение клеточной структуры, в результате чего увеличивается доступность и площадь поверхности контакта гидролизуемых полисахаридов с ферментами.

Одним из новых и до настоящего времени исследуемым является подход, предполагающий использование ионных жидкостей (ИЖ) для предобработки целлюлозосодержащей биомассы перед ее ферментативным гидролизом [79, 80]. ИЖ являются достаточно эффективными растворителями для природных полимеров [81, 82]. На их основе могут быть получены растворы целлюлозы и крахмала в достаточно высоких концентрациях. Известно, что растворение полисахаридов в ИЖ приводит к изменению их надмолекулярной структуры и повышению эффективности их последующего гидролиза. Известно положительное влияние предварительной обработки биомассы микроводорослей ИЖ на конечные результаты последующего кислотного гидролиза [74]. Интересным, с научной точки зрения, является исследование влияния предварительной обработки биомассы микроводорослей ИЖ на конечные результаты последующего ферментативного гидролиза. В связи с этим было решено исследовать влияние предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в присутствии ИЖ на эффективность последующего ферментативного гидролиза ее полисахаридов и сравнить полученные результаты с известными из литературы и ранее полученными в ходе выполнения данной работы.

При постановке экспериментов с ИЖ важно было учесть, чтобы выбранная ИЖ, помимо увеличения реакционной способности биомассы обеспечивала бы минимальный

ингибирующий эффект в своих остаточных концентрациях в обрабатываемой биомассе на ферменты и обладала бы минимальной токсичностью для клеток-продуцентов. С учетом этого в данной работе предобработка биомассы микроводорослей *C. vulgaris* осуществлялась с использованием 1-бутил-3-метилимидазолия хлорида ([Bmim]Cl) [196]. Массовая доля биомассы микроводорослей в смеси с ИЖ по сухим веществам составляла 4%. Это соотношение было выбрано на основании анализа литературных данных, известных для растительного целлюлозосодержащего сырья [197]. В качестве варьируемых параметров при проведении экспериментов были выбраны: длительность (30, 60 мин) и температура экспонирования биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в смеси с ИЖ (100 °С, 120 °С). Далее сырье “отмывалось” от ИЖ следующим образом: рабочая смесь ресуспендировалась в дистиллированной воде, подвергалась центрифугированию, после чего с осадком проводилась повторная операция до тех пор, пока концентрация ИЖ в промывных водах составила не более 0,2 г/л, только после этого осадок подвергался ферментативному гидролизу ($C_{\text{БМ0}} = 20$ г сух. в-в/л, содержание углеводов в растворах $C_{\text{УГЛ}} = 11,1 \pm 0,5$ г/л) (Рисунок 24).

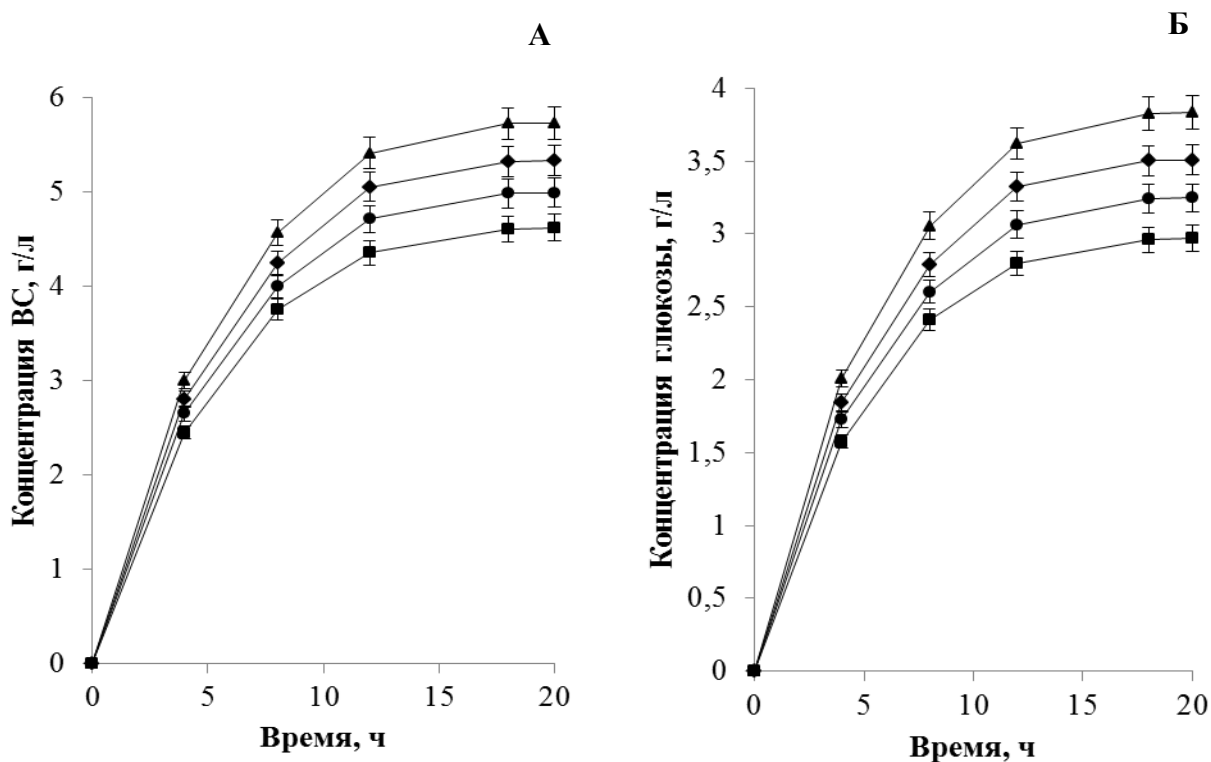


Рисунок 24 – Кинетика накопления ВС (А) и глюкозы (Б) в ходе ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, предобработанной ИЖ [Bmim]Cl при 100 °С в течение (■) 30 мин, (●) 60 мин и при 120 °С в течение (◆) 30 мин, (▲) 60 мин

Установлено, что по сравнению с ферментативным гидролизом непродобработанной ничем биомассы (Рисунок 23) при всех вариантах предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris* ИЖ [Bmim]Cl наблюдалось увеличение начальной скорости ферментативного гидролиза (в 3,2÷3,9 раза в зависимости от условий предобработки). При этом наибольшие выходы ВС и глюкозы были получены в результате ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, предобработанной ИЖ [Bmim]Cl при 120⁰С в течение 60 мин, и составили соответственно $Y_{ВС}=51,53\pm 1,61\%$ и $Y_{ГЛ}=34,50\pm 1,02\%$ от общего содержания углеводов, что превысило результаты, полученные в ходе ферментативного гидролиза ничем непродобработанной биомассы в 1,9 и 2,7 раза (Рисунок 23). При этом начальная скорость ферментативного гидролиза биомассы по ВС принимала значение $V_0=0,75\pm 0,02$ г/л/ч, продуктивность процесса по ВС и глюкозе составила $Q_{ВС}=0,32\pm 0,01$ г/л/ч и $Q_{ГЛ}=0,21\pm 0,01$ г/л/ч, а показатели максимальных концентраций – $C_{ВС}=5,72\pm 0,18$ г/л, $C_{ГЛ}=3,83\pm 0,11$ г/л.

Третьим способом при исследовании и поиске оптимальных условий предобработки биомассы *C. vulgaris* перед проведением ее ферментативного гидролиза был выбран способ ее механической дезинтеграции на шаровой мельнице Mini-BeadBeater-24, который был использован ранее при изучении процесса кислотного гидролиза (см. п. 3.2.1). Дезинтегрированная на шаровой мельнице в течение 4 мин биомасса подвергалась ферментативному гидролизу ($C_{БМ0}= 20$ г сух. в-в/л, концентрация углеводов в растворе $C_{УГЛ}=11,1\pm 0,5$ г/л) (Рисунок 25).

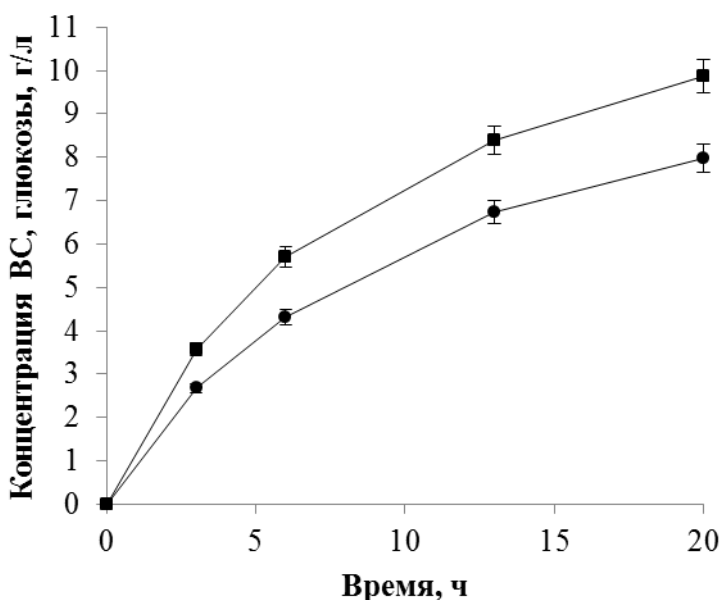


Рисунок 25 – Кинетика накопления ВС (■) и глюкозы (●) в ходе ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, предварительно дезинтегрированной на шаровой мельнице в течение 4 мин

Сравнительный анализ полученных результатов (Рисунки 23-25) свидетельствует о том, что предварительная механическая дезинтеграция клеток *C. vulgaris* приводит к наиболее значительному повышению эффективности последующего ферментативного гидролиза, при этом по сравнению с ферментативным гидролизом биомассы без предобработки получаемый выход ВС выше в 3,3 раза, а выход глюкозы – в 5,6 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований и сравнительного анализа различных способов осуществления ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (при исходной концентрации 20 г сух. в-в/л), накопленной на сточных водах, можно сделать вывод о том, что наилучшие показатели основных параметров процесса ($V_0=1,19\pm 0,04$ г/л/ч, $C_{BC}=9,87\pm 0,34$ г/л, $C_{ГЛ}=7,98\pm 0,22$ г/л, $Y_{BC}=88,92\pm 3,12\%$ и $Y_{ГЛ}=71,89\pm 2,01\%$, $Q_{BC}=0,49\pm 0,02$ г/л/ч и $Q_{ГЛ}=0,40\pm 0,01$ г/л/ч) соответствуют следующим оптимальным условиям его проведения: рекомендуется предварительно проводить деструкцию клеток (в течение 4-х минут) на шаровой мельнице и затем подвергать ферментативному гидролизу (в течение 20 ч) при 37°C и pH 5,5 с использованием комплекса ферментов (Ц + А).

При экспонировании биочувствительного элемента на основе иммобилизованных клеток фотобактерий *P. phosphoreum* в течение 30 мин в растворе, полученном после проведения в оптимальных условиях ферментативного гидролиза механически дезинтегрированной биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, тушения сигнала биолюминисценции отмечено не было, что свидетельствовало об отсутствии в анализируемом растворе токсически-активных компонентов.

Поскольку получение высококонцентрированных растворов сахаров обосновано с точки зрения эффективного проведения последующих процессов биотехнологической конверсии исследуемого сырья в конечные продукты, то было решено попробовать решить эту задачу путем увеличения исходной концентрации обрабатываемой биомассы.

В связи с этим далее было исследовано влияние начальной концентрации предварительно дезинтегрированной биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в среде ($C_{БМО}$) на основные характеристики ферментативного гидролиза. Исходная концентрация механически дезинтегрированной биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в среде гидролиза была варьирована в диапазоне от 20 до 120 г сух. в-в/л, полученные результаты представлены на Рисунке 26 и в Таблице 16.

Из полученных данных следовало, что в целом при увеличении исходной концентрации субстрата конечная концентрация ВС и глюкозы в гидролизате увеличивалась (Рисунок 26, Таблица 16), при этом несколько варьировалась длительность процесса,

обеспечивающая достижение максимальных значений конечных концентраций ВС и глюкозы: так, в диапазоне $C_{БМ0} = 20-40$ г сух.в-в/л длительность процесса составляла 20 ч, а в диапазоне $C_{БМ0} = 50-120$ г сух. в-в/л – 22-28 ч.

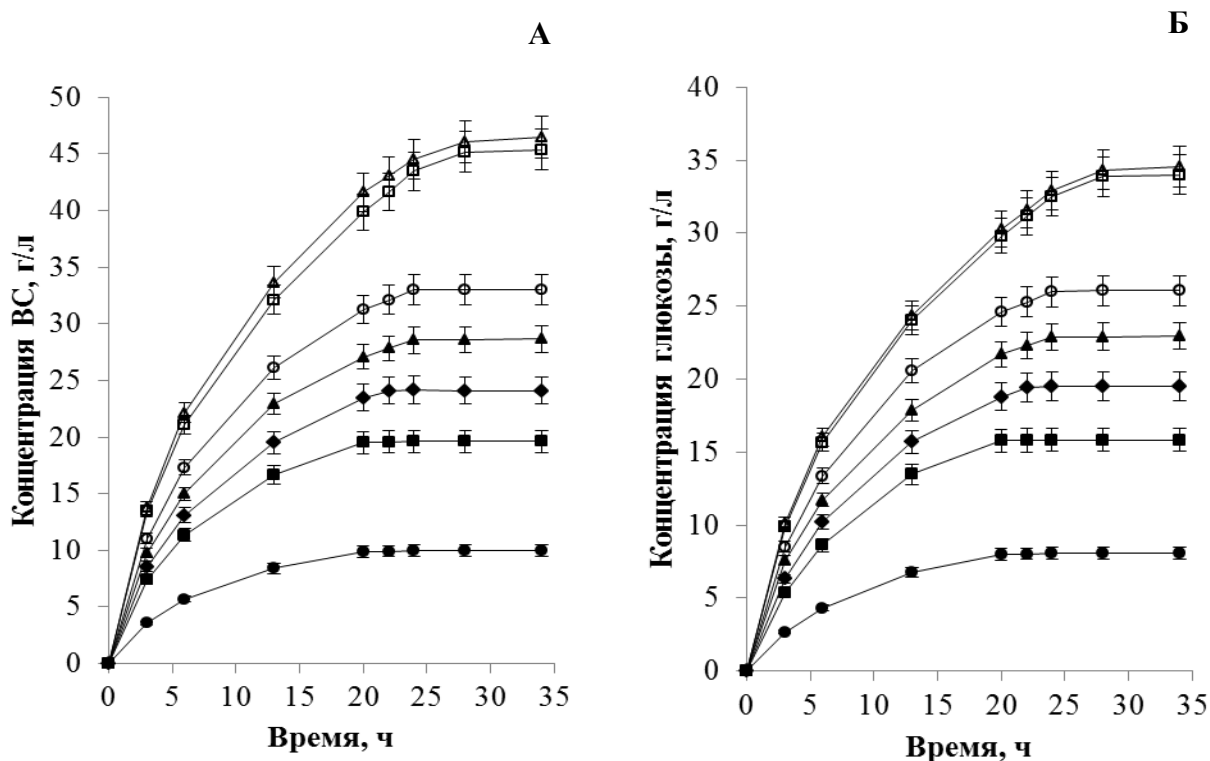


Рисунок 26 – Кинетика накопления ВС (А) и глюкозы (Б) в ходе ферментативного гидролиза предварительно дезинтегрированной на шаровой мельнице биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, взятой в различной исходной концентрации $C_{БМ0}$ (г сух. в-в/л): (●) 20, (■) 40, (◆) 50, (▲) 60, (○) 70, (□) 100, (Δ) 120

При увеличении исходной концентрации биомассы от 100 до 120 г сух. в-в/л наблюдаемого увеличения максимальной концентрации ВС уже практически не происходило.

Таким образом, можно утверждать, 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 (Таблица 16), а полученный гидролизат может быть рекомендован для использования на последующих стадиях биотехнологических процессов биотрансформации сырья в самые разнообразные продукты с помощью биокатализаторов.

Таблица 16 - Основные показатели ферментативного гидролиза (Ц + А, 37°C, рН 5,5) предварительно дезинтегрированной на шаровой мельнице (4 мин) биомассы микроводорослей *C. vulgaris* при варьировании ее исходной концентрации в реакционной среде

$C_{\text{БМО}}$, г сух. в-в/л	Время, ч	V_0 , г/л/ч	$C_{\text{ВС}}$, 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	$Y_{\text{ВС/БМ}}$ гВС/гБМ
20	20	1,19±0,04	9,87±0,34	7,98±0,22	88,92±3,12	71,89±2,01	0,49±0,02	0,40±0,01	0,49±0,02
40	20	2,46±0,08	19,51±0,66	15,78±0,45	87,88±3,01	71,08±2,19	0,98±0,03	0,79±0,02	0,49±0,02
50	22	2,86±0,10	24,10±0,85	19,40±0,58	86,85±3,09	69,91±2,13	1,10±0,04	0,88±0,03	0,48±0,02
60	24	3,26±0,12	28,55±1,03	22,85±0,75	85,74±3,13	68,62±2,18	1,19±0,04	0,95±0,03	0,48±0,02
70	24	3,68±0,13	33,00±1,18	25,98±0,85	84,94±3,01	66,87±2,20	1,38±0,05	1,08±0,04	0,47±0,02
100	28	4,48±0,17	45,19±1,69	33,87±1,15	81,42±3,02	61,03±2,14	1,61±0,06	1,21±0,04	0,45±0,02
120	28	4,58±0,17	46,06±1,70	34,34±1,16	69,16±2,62	51,56±1,71	1,64±0,06	1,23±0,04	0,38±0,01

3.2.3 Сравнительный анализ эффективности различных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*

Проведено исследование эффективности различных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, с использованием физических, химических и ферментативных методов и при их сочетании. Из полученных результатов очевидно, что как самостоятельный метод ни механическая дезинтеграция биомассы микроводорослей, ни термолиз, ни использование ИЖ не позволяют получить значимые количества ВС в реакционной среде, однако, применение этих методов эффективно для повышения реакционной способности такого сырья как биомасса микроводорослей *C. vulgaris* перед его гидролизом.

В Таблице 17 представлены ключевые данные, позволяющие провести комплексный сравнительный анализ основных результатов, с точки зрения получения гидролизатов с максимальной концентрацией ВС и глюкозы ($C_{ВС}$ и $C_{ГЛ}$) из углеводных компонентов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах. Часть показателей позволяет провести оценку эффективности процессов с кинетической точки зрения. На основании представленных данных можно также в целом оценить временные, и энергетические затраты на предобработку биомассы, влияющие на себестоимость проведения стадии предобработки данного сырья при использовании того или иного подхода (Таблица 17).

С точки зрения максимальной скорости гидролиза, минимизации временных затрат и получения достаточно высоких выходов ВС, наилучшие результаты соответствуют кислотному гидролизу (при одновременном термолизе) полисахаридов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, причем максимальные значения основных параметров достигаются при проведении предварительной механической деструкции клеток с использованием шаровой мельницы. При предварительной механической дезинтеграции (в течение 4 минут) длительность проведения процесса гидролиза биомассы сокращается на 44%, а конечные концентрации ВС - на 10% выше. Однако, как уже было отмечено ранее, данный способ не лишен существенных недостатков, поскольку кислоты-катализаторы одновременно с реакцией образования ВС могут катализировать и реакцию их последующей трансформации с образованием различных продуктов в виде фурфурола, оксиметилфурфурола и др. [74, 78]. Известно, что данные вещества оказывают токсичное воздействие на микроорганизмы и снижают тем самым эффективность последующей трансформации сахаров в целевые продукты.

Таблица 17–Основные показатели различных способов предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточной воде

№	Способ предобработки	V ₀ , г/л/ч	C _{вс} , г/л	C _{гл} , г/л	Y _{вс} , %	Y _{гл} , %	Q _{вс} , г/л/ч	Q _{гл} , г/л/ч
C_{бм0} = 20 г сух. в-в/л								
1	Кислотный гидролиз и термолиз (1,2н HCl, 0,42 ч, 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 ₂ SO ₄ , 0,75 ч, 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 ₂ SO ₄ , 0,42 ч, 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)	0,19±0,01	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)	0,99±0,03	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)	0,75±0,02	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)	1,19±0,04	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_{бм0} = 100 г сух.в-в/л								
8	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)	4,48±0,17	45,19±1,69	33,87±1,15	81,42±3,02	61,03±2,14	1,61±0,06	1,21±0,04

Кроме того по окончании процесса гидролиза проводится удаление непрореагировавшей кислоты путем ее нейтрализации, в среде остаются сульфаты или хлориды, которые уже в концентрациях 0,3-0,4 г/л могут оказывать негативное действие на метаболическую активность микроорганизмов [198]. Важным также является то, что кислотный гидролиз осуществляется при высоких температурах, под давлением [84-86], при этом процесс способствует коррозии оборудования и диктует требования к соблюдению жестких условий к материалам, используемым для изготовления биотехнологических реакторов.

Указанных выше недостатков лишен гораздо более эффективный, специфичный и направленный метод ферментативного гидролиза биомассы. Осуществление данного процесса требует больших по сравнению с кислотным гидролизом временных затрат, но сам процесс проходит в более мягких условиях по температуре (37 °С вместо 108÷121 °С), давлению (атмосферное давление) и кислотности среды (рН 5,5 вместо 0), обеспечивая высокие выходы ВС. Установлено, что применение данного метода, как и в случае кислотного гидролиза, наиболее эффективно в сочетании с методами, обеспечивающими предварительное увеличение реакционной способности сырья (термолиз, обработка ИЖ, механическая дезинтеграция клеток).

Согласно полученным результатам (Таблица 17), наименее эффективным, но в принципе реализуемым на практике подходом, оказался ферментативный гидролиз после предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris* ИЖ. При этом в сравнении с процессом ферментативного гидролиза непредобработанной биомассы отмечено увеличение начальной скорости в 3,9 раз, увеличение конечной концентрации ВС и глюкозы на 92 и 168%, соответственно (Рисунки 23 и 24). Интересным является сравнение характеристик предложенного подхода, сочетающего предобработку биомассы ИЖ и последующее проведение ее ферментативного гидролиза, с известным в литературе способом предобработки биомассы микроводорослей ИЖ перед её кислотным гидролизом ([74], Таблица 4). Становится очевидным, что наиболее предпочтительным в случае использования ИЖ является проведение последующего кислотного гидролиза, обеспечивающее на 36% более высокий выход ВС. Однако, получаемые конечные гидролизаты, содержащие остаточные токсичные концентрации ИЖ, далее наиболее целесообразно использовать в процессах химического синтеза, а не в биологических процессах. Также следует отметить, что предложенный авторами [74] процесс очистки растворов с использованием ионно-обменной хроматографии характеризуется высокой себестоимостью.

Термолиз в сочетании с ферментативным гидролизом обеспечивает выходы и конечные концентрации ВС, сопоставимые с наилучшими показателями, полученными при

осуществлении кислотного гидролиза. Следует отметить, что термолиз, осуществляемый перед ферментативной обработкой биомассы *C. vulgaris*, приводит к увеличению начальной скорости гидролиза в 5,2 раза по сравнению со скоростью гидролиза непродобработанной биомассы.

Механическая деструкция биомассы с последующим ферментативным гидролизом обеспечивает возможность накопления ВС и глюкозы в реакционных средах в максимальных концентрациях и с максимальным выходом. При этом увеличение начальной скорости и средней продуктивности процесса достигается увеличением начальной концентрации биомассы (вплоть до 100 г сух. в-в/л), вводимой в среду ферментативного гидролиза.

При сравнении результатов, полученных в ходе исследований ферментативного гидролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (Таблица 17), с известными из литературы (Таблица 5), с точки зрения получения максимальных концентраций и выходов глюкозы и ВС, можно утверждать, что использование оптимизированных в ходе проведения исследования условий позволило в 3 раза быстрее получать из биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (при исходной концентрации 20 г сух. в-в/л) выходы и концентрации ВС и глюкозы, сопоставимые с наилучшими из известных.

При сравнении полученных результатов с литературными данными можно утверждать, что при выполнении данной работы впервые было проведено объемное полноценное исследование различных подходов к предобработке биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, с точки зрения получения максимальной концентрации ВС и глюкозы из углеводных компонентов биомассы. Полученные результаты могут быть использованы при планировании и проведении различных процессов предобработки биомассы микроводорослей.

В результате проведенных исследований были сделаны следующие выводы:

- для достижения высоких значений целевых показателей (максимальной концентрации ВС и глюкозы) при предобработке биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, рекомендуется использовать сочетание нескольких методов, один из которых направлен на дезинтеграцию клеток и повышение реакционной способности биоорганических компонентов биомассы;

- максимальные значения средней продуктивности процесса предобработки биомассы по ВС и глюкозе ($Q_{ВС}=20,12\pm 0,64$ г/л/ч и $Q_{ГЛ}=10,83\pm 0,29$ г/л/ч) достигаются при использовании подхода, сочетающего последовательно метод ее механической дезинтеграции в течение 4 минут на шаровой мельнице и метод последующего ее кислотного гидролиза при одновременном термолизе при 121°C (1 атм) в течение 25 минут с

использованием 1,2н H₂SO₄. Полученный гидролизат содержит соединения (муравьиную кислоту, оксиметилфурол и фурфурол), обладающие токсичностью в отношении клеток, но может быть рекомендован для использования в процессах химической конверсии в различные конечные продукты;

- оптимальным, с точки зрения получения растворов с максимальной концентрацией ВС и глюкозы ($C_{BC}=45,19\pm 1,69$ г/л и $C_{ГЛ}=33,87\pm 1,15$ г/л) из 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 при pH 5,5, 37 °C в течение 28 ч с использованием комплекса ферментов класса целлюлаз (8 мг/г сух. в-в биомассы) и амилаз (2 мг/г сух. в-в биомассы) при исходной концентрации биомассы 100 г сух. в-в/л.

Среды, полученные в результате ферментативного гидролиза, содержащие ВС и глюкозу в высоких концентрациях, являются перспективными с точки зрения их дальнейшего использования для получения каких-либо ценных продуктов биотехнологическим способом.

Ранее уже была показана возможность биотрансформации биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в такие коммерчески значимые продукты как молочная и фумаровая кислоты - мономеры для получения биоразлагаемых полимеров [111]. В связи с этим представляло определенный интерес, с научной и практической точки зрения, исследование возможности применения ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной на сточных водах, для получения другой органической кислоты, а именно янтарной, также являющейся мономером для получения биоразлагаемых полимеров. Кроме того интересно было сравнить результаты конверсии в молочную и фумаровую кислоты ВС, входящих в состав ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, полученных в этой работе, с ранее предложенными в литературе процессами получения молочной и фумаровой кислот из термализованной биомассы тех же клеток [111]. Именно этому был посвящен следующий этап работы.

3.3 Трансформация ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в органические кислоты – мономеры для получения биоразлагаемых полимеров, и биополимеры - полигидроксиалканоаты

На данном этапе работы были изучены возможности и оптимизированы условия для проведения процесса биотрансформации ВС, содержащихся в ферментативных гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в различные органические кислоты (молочную,

фумаровую и янтарную), являющиеся потенциальными мономерами для получения биопластиков, и биополимеры в виде полигидроксиалканоатов (ПГА).

3.3.1 Получение молочной и фумаровой кислот с использованием биокатализаторов в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиальных грибов вида *Rhizopus oryzae*

3.3.1.1 Получение молочной кислоты с использованием иммобилизованного биокатализатора (ИБК) на основе клеток мицелиального гриба *Rhizopus oryzae* F-814

Ранее в лаборатории экобиокатализа Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова был разработан высокоэффективный биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиального гриба *Rhizopus oryzae* F-814 [169]. Было показано, что данный ИБК может быть эффективно использован для получения МК из глюкозы, гидролизатов крахмала [169] и из гидролизатов различных ЦСО [111]. Кроме того была установлена принципиальная возможность получения МК из предварительно предобработанной методом термолиза биомассы микроводорослей [111], однако условия предобработки биомассы и проведения биотехнологического процесса получения МК не были оптимизированы.

В связи с этим при исследовании и оптимизации процесса получения МК из ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* было решено использовать тот же биокатализатор. При этом использовался ферментативный гидролизат механически дезинтегрированной биомассы *C. vulgaris*, полученный в ранее подобранных условиях (см. п. 3.2.2), и только жидкая фаза указанного выше ферментативного гидролизата, отделенная от осадка центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин). При проведении эксперимента была выбрана исходная концентрация биомассы *C. vulgaris* – 50 г сух. в-в/л, в ферментативных гидролизатах которой содержались ВС в концентрации $24,1 \pm 0,8$ г/л. Получение МК проводилось в аэробных условиях при 28°C в течение 40 ч с постоянным перемешиванием (180 об/мин), при исходной концентрации биокатализатора в среде $S_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л [111], значение pH $6,6 \pm 0,2$ поддерживалось на постоянном уровне за счет периодической подтитровки среды 2,5 М раствором NH_4OH . Полученные результаты представлены на Рисунке 27.

Из полученных результатов следует, что для осуществления биоконверсии предобработанной биомассы *C. vulgaris* в МК более эффективным оказалось использование в качестве питательной среды только жидкой фазы ферментативного гидролизата биомассы *C. vulgaris*. Именно такая среда использовалась далее при проведении всех

экспериментальных исследований по получению МК.

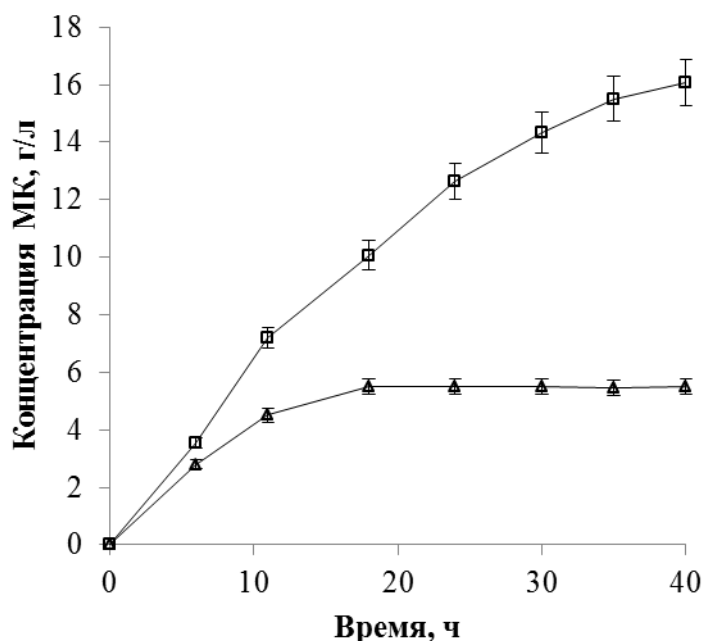


Рисунок 27 – Кинетика накопления МК в среде, представляющей собой ферментализат биомассы *C. vulgaris* (Δ) и только жидкую фазу ферментативного гидролизата (□) под действием ИБК ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л) на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814. Исходная концентрация ВС в ферментализате - $24,1 \pm 0,8$ г/л

С целью выбора наиболее благоприятных условий проведения эксперимента было рассмотрено влияние исходной концентрации ВС в составе ферментативных гидролизатов, полученных при обработке биомассы *C. vulgaris*, взятой в разной концентрации: 50, 70 и 100 г сух. в-в/л, на эффективность процесса накопления МК под действием ИБК в виде иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 (Рисунок 28, Таблица 18).

Установлено, что при проведении биотехнологического процесса с использованием ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 в исследуемом диапазоне значений показателя C_{BC0} $24,1 \div 45,2$ г/л за 40 ч происходит практически полное потребление клетками присутствующих в растворе ВС. При этом 65÷68% ВС конвертируется именно в МК. Увеличение исходной концентрации ВС в среде культивирования иммобилизованных клеток мицелиальных грибов в целом приводило к повышению эффективности процесса получения МК по следующим показателям: $Q_{\text{МК}}$, $C_{\text{МК макс}}$ и $\Pi_{\text{ИБК}}$ – на 76% (Таблица 18).

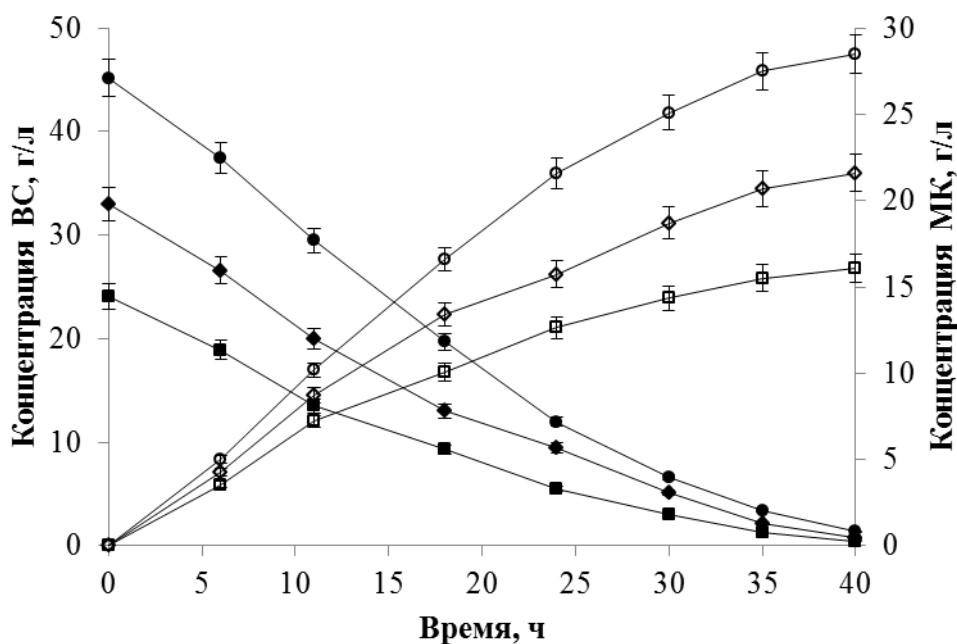


Рисунок 28 – Кинетика потребления ВС (черные символы) и накопления в среде МК (белые символы) в процессе конверсии ВС, содержащихся в ферментолізатах биомассы *C. vulgaris*, под действием ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 ($S_{ИБК}=30$ г сух. в-в/л) при варьировании исходной концентрации ВС, полученных при ферментативном гидролизе биомассы *C. vulgaris*, $S_{БМО}$: 50 (■, □), 70 (◆, ◇), 100 (●, ○) г сух. в-в/л

Сравнительный анализ полученных результатов (Таблица 18) позволяет сделать вывод о том, что, с точки зрения получения максимальных значений целевых параметров $Q_{МК}$, $S_{МК\max}$ и $\Pi_{ИБК}$ наиболее целесообразно для получения ферментативных гидролизатов использовать биомассу в начальной концентрации 100 г сух. в-в/л, при этом более 50% углеводов, входящих исходно в ее состав, удается направленно конвертировать в МК с помощью иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814.

При анализе литературных данных стало очевидным, что только один источник содержит информацию относительно получения МК из гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с использованием клеток мицелиальных грибов ([111], Таблица 7). В данной работе в результате проведенной оптимизации процессов ферментативной предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris* и биотрансформации ВС, содержащихся в полученных ферментативных гидролизатах, в МК с помощью ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 удалось в 142 раза увеличить показатели $S_{МК\max}$ и $Q_{МК}$.

Была продемонстрирована возможность многократного использования иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* в периодическом процессе

получения МК из ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (Рисунок 29).

Таблица 18 – Характеристики процесса получения МК (длительность 40ч) из ВС, содержащихся в ферментализатах биомассы *C. vulgaris* под действием ИБК на основе клеток *R. oryzae* F-814 ($C_{\text{ИБК}} = 30$ г сух. в-в/л) при варьировании исходной концентрации биомассы *C. vulgaris*, взятой для получения ферментализатов

Исходная концентрация биомассы <i>C. vulgaris</i> $C_{\text{БМО}}$, г сух. в-в/л	50	70	100
Исходная концентрация ВС в ферментализатах $C_{\text{ВСО}}$, г/л	24,1±0,8	33,0±1,2	45,2±1,7
Исходная концентрация глюкозы в ферментализатах $C_{\text{ГЛЮ}}$, г/л	19,4±0,6	26,0±0,8	33,9±1,2
Максимальная концентрация МК $C_{\text{МКмакс}}$, г/л	16,1±0,6	21,6±0,9	28,4±1,1
Продуктивность процесса по МК $Q_{\text{МК}}$, г/л/ч	0,40±0,01	0,54±0,02	0,71±0,03
Продуктивность ИБК $P_{\text{ИБК}}$, г МК/ч/кг ИБК	13,3±0,4	18,0±0,8	23,7±1,1
Потребление глюкозы $\Delta C_{\text{ГЛ}}$, %	99,2±0,8	98,6±1,2	98,1±0,9
Потребление ВС $\Delta C_{\text{ВС}}$, %	98,1±1,9	97,7±2,1	97,0±2,5
Степень конверсии потребленных ВС в МК $Y_{\text{МК/ВС}}$	0,68±0,03	0,67±0,03	0,65±0,03
Степень конверсии всех углеводов биомассы в МК $Y_{\text{МК/УГЛ}}$	0,58±0,02	0,56±0,02	0,51±0,02
Степень конверсии биомассы (БМ) в МК $Y_{\text{МК/БМ}}$	0,32±0,01	0,31±0,01	0,28±0,01

Установлено, что иммобилизованные клетки *R. oryzae* способны эффективно функционировать в периодическом режиме получения МК из ВС, содержащихся в гидролизатах биомассы микроводорослей, период полуинактивации ИБК в данном биотехнологическом процессе составил $ПП_{\text{ИБК}} = 480$ ч. При сравнении полученных результатов с литературными данными (Таблица 7) становится очевидным, что использование иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* для получения МК из гидролизатов микроводорослей *C. vulgaris* в периодическом процессе позволяет получить

как минимум в 7 раз большее общее количество МК с использованием одной и той же биомассы продуцента.

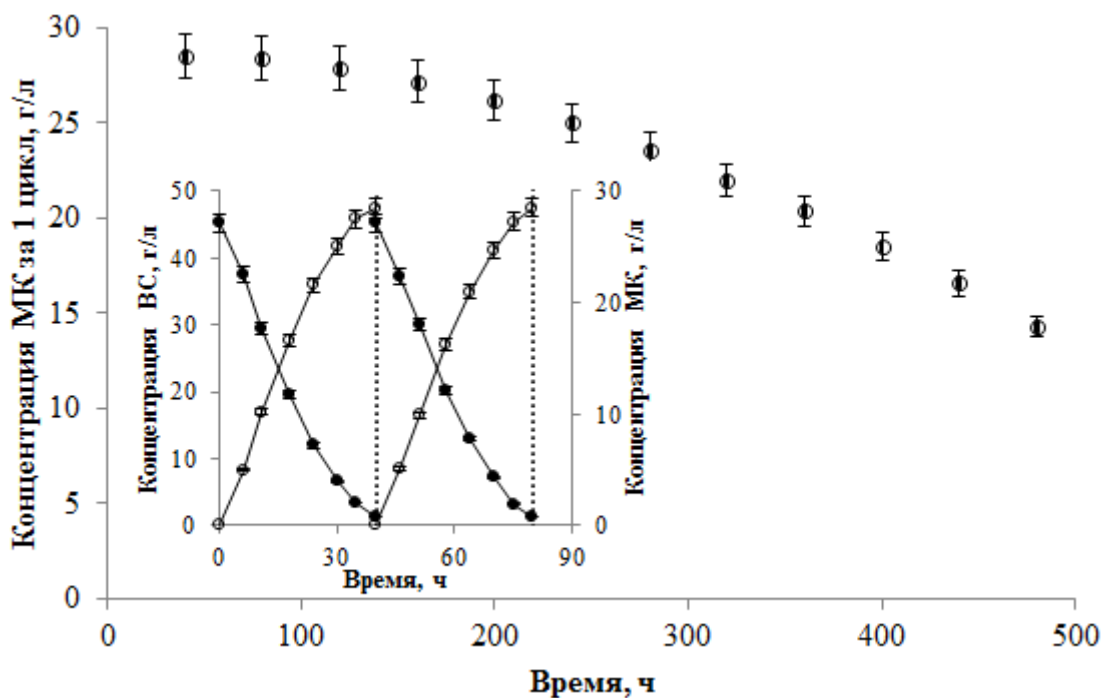


Рисунок 29 – Изменение концентрации МК в среде в процессе многократного использования ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 ($C_{\text{ИБК}} = 30$ г сух. в-в/л). Каждая «точка» соответствует максимальному уровню накопления МК в конце каждого периодического цикла. На «врезке» представлена кинетика потребления ВС (●) и накопления в среде МК (○) в 2-х циклах использования ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-814 ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л) для получения МК из ферментативных гидролизатов биомассы *C. vulgaris*, полученных при исходной ее концентрации $C_{\text{БМ0}}=100$ г сух. в-в/л. Пунктирными линиями на «врезке» отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе на свежую питательную среду

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

- оптимизированы условия биокаталитической трансформации ВС, содержащихся в ферментативных гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris* ($C_{\text{БМ0}}=100$ г сух. в-в/л), накопленной на сточных водах, в МК при использовании ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* F-814 ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л) в периодическом процессе (28°C , $\text{pH}=6,6\pm 0,2$, длительность цикла - 40ч). Средняя продуктивность процесса составила $Q_{\text{МК}} = 0,71\pm 0,03$ г/л/ч, $C_{\text{МК макс}} = 28,4\pm 1,1$ г/л, $Y_{\text{МК/УГЛ}} = 0,51\pm 0,02$, $\Pi_{\text{ИБК}} = 23,7\pm 1,1$ г МК/ч/кг ИБК, в 142 раза увеличены показатели $C_{\text{МК макс}}$ и $Q_{\text{МК}}$ единственно известного в литературе [111]

аналогичного процесса;

- показана возможность длительного эффективного использования ИБК в процессе получения МК из ВС, входящих в состав ферментолитатов микроводорослей *C. vulgaris* ($\text{ПП}_{\text{ИБК}} = 480$ ч), в 13 и более раз превышающая известные показатели длительности процессов получения МК из биомассы микроводорослей, при этом в результате использования ИБК в периодическом процессе возможно получение как минимум в 7 раз большего количества МК по сравнению с известными в литературе данными (Таблица 7).

3.3.1.2 Получение фумаровой кислоты с использованием ИБК на основе клеток мицелиального гриба *Rhizopus oryzae* F-1032

Для исследования возможностей трансформации ВС, содержащихся в ферментативных гидролизатах биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, в фумаровую кислоту (ФК) в данной работе использовался ранее разработанный в лаборатории экобиокатализа Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова биокатализатор в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 [111].

С целью выбора наиболее благоприятных условий для проведения эксперимента было исследовано влияние исходной концентрации ВС, содержащихся в ферментолитатах биомассы *C. vulgaris*, на результаты процесса накопления ФК. Так же, как и в случае использования грибного продуцента МК, для обеспечения более интенсивной аэрации среды после гидролитической предобработки механически дезинтегрированной биомассы *C. vulgaris* проводилось отделение центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин) надосадочной жидкости от взвешенных частиц. Процесс получения ФК велся в аэробных условиях при 28⁰С в течение 40 ч с постоянным перемешиванием (180 об/мин) (Рисунок 30, Таблица 19).

Установлено, что увеличение исходной концентрации ВС в среде от 24,1 до 45,2 г/л в целом приводило к повышению эффективности процесса получения ФК по показателям: $Q_{\text{ФК}}$, $C_{\text{ФК макс}}$ и $\text{П}_{\text{ИБК}}$ – на 79%. Таким образом, как и в случае получения МК, наиболее целесообразным в данном процессе оказалось использование среды с ВС, полученными при гидролизе биомассы *C. vulgaris* в начальной концентрации 100 г сух. в-в/л.

Была исследована возможность многократного использования иммобилизованных клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 в процессах получения ФК из биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (Рисунок 31). Установлено, что иммобилизованные клетки гриба *R. oryzae* F-1032 способны эффективно функционировать в периодическом режиме (длительность цикла – 40 ч) получения ФК из ферментативных гидролизатов микроводорослей *C. vulgaris*. Период полуинактивации ИБК составил $\text{ПП}_{\text{ИБК}} = 600$ ч.

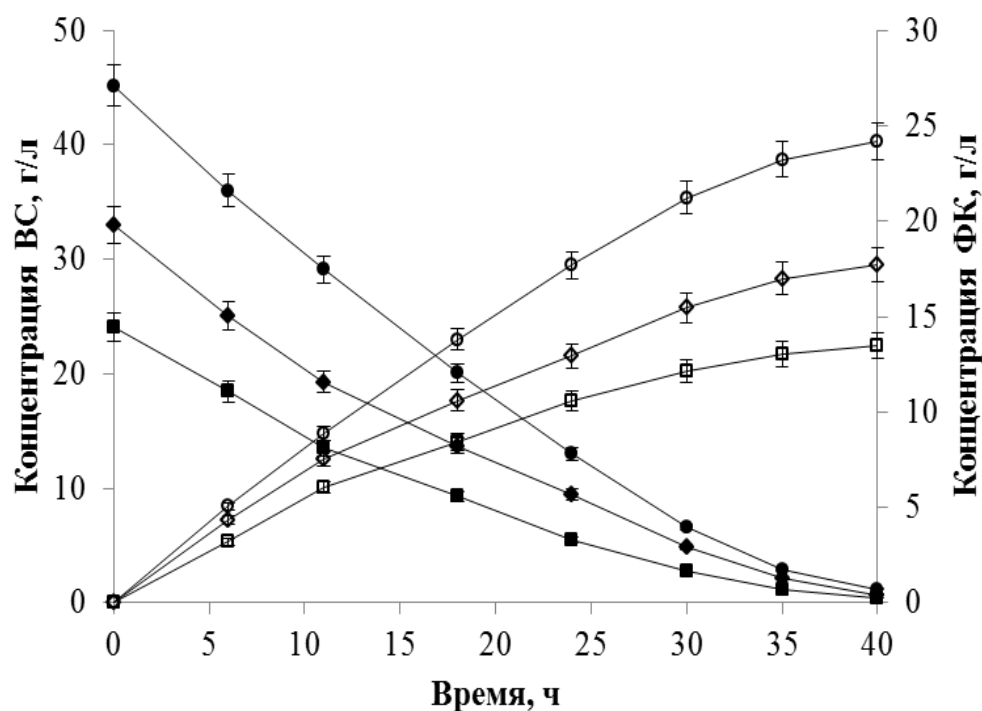


Рисунок 30 – Кинетика потребления ВС (черные символы) и накопления в среде ФК (белые символы) в процессе конверсии ВС, содержащихся в ферментолізатах биомассы *C. vulgaris*, под действием ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 ($S_{ИБК}=30$ г сух. в-в/л) при варьировании исходной концентрации ВС, полученных при ферментативном гидролизе биомассы *C. vulgaris*, $S_{БМО}$: 50 (■, □), 70 (◆, ◇), 100 (●, ○) г сух. в-в/л

При анализе литературных данных было установлено, что получение ФК из гидролизатов микроводорослей ранее было проведено только в одной работе (Таблица 7). При сравнении с ней результатов этого исследования было установлено, что за счет оптимизации условий предобработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris* и условий проведения биотехнологического процесса получения ФК удалось интенсифицировать известный процесс по показателям $S_{ФК\max}$ и $Q_{ФК}$ более, чем в 200 раз!

Наблюдаемые различия в периодах полуинактивации используемых в экспериментах ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* при биотрансформации ферментативных гидролизатов микроводорослей в разные органические кислоты (МК и ФК), вероятно, связаны с физиологическими особенностями конкретных штаммов, в частности, особенностями их метаболизма в тех или иных средах.

Таблица 19 – Характеристики процесса получения ФК (длительность 40ч) из ВС, содержащихся в ферментолізатах биомассы *C. vulgaris* под действием ИБК на основе клеток *R. oryzae* F-1032 ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л) при варьировании исходной концентрации биомассы *C. vulgaris*, взятой для получения ферментолізатов

Исходная концентрация биомассы <i>C. vulgaris</i> $C_{\text{БМО}}$, г сух. в-в/л	50	70	100
Исходная концентрация ВС в ферментолізатах $C_{\text{ВС0}}$, г/л	24,1±0,8	33,0±1,2	45,2±1,7
Исходная концентрация глюкозы в ферментолізатах $C_{\text{ГЛ0}}$, г/л	19,4±0,6	26,0±0,8	33,9±1,2
Максимальная концентрация ФК $C_{\text{ФК макс}}$, г/л	13,5±0,5	17,8±0,7	24,2±0,9
Продуктивность процесса по ФК $Q_{\text{ФК}}$, г/л/ч	0,34±0,01	0,45±0,02	0,61±0,03
Продуктивность ИБК $P_{\text{ИБК}}$, г ФК/ч/кг ИБК	11,3±0,4	15,0±0,7	20,3±0,8
Потребление глюкозы $\Delta C_{\text{ГЛ}}$, %	99,5±0,5	98,8±1,2	98,3±1,6
Потребление ВС $\Delta C_{\text{ВС}}$, %	98,2±0,8	97,8±0,6	97,3±0,5
Степень конверсии потребленных ВС в ФК $Y_{\text{ФК/ВС}}$	0,57±0,02	0,55±0,02	0,55±0,02
Степень конверсии всех углеводов биомассы в ФК $Y_{\text{ФК/УГЛ}}$	0,49±0,02	0,46±0,02	0,44±0,02
Степень конверсии БМ в ФК $Y_{\text{ФК/БМ}}$	0,27±0,01	0,25±0,01	0,24±0,01

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

- оптимизированы условия биокаталитической трансформации ВС, содержащихся в ферментативных гидролизатах микроводорослей *C. vulgaris*, выращенных на сточных водах ($C_{\text{БМО}}=100$ г сух. в-в/л), в ФК при использовании ИБК на основе клеток гриба *R. oryzae* F-1032 ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л) в периодическом процессе (28 °С, длительность цикла – 40 ч). Средняя продуктивность процесса составляла $Q_{\text{ФК}} = 0,61\pm0,03$ г/л/ч, $C_{\text{ФК макс}} = 24,2\pm0,9$ г/л, $Y_{\text{ФК/УГЛ}} = 0,44\pm0,02$, $P_{\text{ИБК}} = 20,3\pm0,8$ г ФК/ч/кг ИБК, более чем в 200 раз увеличены показатели $C_{\text{ФК макс}}$ и $Q_{\text{ФК}}$ единственно известного в литературе аналогичного процесса [111];

- впервые показана возможность длительного эффективного использования ИБК в периодическом процессе получения ФК из ВС, входящих в состав ферментолізатов микроводорослей *C. vulgaris* ($ПП_{\text{ИБК}} = 600$ ч).

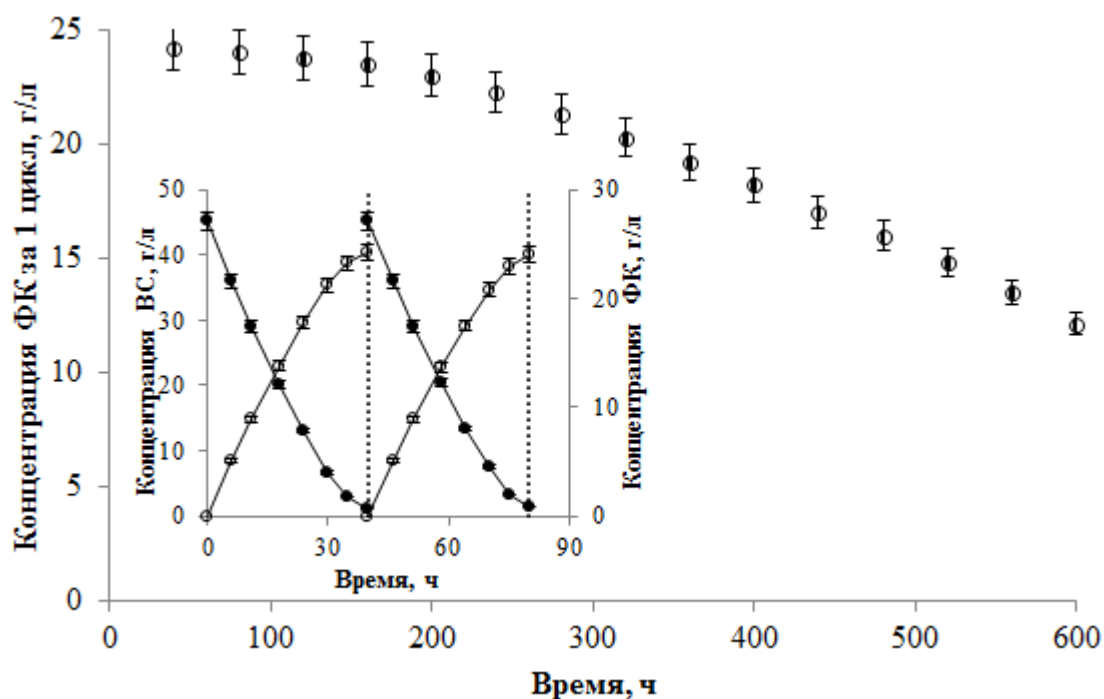


Рисунок 31 – Изменение концентрации ФК в среде в процессе многократного использования ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л). Каждая «точка» соответствует максимальному уровню накопления ФК в конце каждого периодического цикла. На «врезке» представлена кинетика потребления ВС (●) и накопления в среде ФК (○) в 2-х циклах использования ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 ($C_{\text{ИБК}}=30$ г сух. в-в/л) для получения ФК из ферментативных гидролизатов биомассы *C. vulgaris*, полученных при исходной ее концентрации $C_{\text{БМ0}}=100$ г сух. в-в/л. Пунктирными линиями на «врезке» отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе с ИБК на свежую питательную среду

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

Янтарная кислота (ЯК) является мономером для получения биоразлагаемых материалов на основе полибутиленсукцинатов, она также используется для получения нетоксичных пластификаторов (1,4-бутандиола, тетрагидрофурана, γ -бутиролактона) - важных компонентов современных биоразлагаемых полимерных материалов [127-129]. Пластификаторы увеличивают показатели эластичности и мягкости готового продукта. На основе получаемых полимеров высокого качества изготавливают различные экологически безопасные изделия для детей (детскую посуду и игрушки), а также упаковочные материалы для пищевой и медицинской промышленности [129].

Ранее было отмечено, что одним из наиболее продуктивных и перспективных, с точки зрения промышленного применения, продуцентов ЯК являются клетки бактерий *A. succinogenes* (см. п. 1.4). Использование в биотехнологии иммобилизованных клеток в виде гетерогенных биокатализаторов является целесообразным подходом к организации таких процессов с точки зрения упрощения технического оформления (в частности, стадий отделения клеток от среды культивирования) и с экономической точки зрения (отсутствуют затраты на наращивание свежей биомассы для каждого цикла периодического культивирования).

Ранее в лаборатории экобиокатализа Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова был разработан, оптимизирован и успешно реализован способ получения биокатализаторов в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток мицелиальных грибов для процессов получения органических кислот (молочной и фумаровой) [111, 169]. Клетки бактерий *A. succinogenes*, являющиеся наиболее активным продуцентом ЯК, ранее никто не пытался использовать в иммобилизованном виде, применяя криогель ПВС в качестве носителя. Ввиду этого актуальной представлялась разработка нового биокатализатора в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток *A. succinogenes* для получения ЯК, определение основных каталитических характеристик биокатализатора и сравнение эффективности его действия со свободными клетками тех же бактерий.

3.3.2.1 Характеристики процесса получения ЯК под действием свободных клеток бактерий *A. succinogenes* В-10111

Для проведения исследований применялись клетки бактерий *A. succinogenes* В-10111, полученные из ВКПМ. Первоначально на «среде роста», содержащей в качестве субстрата 20 г/л глюкозы (см. п. 2.2.1) при рН $6,8 \pm 0,2$ была исследована кинетика роста клеток *A. succinogenes*. Процесс велся анаэробно в течение 18ч при температуре 37 °С с постоянным перемешиванием (180 об/мин) (Рисунок 32).

Как видно из полученных результатов, максимальная концентрация клеток в среде - 3,0 г сух. в-в/л, накапливается к 12 ч их культивирования. Удельная скорость роста клеток составила $\mu = 0,20 \pm 0,01 \text{ ч}^{-1}$, средняя скорость накопления биомассы $Q_C = 0,25 \pm 0,01$ г сух. в-в/л/ч.

В конце экспоненциальной фазы (на 12 ч культивирования), когда накапливалось максимальное количество продуктивной биомассы, клетки *A. succinogenes* концентрировались центрифугированием (8000 об/мин, 15 мин). С целью максимизации продуктивности процесса по ЯК и снижения скорости роста (т.е. снижения затрат субстрата

на прирост биомассы) для проведения исследований процесса получения ЯК свободными клетками в «рабочей среде», содержащей 50 г/л глюкозы (см. п. 2.2.1), биомасса использовалась в виде концентрированной суспензии.

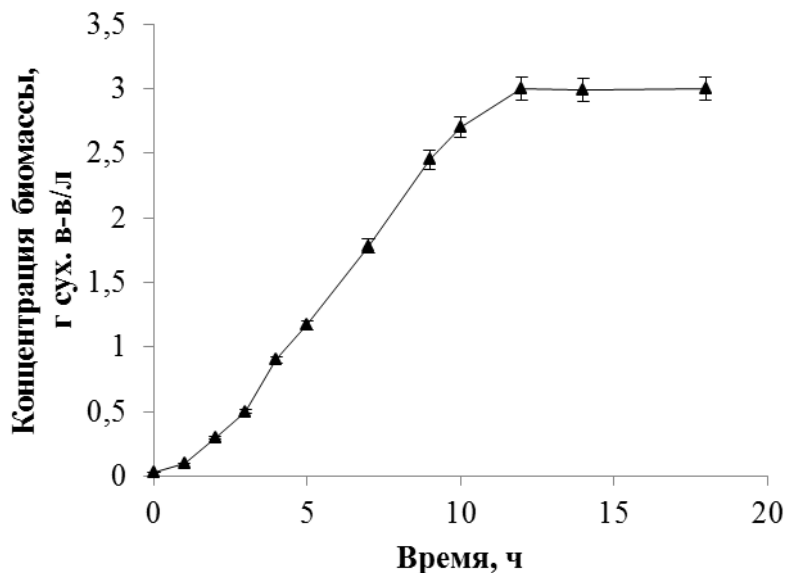


Рисунок 32 – Кинетика роста свободных клеток *A. succinigenes*

Исходная концентрация клеток бактерий в среде составляла 3,0 г сух. в-в/л, рН среды доводился до $6,8 \pm 0,2$ добавлением 2 М раствора Na_2CO_3 . В ходе проведения эксперимента для поддержания рН $6,8 \pm 0,2$ использовался MgCO_3 (25 г/л). Процесс велся анаэробно при температуре 37 °С с постоянным перемешиванием (180 об/мин). С целью выбора наиболее благоприятных условий проведения эксперимента было рассмотрено влияние исходной концентрации глюкозы в среде, которая варьировалась в диапазоне от 50 до 100 г/л, на эффективность процесса накопления ЯК (Рисунок 33, Таблица 20).

Установлено, что увеличение исходной концентрации глюкозы от 50 до 100 г/л приводит лишь к незначительному повышению итоговой концентрации ЯК в среде, при этом наблюдается уменьшение продуктивности процесса по ЯК в 1,2 раза. Вероятно, чрезмерно высокие концентрации глюкозы оказывают ингибирующий эффект на внутриклеточные метаболические процессы, связанные с синтезом ЯК. В связи с этим в качестве оптимальной для получения ЯК в процессе культивирования свободных клеток *A. succinigenes* была выбрана исходная концентрация глюкозы в среде - 50 г/л, при этом длительность процесса получения максимальной концентрации ЯК составила 30 ч.

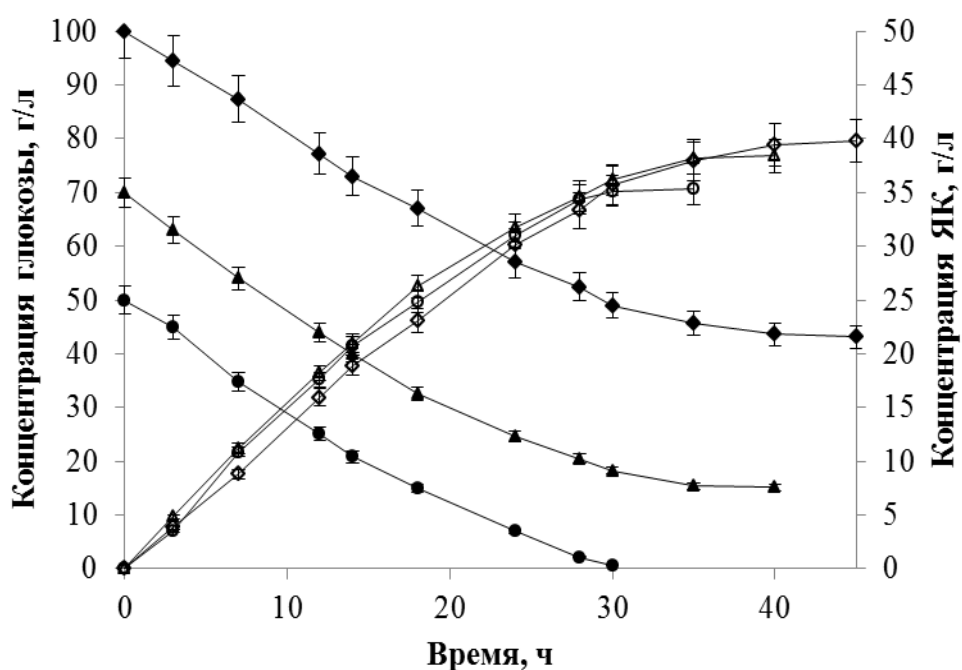


Рисунок 33 – Кинетика потребления глюкозы (черные символы) и накопления в среде ЯК (белые символы) в процессе культивирования свободных клеток *A. succinogenes* при различной концентрации исходной концентрации глюкозы в среде: 50 (●, ○) и 70 (▲, Δ) 100 (◆, ◇) г/л

Таблица 20 – Характеристики процесса получения ЯК под действием свободных клеток бактерий *A. succinogenes* (3,0 г сух. в-в/л)

Исходная концентрация глюкозы $C_{\text{ГЛЮ}}$, г/л	50	70	100
Длительность получения $S_{\text{ЯК макс}}$, ч	30	35	40
Максимальная концентрация ЯК $S_{\text{ЯК макс}}$, г/л	$35,1 \pm 1,2$	$38,2 \pm 1,6$	$39,5 \pm 1,8$
Продуктивность процесса по ЯК $Q_{\text{ЯК}}$, г/л/ч	$1,17 \pm 0,04$	$1,09 \pm 0,05$	$0,99 \pm 0,04$
Потребление глюкозы $\Delta C_{\text{ГЛ}}$, %	$99,0 \pm 1,0$	$78,0 \pm 2,1$	$56,4 \pm 1,7$
Степень конверсии потребленной глюкозы в ЯК $Y_{\text{ЯК/ГЛ}}$	$0,71 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,02$

Анализ полученных результатов показал, что возможно эффективное использование клеток бактерий, предварительно выращенных до конца логарифмической фазы роста и помещенных в высокой концентрации в среду для культивирования. Однако, несмотря на

проявленную свободными клетками высокую продуктивность, стадия отделения биомассы от культуральной жидкости для замены среды в реакторе и последующее получение хорошо ресуспендированных и равномерно распределенных клеток в среде всегда трудоемко и экономически нецелесообразно, поэтому ряд исследователей предпочитают однократно использовать свободные клетки в процессе.

Очевидно, что более эффективным применением сконцентрированных клеток в процессе получения ЯК может быть реализовано через их иммобилизацию.

3.3.2.2 Разработка биокатализатора в виде иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes* В-10111 и исследование его свойств

3.3.2.2.1 Оптимизация состава ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС

Известно, что иммобилизация бактериальных клеток позволяет равномерно распределить их по всему объему реактора, удерживать их в реакторе в высокой концентрации и снизить негативное влияние накапливающихся в процессе метаболитов, повысив стабильность функционирования [143, 199].

В качестве носителя для иммобилизации клеток *A. succinogenes* был использован криогель ПВС, который, как было указано ранее (см. гл. 3.1.2), хорошо зарекомендовал себя при иммобилизации клеток различных микроорганизмов, успешно использованных в разнообразных биотехнологических процессах.

Известно, что характеристики разрабатываемого ИБК в значительной степени зависят от удельного содержания в нем биомассы клеток [190]. Процесс “замораживания-оттаивания”, сопровождающий получение ИБК на основе клеток *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС, предполагает негативное воздействие низких температур на клетки, что может привести к частичной потере их жизнеспособности и, соответственно, к снижению уровня их метаболической активности. Для того чтобы при иммобилизации сохранить высокий уровень жизнеспособности бактерий, исходная концентрация иммобилизуемых клеток не должна быть слишком низкой. С другой стороны, очень высокая концентрация клеток в составе гранул часто не всегда целесообразна, так как может происходить вымывание клеток из носителя из-за их плохого удерживания.

Концентрация полимера, используемого для получения ИБК на основе криогеля ПВС, также оказывает влияние на конечные характеристики получаемого препарата иммобилизованных клеток [189]. В матрице с низкой концентрацией полимера (7–8%) из-за большого размера образующихся пор клетки бактерий могут плохо удерживаться. Слишком

высокие концентрации полимера (более 13 – 15%) обеспечивают получение матриц с малым размером пор, что может приводить к появлению диффузионных ограничений для массообменных процессов и снижать метаболическую активность клеток [189].

С учетом вышесказанного было проведено исследование влияния концентрации ПВС в растворе, используемом для иммобилизации клеток, и концентрации иммобилизуемой бактериальной биомассы на характеристики разрабатываемого биокатализатора. Для этого были приготовлены (см. п. 2.2.2) образцы ИБК с различной концентрацией биомассы клеток *A. succinogenes* (от 1 до 3% по сухим веществам) на основе растворов, содержащих ПВС в различных концентрациях (от 10 до 15%) (Таблица 21).

Таблица 21 – Концентрация внутриклеточного АТФ ($\times 10^{-7}$ моль/г сух. в-в) в суспензии клеток в растворе ПВС (до замораживания) и в «только что» сформированных гранулах ИБК (после размораживания), полученных при различной исходной концентрации раствора ПВС, использованного для формирования гранул, и различном массовом содержании иммобилизуемой биомассы клеток в получаемой смеси

Биомасса, %	ПВС, %					
	10		13		15	
	до	после	до	после	до	после
1	4,8±0,2	3,9±0,2	4,0±0,1	3,4±0,1	3,7±0,2	3,0±0,1
2	8,7±0,3	7,8±0,4	7,7±0,3	6,7±0,3	7,1±0,4	5,9±0,3
3	12,9±0,5	11,6±0,5	11,6±0,4	9,5±0,4	11,2±0,4	8,7±0,3

Как видно из полученных результатов, концентрация внутриклеточного АТФ в гранулах с иммобилизованными клетками (после размораживания) повышалась с увеличением содержания биомассы в этих гранулах, что свидетельствовало об удовлетворительном уровне выживаемости клеток в процессе их иммобилизации в криогель ПВС. Варьирование же концентрации ПВС в составе ИБК в диапазоне от 10 до 15% практически не оказывало влияния на уровень метаболической активности иммобилизованных клеток, что выражалось в близких по величине значениях концентрации внутриклеточного АТФ в составе гранул ИБК.

Для исследования влияния состава ИБК на выход ЯК в процессе биотрансформации глюкозы клетками *A. succinogenes* все образцы ИБК экспонировались в течение 34 ч в питательной среде того же состава, что использовалась для свободных клеток. Начальная концентрация иммобилизованных клеток в среде во всех случаях была одинаковой и

составляла 3,0 г сух. в-в/л. В ходе процесса контролировалась продуктивность процесса получения ЯК и концентрация внутриклеточного АТФ в составе гранул ИБК (Таблица 22).

Таблица 22 – Влияние состава ИБК, приготовленного на основе клеток *A.succinogenes*, на продуктивность процесса получения ЯК из глюкозы ($C_{\text{Глю}} = 50$ г/л) при внесении в среду одинаковой концентрации иммобилизованных клеток (по 3,0 г сух. в-в/л)

ИБК	Q _{ЯК} , г/л/ч			[АТФ]×10 ⁻⁷ , моль/г сух. в-в ИБК после 34 ч культивирования			
	ПВС,%	10	13	15	10	13	15
Биомасса,%							
1		0,99±0,02	1,07±0,03	1,01±0,02	2,8±0,1	3,6±0,1	3,1±0,1
2		1,00±0,02	1,09±0,03	0,99±0,03	6,6±0,3	7,0±0,3	5,4±0,3
3		0,91±0,03	0,86±0,03	0,79±0,02	10,1±0,4	9,1±0,3	7,9±0,2

Из полученных результатов следует, что максимальные скорости накопления ЯК наблюдались для двух образцов ИБК: 13% ПВС и 1% биомассы, 13% ПВС и 2% биомассы. Значения концентрации внутриклеточного АТФ во всех образцах свидетельствовали о высоком уровне метаболической активности клеток в составе ИБК. Однако важно учесть, что для создания в среде концентрации иммобилизованных клеток 3,0 г сух. в-в/л требуется 20 г сух. в-в/л ИБК с 2%-ным содержанием биомассы внутри гранул и 40 г сух. в-в/л – с 1%-ным, что экономически менее выгодно, а технологически менее удобно (в реактор необходимо помещать в 2 раза больше гранул).

Таким образом, в ходе проведенных исследований был разработан биокатализатор в виде иммобилизованной в криогель ПВС биомассы клеток бактерий *A. succinogenes*, обеспечивающий продуктивность процесса получения ЯК из глюкозы $Q_{\text{ЯК}}=1,09\pm0,03$ г/л/ч при исходной концентрации субстрата $C_{\text{Глю}}=50$ г/л, определен наиболее эффективный и целесообразный к применению исходный состав ИБК: 13% раствора ПВС и 2% биомассы.

3.3.2.2.2 Исследование основных функциональных и каталитических характеристик разработанного ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС

С целью выбора оптимальных условий для использования разработанного ИБК анализировалось влияние концентрации иммобилизованных клеток и субстрата в среде на показатели биотехнологического процесса получения ЯК.

При исследовании влияния концентрации в среде иммобилизованных клеток бактерий *A. succinogenes* на эффективность процесса получения ЯК было проведено варьирование их концентрации в диапазоне от 2,0 до 4,0 г сух. в-в/л (концентрация ИБК, соответственно, варьировалась в диапазоне от 13,3 до 26,7 г сух. в-в/л) в процессе накопления ЯК с использованием «рабочей среды» (см.п.2.2.1) (Рисунок 34, Таблица 23).

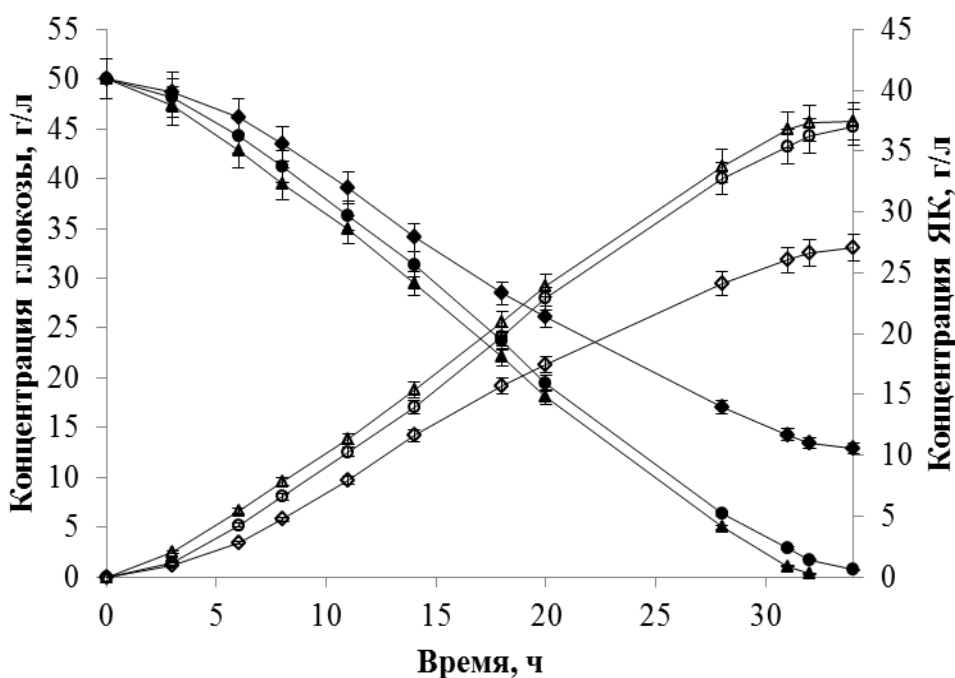


Рисунок 34 – Кинетика потребления глюкозы (черные символы) и накопления в среде ЯК (белые символы) в процессе культивирования иммобилизованных клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС, при различной исходной концентрации иммобилизованных клеток в среде: 2,0 (◆, ◇), 3,0 (●, ○) и 4,0 (▲, Δ) г сух. в-в/л.

Из полученных данных следует, что с повышением концентрации иммобилизованных клеток в среде увеличиваются показатели итогового количества накопленной в среде ЯК и продуктивности процесса по ЯК. Существенной разницы между концентрациями клеток 3,0 и 4,0 г сух. в-в/л выявлено не было, в этой связи именно концентрация иммобилизованных клеток *A. succinogenes* 3,0 г сух. в-в/л (концентрация ИБК 20 г сух. в-в/л) была выбрана и использовалась в дальнейших экспериментах.

При исследовании влияния исходной концентрации глюкозы на показатели эффективности процесса получения ЯК было проведено варьирование исходной концентрации глюкозы в среде в диапазоне от 50 до 100 г/л (Рисунок 35, Таблица 24).

Таблица 23 – Характеристики процесса получения ЯК из глюкозы ($C_{\text{ГЛЮ}} = 50$ г/л) под действием иммобилизованных клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС, при варьировании их концентрации в среде

Концентрация иммобилизованных клеток <i>A. succinogenes</i> , г сух. в-в/л	2	3	4
Концентрация ИБК $C_{\text{ИБК}}$, г сух. в-в/л	13,3	20	26,7
Длительность получения $S_{\text{ЯК макс}}$, ч	34		32
Максимальная концентрация ЯК $S_{\text{ЯК макс}}$, г/л	$27,1 \pm 0,9$	$37,0 \pm 1,1$	$37,3 \pm 1,1$
Продуктивность процесса по ЯК $Q_{\text{ЯК}}$, г/л/ч	$0,80 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,04$
Продуктивность ИБК $P_{\text{ИБК}}$, г ЯК/ч/кг ИБК	$60,2 \pm 2,0$	$54,5 \pm 1,6$	$43,4 \pm 1,3$
Потребление глюкозы $\Delta C_{\text{ГЛ}}$, %	$74,2 \pm 2,5$	$98,6 \pm 0,9$	$99,4 \pm 0,6$
Степень конверсии потребленной глюкозы в ЯК $Y_{\text{ЯК/ГЛ}}$	$0,73 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,03$

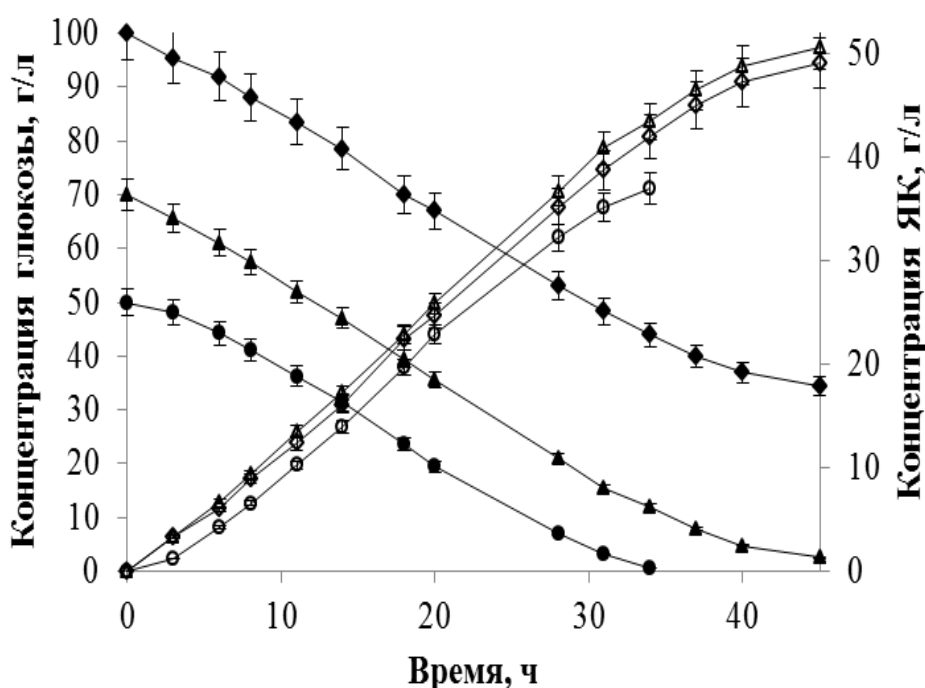


Рисунок 35 – Кинетика потребления глюкозы (черные символы) и накопления в среде ЯК (белые символы) в процессе культивирования иммобилизованных клеток бактерий *A. succinogenes* ($C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л) при различной исходной концентрации глюкозы в среде: 50 (●, ○) и 70 (▲, Δ) 100 (◆, ◇) г/л.

Таблица 24 – Характеристики процесса получения ЯК под действием разработанного ИБК ($S_{\text{ИБК}} = 20$ г сух. в-в/л) на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС, при варьировании исходной концентрации глюкозы в среде

Исходная концентрация глюкозы $S_{\text{ГЛЮ}}$, г/л	50	70	100
Длительность получения $S_{\text{ЯК макс}}$, ч	34	44	
Максимальная концентрация ЯК $S_{\text{ЯК макс}}$, г/л	37,0±1,1	51,3±1,9	49,9±2,1
Продуктивность процесса по ЯК $Q_{\text{ЯК}}$, г/л/ч	1,09±0,03	1,17±0,04	1,13±0,04
Продуктивность ИБК $П_{\text{ИБК}}$, г ЯК/ч/кг ИБК	54,5±1,6	58,5±2,2	56,5±2,3
Потребление глюкозы $\Delta S_{\text{ГЛ}}$, %	98,6±0,9	96,4±0,9	65,5±1,3
Степень конверсии потребленной глюкозы в ЯК $Y_{\text{ЯК/ГЛ}}$	0,75±0,03	0,76±0,03	0,76±0,03

Установлено, что увеличение исходной концентрации глюкозы от 50 до 70 г/л приводит к повышению итоговой концентрации ЯК в среде в 1,4 раза, продуктивности процесса по ЯК и, соответственно, продуктивности ИБК в 1,1 раза. Дальнейшее увеличение концентрации глюкозы до 100 г/л не приводит к повышению эффективности процесса. Таким образом, концентрация глюкозы 70 г/л была выбрана в качестве оптимальной для накопления ЯК иммобилизованными клетками бактерий *A. succinogenes*, взятыми в концентрации 3,0 г сух. в-в/л (концентрация ИБК 20 г сух. в-в/л).

Была исследована возможность многократного использования разработанного ИБК в процессах трансформации глюкозы в ЯК (Рисунок 36, Таблица 25).

Из представленных данных (Рисунок 36) следует, что в периодическом режиме функционирования ИБК во 2-ом цикле продуктивность процесса по ЯК и продуктивность ИБК увеличиваются на 18%, при этом на 6 ч снижается длительность процесса (с 44 ч до 38ч). Это, вероятно, связано с тем, что в 1-ом цикле клеткам в иммобилизованном виде требуется время на адаптацию к новым условиям и на активацию метаболических процессов после процедуры «замораживания-оттаивания». Начиная со 2-го цикла и далее параметры процесса в целом не меняются. Разработанный ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС, способен длительно и эффективно функционировать в процессах получения ЯК, в течение 15 циклов снижение его продуктивности не превышало 5%. Период полуинактивации ИБК составил 1070 ч.

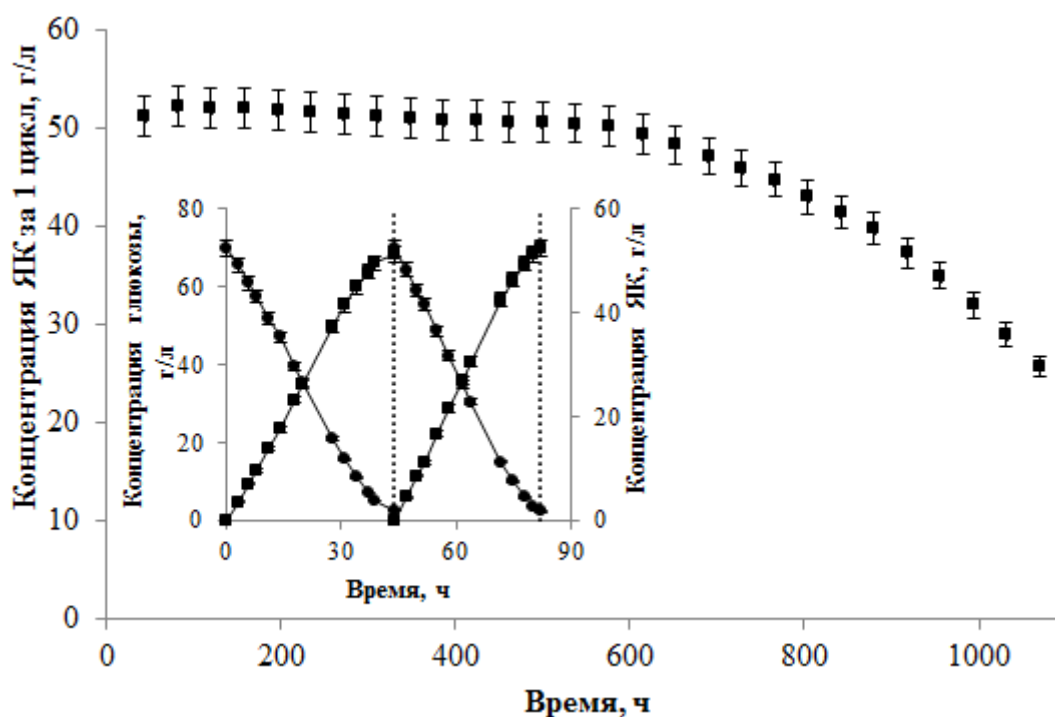


Рисунок 36 – Изменение концентрации ЯК в среде в процессе многократного использования ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* ($C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л). Каждая «точка» соответствует максимальному уровню накопления ЯК в конце каждого периодического цикла. На «врезке» представлена кинетика потребления глюкозы (●) и накопления в среде ЯК (■) в 2-х циклах использования ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* ($C_{\text{ИБК}} = 20$ г сух. в-в/л) при исходной концентрации глюкозы в среде $C_{\text{ГЛ0}}=70$ г/л. Пунктирными линиями на «врезке» отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе на свежую питательную среду

Таблица 25 – Характеристики процесса получения ЯК из глюкозы под действием ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* ($C_{\text{ИБК}} = 20$ г сух. в-в/л) в периодическом режиме

Номер цикла	1	2	15
Длительность цикла, ч	44	38	
Максимальная концентрация ЯК $S_{\text{ЯК макс}}$, г/л	$51,3 \pm 1,9$	$52,3 \pm 2,1$	$50,2 \pm 1,8$
Продуктивность процесса по ЯК $Q_{\text{ЯК}}$, г/л/ч	$1,17 \pm 0,04$	$1,38 \pm 0,05$	$1,32 \pm 0,05$
Продуктивность ИБК $P_{\text{ИБК}}$, г ЯК/ч/кг ИБК	$58,5 \pm 2,2$	$69,0 \pm 2,6$	$66,0 \pm 2,3$
Потребление глюкозы $\Delta C_{\text{ГЛ}}$, %	$96,4 \pm 0,9$	$97,0 \pm 1,1$	$94,4 \pm 2,1$
Степень конверсии потребленной глюкозы в ЯК $Y_{\text{ЯК/ГЛ}}$	$0,76 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,03$

Из полученных результатов следует, что для более точной оценки эффективности функционирования ИБК в биотехнологическом процессе получения ЯК следует принимать во внимание характеристики 2-го цикла, но не 1-го.

Таким образом, 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*: $C_{\text{Глю}}=70$ г/л, $C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л ($C_{\text{БМО}} = 3$ г сух. в-в/л), длительность цикла - 38ч, продуктивность процесса по ЯК $Q_{\text{ЯК}} = 1,38\pm 0,05$ г/л/ч, $C_{\text{ЯК макс}} = 52,3\pm 2,1$ г/л, $Y_{\text{ЯК/ГЛ}} = 0,77\pm 0,03$, период полуинактивации ИБК – 1070 ч.

При сравнении процессов получения ЯК из глюкозы при использовании свободных (см. п. 3.3.2.1) и иммобилизованных клеток можно утверждать, что использование ИБК (учтены показатели 2-го цикла) значительно более эффективно. При этом обеспечивается увеличение показателя длительности возможного эффективного использования продуцента – 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 (Таблица 6), 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.

3.3.2.2.3 Трансформация ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в ЯК под действием ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС

Была исследована возможность конверсии ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в ЯК под действием разработанного ИБК.

Для конверсии в ЯК использовался полученный согласно оптимизированным ранее условиям ферментативный гидролизат механически дезинтегрированной биомассы *C. vulgaris* (см.п.3.2.2). Концентрация ВС в ферментализатах варьировалась в диапазоне от 24,1 до 45,2 г/л благодаря тому, что ферментативному гидролизу подвергалась биомасса *C. vulgaris* в концентрации 50÷100 г сух. в-в/л. Процесс проводился в анаэробных условиях при 37⁰С при концентрации иммобилизованных клеток *A. succinogenes* 3,0 г сух. в-в/л

($C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л), значение рН в гидролизате устанавливалось на уровне $6,8\pm 0,2$ при использовании 2 М раствора Na_2CO_3 и поддерживался на этом уровне введением в среду MgCO_3 (Рисунок 37, Таблица 26).

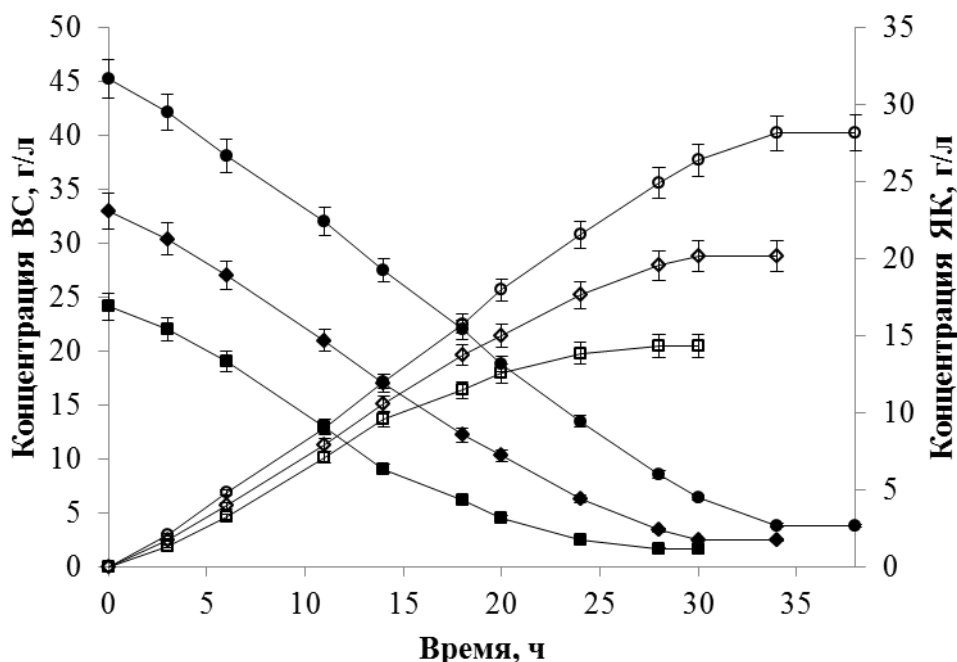


Рисунок 37 – Кинетика потребления ВС (черные символы) и накопления в среде ЯК (белые символы) в процессе конверсии ВС, содержащихся в ферментолізатах биомассы *C. vulgaris* под действием разработанного ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС ($C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л), при различной исходной концентрации ВС, полученных при ферментативном гидролизе биомассы *C. vulgaris*, $C_{\text{БМО}}$: 50 (■, □), 70 (◆, ◇), 100 (●, ○) г сух. в-в/л

Как видно из полученных результатов (Рисунок 37, Таблица 26), увеличение исходной концентрации ВС в среде от 24,1 до 45,2 г/л способствовало повышению продуктивности ИБК и эффективности процесса получения ЯК по показателям скорости (продуктивности) накопления ЯК и степени конверсии ВС в ЯК. Наилучший показатель максимальной концентрации ЯК был получен при исходной концентрации ВС $C_{\text{ВС0}}=45,2\pm 1,7$ г/л, биомассы $C_{\text{БМО}} = 100$ г сух. в-в/л, которая и была выбрана в качестве оптимальной для проведения дальнейших исследований. Увеличение исходной концентрации ВС в среде было сочтено нецелесообразным в связи с наличием ограничений по эффективности предварительного процесса ферментативного гидролиза биомассы *C. vulgaris*, которую необходимо было вводить в реакцию ферментативного гидролиза в концентрации свыше 100 г сух. в-в/л (см. п. 3.2.2).

Таблица 26 – Характеристики процесса получения ЯК из ВС, содержащихся в ферментолізатах биомассы *C. vulgaris* под действием разработанного ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС ($C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л), при варьировании исходной концентрации биомассы *C. vulgaris*, взятой для получения ферментолізатов

Исходная концентрация биомассы <i>C. vulgaris</i> $C_{\text{БМО}}$, г сух. в-в/л	50	70	100		
Исходная концентрация ВС в ферментолізатах $C_{\text{ВС0}}$, г/л	24,1±0,8	33,0±1,2	45,2±1,7		
Исходная концентрация глюкозы в ферментолізатах $C_{\text{ГЛ0}}$, г/л	19,4±0,6	26,0±0,8	33,9±1,2		
Номер цикла	1			2	8
Длительность цикла, ч	28	30	34	28	28
Максимальная концентрация ЯК $C_{\text{ЯК макс}}$, г/л	14,3±0,6	20,1±0,8	28,1±1,1	29,5±1,7	28,0±1,3
Продуктивность процесса по ЯК $Q_{\text{ЯК}}$, г/л/ч	0,51±0,02	0,67±0,03	0,83±0,04	1,05±0,06	1,00±0,04
Продуктивность ИБК $P_{\text{ИБК}}$, г ЯК/ч/кг ИБК	25,5±1,1	33,5±1,3	41,5±1,7	52,5±2,8	50,0±2,2
Потребление глюкозы $\Delta C_{\text{ГЛ}}$, %	99,1±0,9	98,5±1,5	98,0±0,8	98,2±0,6	97,9±0,7
Потребление ВС $\Delta C_{\text{ВС}}$, %	92,9±2,3	92,4±2,6	91,5±2,1	91,2±2,2	91,0±1,9
Степень конверсии потребленных ВС в ЯК $Y_{\text{ЯК/ВС}}$	0,64±0,02	0,66±0,03	0,68±0,03	0,69±0,03	0,68±0,03
Степень конверсии всех углеводов биомассы в ЯК $Y_{\text{ЯК/УГЛ}}$	0,52±0,02	0,52±0,02	0,51±0,02	0,53±0,02	0,50±0,02
Степень конверсии БМ в ЯК $Y_{\text{ЯК/БМ}}$	0,29±0,01	0,29±0,01	0,28±0,01	0,29±0,01	0,28±0,01

Следует отметить, что максимальная концентрация ЯК, полученная при биокаталитической трансформации ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* при использовании ИБК на основе клеток *A. succinogenes* (Таблица 26) оказалась несколько ниже той, что была получена при функционировании разработанного ИБК в глюкозосодержащей питательной среде (Таблица 24), что, очевидно, связано с меньшей исходной концентрацией потребляемых сахаров в среде.

Была исследована возможность многократного использования разработанного ИБК в процессах трансформации ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в ЯК (Рисунок 38, Таблица 26).

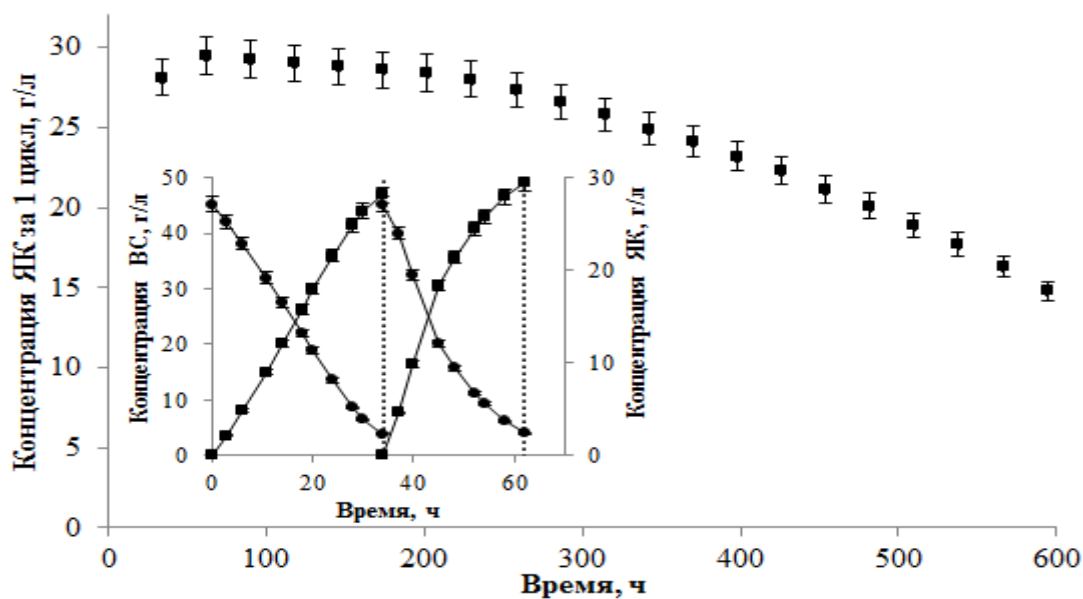


Рисунок 38 – Изменение концентрации ЯК в среде в процессе многократного использования ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* ($C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л). Каждая «точка» соответствует максимальному уровню накопления ЯК в конце каждого периодического цикла. На «врезке» представлена кинетика потребления ВС (●) и накопления в среде ЯК (■) в процессе 2-х циклов использования ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* ($C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л) для получения МК из ферментативных гидролизатов биомассы *C. vulgaris*, полученных при исходной ее концентрации $C_{\text{БМ0}}=100$ г сух. в-в/л. Пунктирными линиями на «врезке» отмечено время замены культуральной жидкости в реакторе на свежую питательную среду

Из представленных данных (Рисунок 38, Таблица 26) следует, что первый цикл культивирования в ферментолизатах биомассы *C. vulgaris* так же, как и в глюкозосодержащей среде, был на 6 ч дольше последующих. Установлено, что разработанный ИБК способен эффективно функционировать в процессе получения ЯК из гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в течение не менее 8 циклов (230 ч) без значительных потерь продуктивности по ЯК (не более 5%). Период полуинактивации ИБК составил 594 ч.

Таким образом, 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% по массе) является оригинальным методом получения ИБК, применение которого позволяет существенно повысить эффективность биотехнологического процесса получения ЯК по основным показателям;

- впервые показана возможность и оптимизированы условия проведения периодического биотехнологического процесса получения ЯК из ферментализатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* при использовании разработанного ИБК на основе иммобилизованных в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes* : $C_{BCO}=45,2\pm 1,7$ г/л, $C_{ИБК}=20$ г сух. в-в/л, длительность цикла - 28ч, продуктивность процесса по ЯК $Q_{ЯК} = 1,05\pm 0,06$ г/л/ч, $C_{ЯК\ макс} = 29,5\pm 1,7$ г/л, $Y_{ЯК/BC} = 0,69\pm 0,03$, период полуинактивации ИБК $ПП_{ИБК} = 594$ ч.

3.3.3 Использование ферментативных гидролизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в качестве субстрата для накопления полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* В-8619

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – перспективные, с точки зрения практического применения, биоразлагаемые полимеры, которые клетки бактерий *Cupriavidus necator* накапливают в составе своей биомассы в качестве запасных веществ [200]. В связи с установленной возможностью использования биомассы микроводорослей вместо традиционно применяемых ЦСС для получения коммерчески значимых продуктов на данном этапе было проведено исследование возможности применения ферментативного гидролизата биомассы микроводорослей *C. vulgaris* для синтеза ПГА бактериями *C. necator* (в работе использовался штамм В-8619, полученный из ВКПМ).

Из литературы известно, что в условиях “богатой” питательной среды, как правило, наблюдается активное деление клеток и синтез в основном азотсодержащих биоорганических веществ (белки, нуклеиновые кислоты) и только в незначительных количествах - резервных макромолекул (ПГА) [200]. Вследствие этого одновременное получение высоких выходов биомассы клеток и накопление в них высокой внутриклеточной концентрации полимера является проблематичным. На сегодняшний день продуктивным признан способ синтеза ПГА, который подразумевает первоначальное накопление биомассы клеток продуцента с последующим ограничением их питания по азоту для накопления ПГА в выросших клетках [201, 202].

В связи с вышесказанным в первую очередь был проведен анализ кинетики роста клеток выбранного для работы штамма *C. necator* В-8619 в синтетических питательных средах с разным источником азота с целью выбора наилучшей из них для эффективного роста клеток без активного накопления ПГА. При проведении экспериментов наблюдалось изменение концентрации биомассы клеток *C. necator* в среде и ПГА в их составе. Процесс велся аэробно при 28⁰С в течение 48 ч с постоянным перемешиванием (180 об/мин). Для

поддержания рН среды $7,0 \pm 0,2$ использовался 2 М раствор КОН (Рисунок 39, Таблица 27).

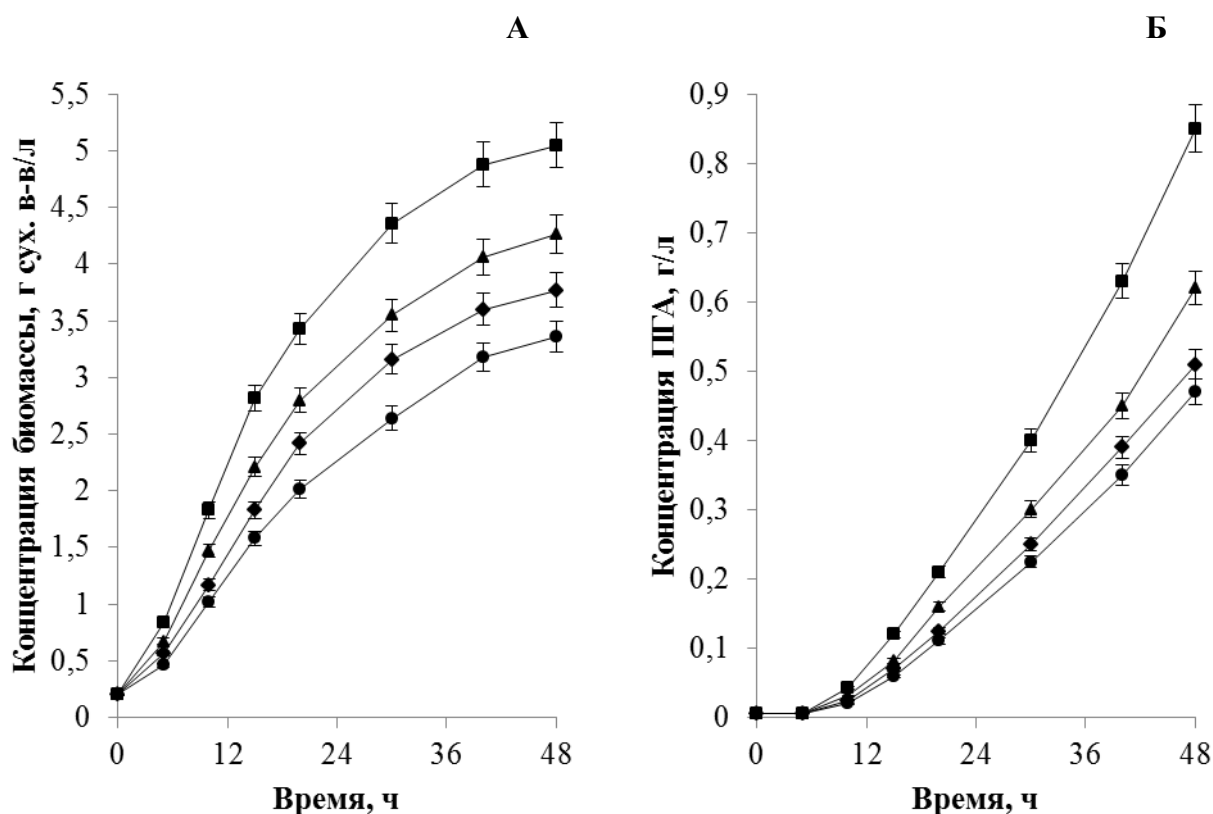


Рисунок 39 – Кинетика накопления биомассы клеток *C. necator* (А) и ПГА в них (Б) при культивировании в различных питательных средах: №1 (◆), №2 (■), №3 (▲), №4 (●). Составы сред указаны в сноске Таблицы 27

Таблица 27 – Характеристики процесса культивирования клеток *C. necator* в различных питательных средах

Питательная среда*	Концентрация биомассы, г сух. в-в/л	Концентрация ПГА, г/л	Внутриклеточное содержание ПГА, %	Средняя скорость накопления биомассы, мг сух. в-в/л/ч
Среда-1	$3,77 \pm 0,14$	$0,51 \pm 0,01$	$13,53 \pm 0,31$	74 ± 3
Среда-2	$5,05 \pm 0,19$	$0,85 \pm 0,03$	$16,83 \pm 0,62$	101 ± 4
Среда-3	$4,26 \pm 0,16$	$0,62 \pm 0,02$	$14,55 \pm 0,52$	84 ± 3
Среда-4	$3,36 \pm 0,12$	$0,47 \pm 0,01$	$13,99 \pm 0,34$	66 ± 2

* Состав питательной Среды-1 (г/л): глюкоза – 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4, KH_2PO_4 – 13,3, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,2, лимонная кислота – 1,7, раствор микроэлементов – 10 мл. Раствор микроэлементов содержит (г/л в 0,1 М HCl): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 10, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,25, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 1,0, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,0, H_3BO_3 – 0,3, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ – 0,1. Составы Сред 2, 3 и 4 аналогичны составу среды 1 за исключением того, что в них вместо $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вводились $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, NH_4Cl и NH_4NO_3 , соответственно.

Как видно из полученных результатов, наибольшая концентрация биомассы клеток *C. necator* и средняя скорость ее накопления наблюдались при культивировании клеток в питательной Среде-2, где источником азота являлась мочеви́на, что коррелировало с ранее известными литературными данными [203, 204]. При этом внутриклеточное содержание ПГА не превышало $16,83 \pm 0,62$ % от сухого веса биомассы. Таким образом, Среда-2, содержащая в качестве источника азота мочеви́ну ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), оказалась наиболее предпочтительной для наращивания биомассы клеток *C. necator*.

Далее для получения ПГА биомасса клеток *C. necator*, накопленная в Среде-2, переносилась в свежую питательную Среду-2, лимитированную по источнику азота и содержащую, как и прежде, 20 г/л глюкозы. Эта концентрация глюкозы была выбрана как наиболее благоприятная для накопления ПГА, исходя из анализа известных литературных данных [202, 205]. С целью исследования влияния исходной концентрации биомассы на общее количество накапливаемого внутриклеточного ПГА исходная концентрация клеток в среде варьировалась от 1,0 до 5,0 г сух. в-в/л (Рисунок 40, Таблица 28).

Установлено, что увеличение начальной концентрации биомассы в среде от 1,0 до 3,0 г сух. в-в/л способствовало повышению итоговой концентрации ПГА в 3,1 раза, а скорости накопления полимера в клетках в 1,3 раза, однако практически не влияло на конечное процентное содержание ПГА в клетках. При увеличении концентрации клеток от 3,0 до 5,0 г сух. в-в/л наблюдалось повышение конечной концентрации ПГА в 1,2 раза; и хотя итоговое внутриклеточное содержание ПГА несколько снижалось (на 7 %), что, очевидно, было связано с нехваткой субстрата (глюкозы) на дальнейший синтез полимера, скорость накопления полимера повышалась в 1,9 раза, что позволило сократить продолжительность эксперимента на 10 ч. В связи с этим именно исходная концентрация клеток $S_{\text{БМО}}=5$ г сух. в-в/л была признана оптимальной и использовалась в дальнейших экспериментах.

Следует отметить, что во всех случаях отмечено именно накопление ПГА в составе биомассы. Концентрация остаточной биомассы, определяемая как разница между концентрациями биомассы с ПГА и отделенного ПГА, практически не изменялась (Таблица 28).

Микроскопирование образцов клеток *C. necator* с различным содержанием ПГА выявило наличие разницы между ними по размерам (Рисунок 41).

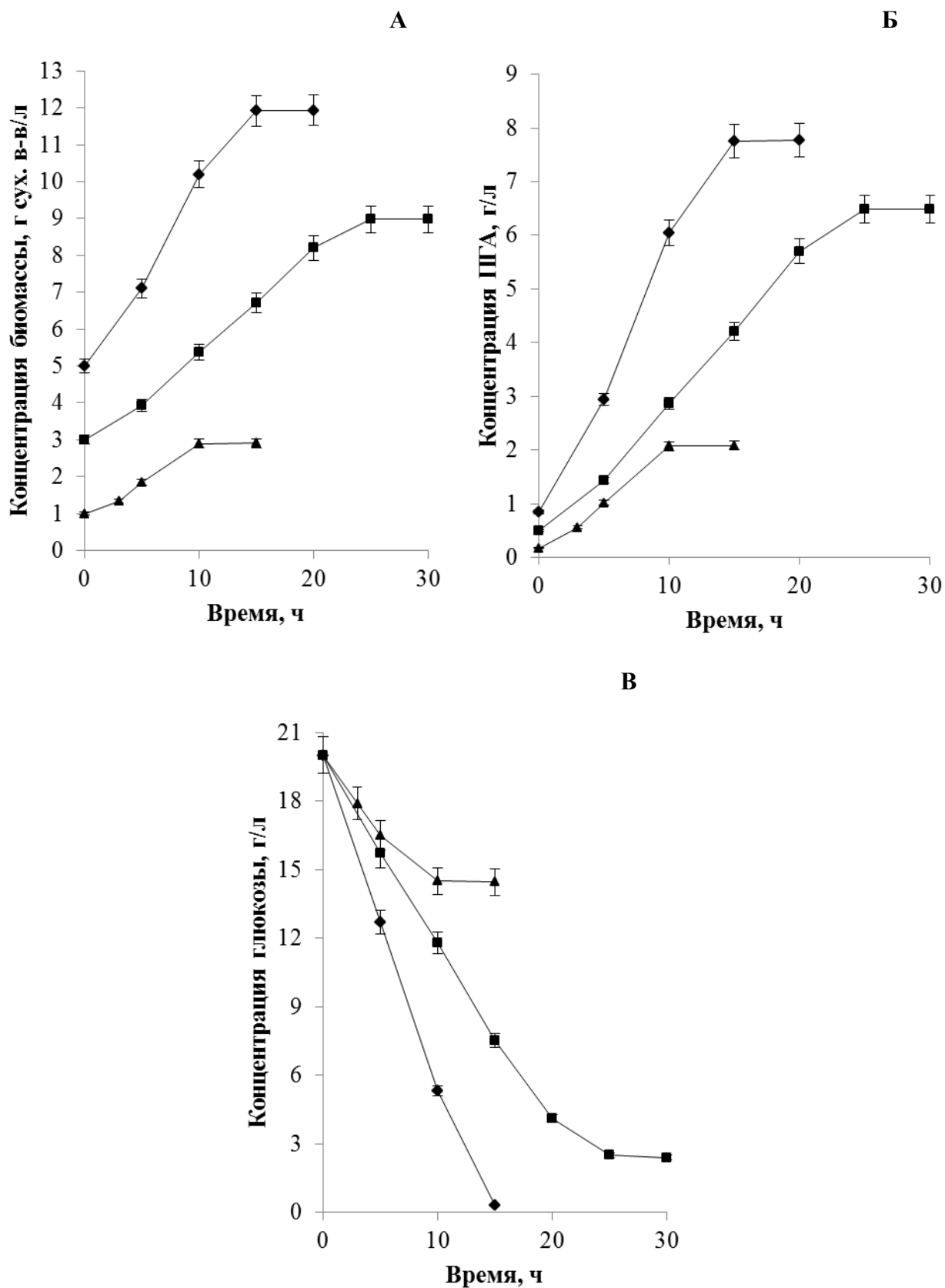


Рисунок 40 – Кинетика накопления биомассы клеток *C. necator* (А) и ПГА в них (Б), и потребления глюкозы (В) в среде, лимитированной по источнику азота, при различной исходной концентрации клеток в среде: 1,0 (▲), 3,0 (■), 5 (◆) г сух. в-в/л

Таблица 28 – Характеристики процесса накопления ПГА клетками *C. necator* при варьировании исходной концентрации клеток и глюкозы в Среде-2, лимитированной по источнику азота

Исходная концентрация глюкозы C _{Глю} , г/л	20			30	50
Исходная концентрация биомассы <i>C. necator</i> , г сух. в-в/л	1,0	3,0	5,0		
Длительность процесса, ч	10	25	15	20	
Потребление глюкозы Δ C _{Гл} , %	27,5±0,8	87,5±1,3	98,5±1,5	64,3±1,2	33,0±1,0
Максимальная концентрация биомассы <i>C. necator</i> , г сух. в-в/л	2,90±0,10	8,98±0,33	11,92±0,48	11,65±0,45	10,68±0,41
Максимальная концентрация ПГА C _{ПГА} , г/л	2,07±0,06	6,48±0,19	7,76±0,21	7,49±0,21	6,52±0,18
Внутриклеточное содержание ПГА, %	71,38±2,13	72,16±2,14	65,10±1,81	64,29±1,84	61,05±2,32
Средняя скорость накопления биомассы Q _С , мг сух. в-в/л/ч	190±5	239±7	461±12	332±9	284±8
Средняя скорость накопления ПГА Q _{ПГА} , мг/л/ч	190±5	239±7	461±12	332±9	284±8

Клетки, содержащие незначительную (до ~16 %) концентрацию ПГА, имели размер от 1,0 до 3,0 мкм. При увеличении концентрации ПГА в клетках до 65÷70 % было заметно их увеличение в размере, который варьировался в пределах 4÷8 мкм, при этом в единичных случаях встречались «гигантские» клетки длиной до 15÷20 мкм. Поскольку известно, что размер клеток часто зависит от их возраста, то результаты микроскопирования лишней раз подтверждали факт того, что в выросших клетках происходило накопление ПГА без их активного роста.

Было исследовано также влияние исходной концентрации глюкозы в среде на эффективность накопления ПГА в заранее выращенных клетках *C. necator* в среде, лимитированной по источнику азота (Рисунок 42, Таблица 28).

Установлено, что наибольшая итоговая концентрация ПГА и максимальное значение средней скорости накопления полимера наблюдались при исходной концентрации глюкозы в среде 20 г/л, которая, таким образом, оказалась оптимальной для исследуемого процесса (Таблица 28). Более высокая начальная концентрация глюкозы в среде, вероятно, ингибировала процесс накопления ПГА, способствуя появлению 3-5 часовой лаг-фазы. При этом потребление глюкозы и итоговая концентрация ПГА уменьшались.

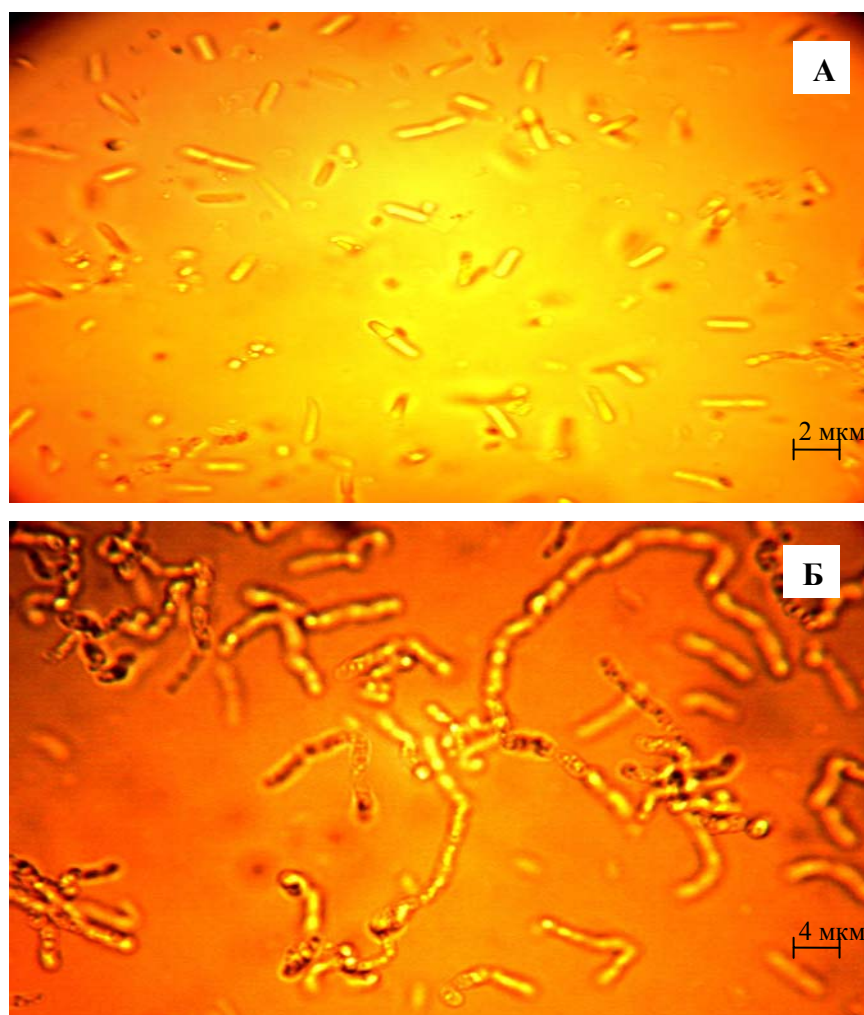


Рисунок 41 (А) – Внешний вид клеток *C. necator* В-8619, полученных при культивировании в Среде-2, не лимитированной по источнику азота (содержание ПГА до 16 %), и (Б) клеток *C. necator* В-8619, накопивших ПГА при культивировании заранее выращенных клеток и внесенных в Среду-2, лимитированную по источнику азота (содержание ПГА до 72 %) (Б). Микроскоп Биомед (Россия) с насадкой БиомедЛюм206070112209 и цифровой камерой для микроскопа Myscore 500М (увеличение в 100 раз)

Таким образом, на примере синтетических глюкозосодержащих питательных сред при использовании подхода, основанного на предварительном выращивании клеток на азот-содержащей питательной среде с последующим их переносом в среду, лимитированную по источнику азота, была показана возможность и оптимизированы условия накопления ПГА ($C_{\text{ПГА}} = 7,76 \pm 0,21$ г/л, $Q_{\text{ПГА}} = 461 \pm 12$ мг/л/ч) в составе биомассы клеток *C. necator* ($C_{\text{БМ0}} = 5,0$ г сух. в-в/л, $C_{\text{ГЛО}} = 20$ г/л) в течение 15 ч.

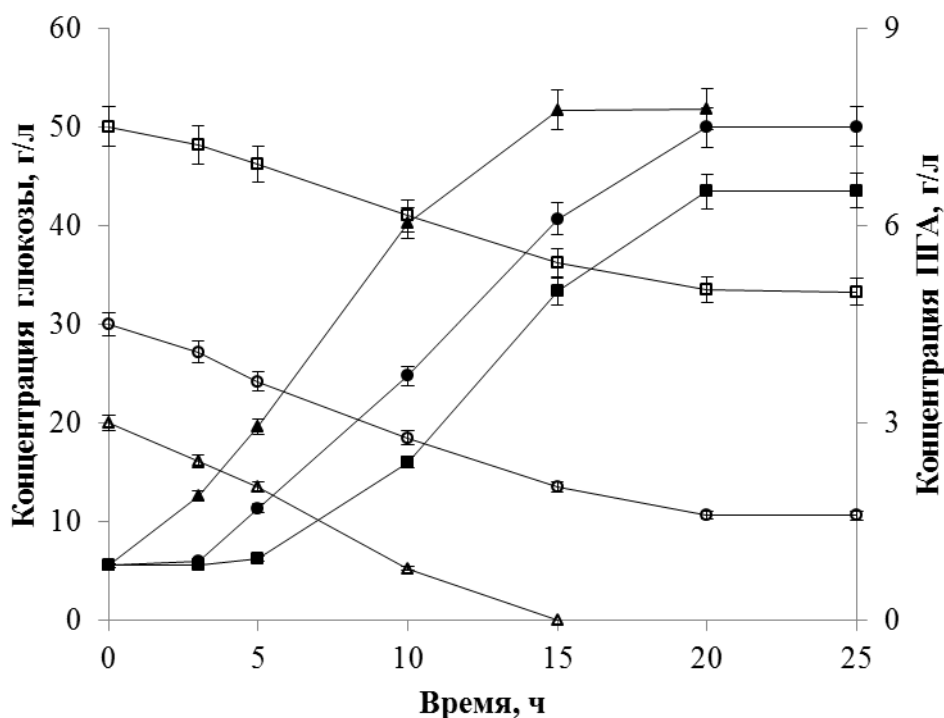


Рисунок 42 – Кинетика потребления глюкозы (белые символы) и накопления ПГА клетками *C. necator* (черные символы) в Среде-2, лимитированной по источнику азота, при различной исходной концентрации глюкозы: 20 (Δ , \blacktriangle), 30 (\circ , \bullet), 50 (\square , \blacksquare) г/л (исходная концентрация клеток в среде 5,0 г сух. в-в/л)

Наиболее интересным и значимым, с практической точки зрения, представлялось исследование возможности получения ПГА с использованием такого возобновляемого сырья, как биомасса микроводорослей. Ранее этого никто не делал. Следует отметить, что приготовить среду для культивирования клеток *C. necator*, продуцирующих ПГА, с применением биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в качестве источника глюкозы при концентрации последней 20 г/л достаточно просто. Поэтому следующим этапом работы было исследование возможности использования ферментолизата биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в качестве основного компонента питательной среды для получения ПГА.

При проведении всех этих экспериментов клетки бактерий *C. necator*, выращенные в питательной Среде-2, переносились в жидкую фазу ферментативного гидролизата биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, отделенную от осадка центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин). Для поддержания рН $7,0 \pm 0,2$ в такой среде в процессе культивирования клеток *C. necator* использовался 2 М раствор КОН. С целью выбора наиболее благоприятных условий проведения эксперимента было рассмотрено влияние исходной концентрации биомассы *C. vulgaris*, взятой для приготовления ферментоллизатов, на эффективность

процесса накопления ПГА. Для исследований был выбран диапазон концентраций биомассы *C. vulgaris* 30-70 г сух. в-в/л, обеспечивающих получение ферментолизатов, содержащих концентрации ВС, близкие к значению 20 г/л. Начальная концентрация клеток *C. necator* в отцентрифугированных ферментолизатах была 5,0 г сух. в-в/л (Рисунок 43, Таблица 29).

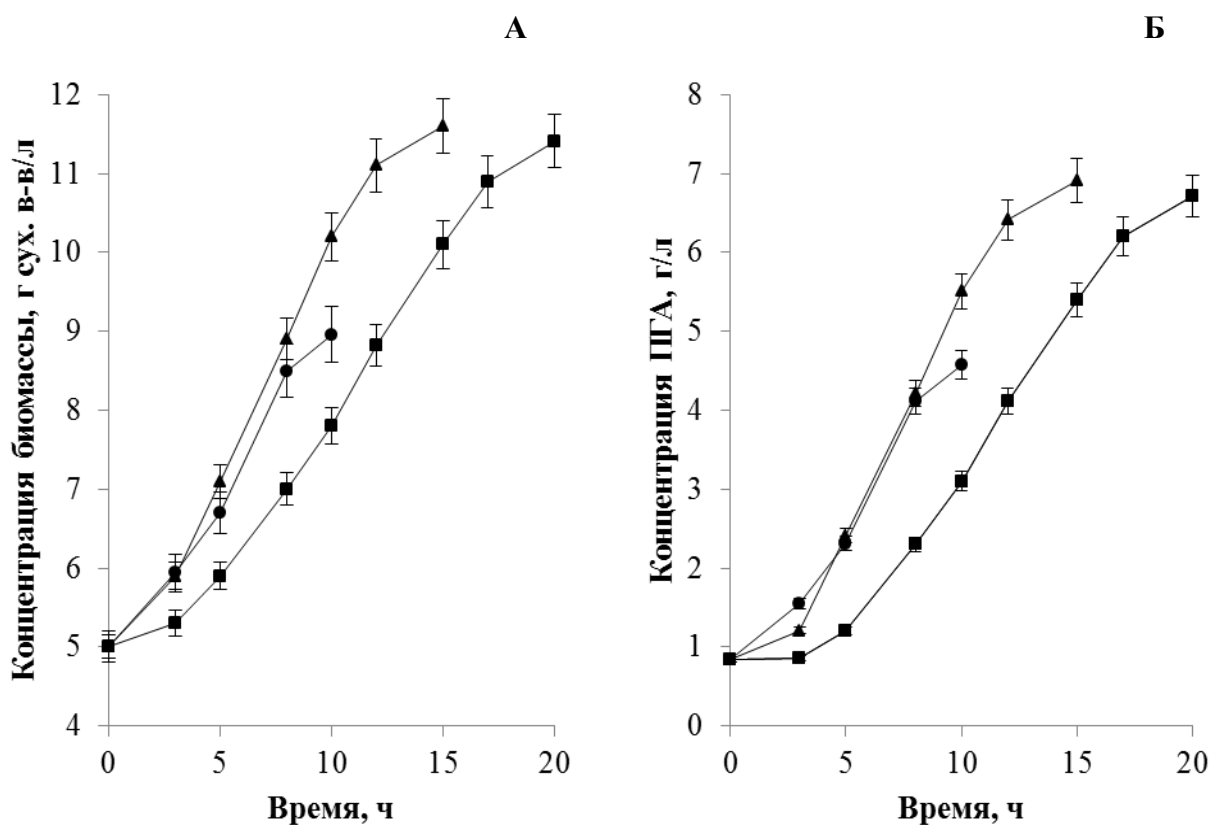


Рисунок 43 – Кинетика накопления биомассы клеток *C. necator* (А) и ПГА в них (Б) при использовании отцентрифугированных ферментолизатов биомассы *C. vulgaris*, полученных при различной ее исходной концентрации: 30 (●), 50 (▲), 70 (■) г сух. в-в/л

Из полученных результатов видно, что при увеличении исходной концентрации ВС от 14,7 до 24,1 г/л (Таблица 29) в составе ферментолизатов биомассы *C. vulgaris* наблюдалось повышение суммарной концентрации ПГА в 1,5 раза, внутриклеточного содержания ПГА – в 1,2 раза и средней скорости накопления полимера – в 1,1 раза. Дальнейшее увеличение исходной концентрации ВС до 33,0 г/л в составе ферментолизатов биомассы *C. vulgaris* не приводило к повышению получаемой суммарной концентрации ПГА и, соответственно, внутриклеточного содержания ПГА, кроме того при этом наблюдалось появление 3-4 ч лаг-фазы в начале культивирования клеток *C. necator*.

Таблица 29 – Характеристики процесса накопления ПГА клетками *C. necator* в среде с гидролизованной биомассой *C. vulgaris* при варьировании ее исходной концентрации в среде

Исходная концентрация биомассы <i>C. vulgaris</i> , взятой для получения ферментоллизатов, г сух. в-в/л	30	50	70
Исходная концентрация ВС в ферментоллизатах S_{BCO} , г/л	14,70±0,41	24,10±0,85	33,00±1,18
Исходная концентрация глюкозы в ферментоллизатах $S_{ГЛО}$, г/л	11,88±0,3	19,40±0,58	25,98±0,85
Длительность процесса, ч	10	15	20
Максимальная концентрация биомассы <i>C. necator</i> , г сух. в-в/л	8,96±0,34	11,60±0,45	11,41±0,40
Максимальная концентрация ПГА $S_{ПГА}$ 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 биомассы Q_C , мг сух. в-в/л/ч	396±10	440±13	320±9
Средняя скорость накопления ПГА $Q_{ПГА}$, мг/л/ч	373±10	405±12	294±8

Таким образом, наиболее целесообразным оказалось в исследуемом процессе использовать ферментоллизаты, полученные из биомассы микроводорослей *C. vulgaris* с исходной её концентрацией 50 г сух. в-в/л.

Микроскопирование образцов клеток *C. necator*, накопивших ПГА при культивировании в отцентрифугированных ферментоллизатах биомассы *C. vulgaris* (Рисунок 44), показало их морфологическую схожесть с клетками, накапливающими ПГА при их культивировании в питательной среде с чистой глюкозой (Рисунок 41 Б).

Следует отметить, что данных об использовании гидролизатов микроводорослей для получения ПГА в литературе не обнаружено, то есть впервые в данной работе была показана принципиальная возможность их применения в качестве среды для накопления ПГА клетками *C. necator*.

Сравнение полученных результатов с имеющимися в литературе данными (Таблица 8) для процессов накопления ПГА клетками *C. necator* при использовании в качестве исходного сырья различных гидролизатов и отходов производств, позволило заключить, что гидролизаты биомассы микроводорослей *C. vulgaris* могут являться приемлемым компонентом сред, предназначенных для получения ПГА.

Таким образом, подводя итоги исследований процессов получения ПГА из ферментоллизатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, можно сделать следующие выводы:

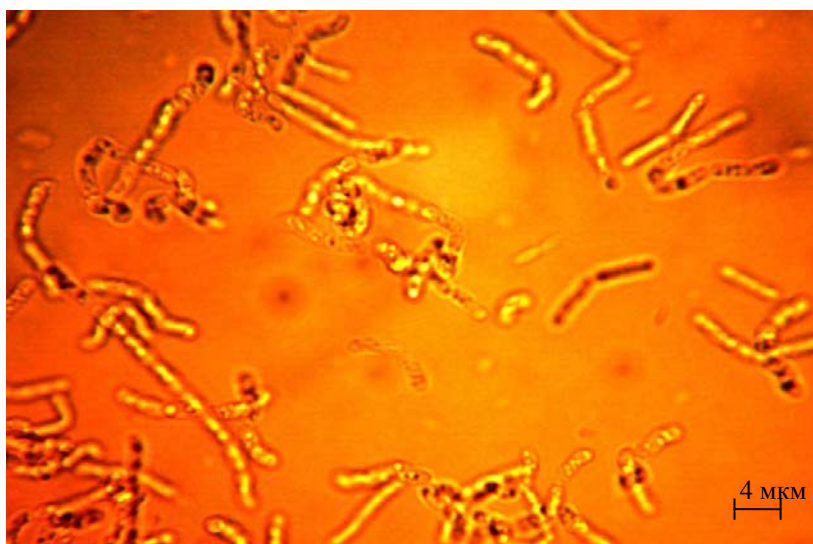


Рисунок 44 – Внешний вид бактерий *C. necator* В-8619, накопивших ПГА при культивировании в отцентрифугированных ферментолізатах на основе биомассы *C. vulgaris*. Микроскоп Биомед (Россия) с насадкой БиомедЛюм206070112209 и цифровой камерой для микроскопа Myscore 500М (увеличение в 100 раз)

- для получения ПГА в составе биомассы штамма *C. necator* В-8619 эффективным оказалось предварительное выращивание биомассы на азотсодержащей питательной среде с последующим ее переносом в среду, лимитированную по источнику азота, в качестве которого наилучшим образом может использоваться мочевины в концентрации 4г/л;

- оптимизированы условия накопления ПГА ($C_{\text{ПГА}} = 7,76 \pm 0,21$ г/л, $Q_{\text{ПГА}} = 405 \pm 12$ мг/л/ч) в составе биомассы клеток *C. necator* ($C_{\text{БМО}} = 5,0$ г сух. в-в/л) в течение 15 ч при культивировании их в синтетической глюкозосодержащей питательной среде ($C_{\text{ГЛО}} = 20$ г/л);

- впервые установлено, что перспективной основой сред для биотехнологического получения ПГА в составе биомассы клеток *C. necator* является ферментолізат биомассы микроводорослей;

- оптимизированы условия получения ПГА ($C_{\text{ПГА}} = 6,91 \pm 0,20$ г/л, $Q_{\text{ПГА}} = 440 \pm 13$ мг/л/ч) в составе биомассы клеток *C. necator* ($C_{\text{БМО}} = 5,0$ г сух. в-в/л) в течение 15 ч, при использовании ферментолізата биомассы микроводорослей *C. vulgaris* в качестве среды культивирования ($C_{\text{ВСО}} = 24,10 \pm 0,85$ г/л).

Полученные результаты биотехнологического процесса накопления ПГА в клетках *C. necator* в установленных условиях превосходят известные из литературы данные (Таблица 8) по использованию разных гидролизатов и отходов производства для накопления ПГА в 4,6-17,6 раза по показателю скорости процесса.

3.4 Оценка научно-практического потенциала полученных в данной работе результатов

Дополнительно в ходе данной работы было решено исследовать возможность применения разработанного способа иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* в отношении клеток других фототрофных микроорганизмов и разработанного ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* для получения ЯК из гидролизатов различного возобновляемого сырья. Помимо этого несомненный интерес представляло собой исследование возможности утилизации биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, использованных в процессах получения органических кислот из ферментолитов биомассы микроводорослей *C. vulgaris*. Результаты, полученные в этих исследованиях, представлены в данном разделе.

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

Показано, что разработанный ранее (см. п. 3.1.2) способ иммобилизации клеток микроводорослей *C. vulgaris* может успешно применяться с целью их криоконсервации для длительного хранения (в течение 1,5 лет) практически без снижения уровня их жизнеспособности (Таблица 30).

Для выяснения потенциальной универсальности разработанного способа иммобилизации он был апробирован также для клеток других фототрофных микроорганизмов. В Таблице 30 для каждого микроорганизма указаны подобранные оптимальные условия проведения иммобилизации и жизнеспособность микроорганизмов в результате криохранения в течение 1,5 лет.

В Таблице 31 приведено сравнение разработанного способа иммобилизации с существующими аналогами, описанными в литературном обзоре [69, 70].

Следует отметить, что в сравнении с аналогом [69], предполагающим проведение иммобилизации клеток диатомовых микроводорослей *Haslea ostrearia* в Са-альгинатный гель, пропитывание их раствором 0,7 М сахарозы, используемой в качестве криопротектора, замораживание при -80 °С и хранение в среде жидкого азота, а также в сравнении с аналогом [70], предполагающим первоначально иммобилизацию клеток цианобактерий *Rivularia aquatica*, *Gloeotrichia echinulata* в Са-альгинатный гель с последующим их замораживанием и хранением при -20 °С, существенным отличием разработанного способа иммобилизации и криоконсервации является проведение процесса замораживания в одну стадию с включением

клеток фототрофных микроорганизмов в криогель полимера, способного выполнять роль криопротектора.

Таблица 30 – Характеристики процесса иммобилизации клеток различных фототрофных микроорганизмов в криогель ПВС (-70°C)

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

Такой способ обеспечивает высокий уровень сохранения жизнеспособности клеток разных микроводорослей (в среднем 90÷95 %) как после размораживания клеток сразу после их замораживания, так и после длительного их хранения в замороженном состоянии (в течение, как минимум, 1,5 лет). Кроме того, поскольку ПВС, выполняющий функции криопротектора, практически не подвержен микробному разложению, то снижается опасность контаминации криоконсервируемого материала посторонними микроорганизмами и не требуется соблюдения столь строгих норм стерильности при подготовке и хранении

материала, как в случае использования Са-альгинатного геля в качестве носителя.

Таблица 31 – Сравнение основных характеристик различных способов иммобилизации фототрофных микроорганизмов

Вид фототрофных микроорганизмов	Диатомовые микроводоросли <i>Haslea ostrearia</i>	Цианобактерии <i>Rivularia aquatica</i> , <i>Gloeotrichia echinulata</i>	Различные фототрофные микроорганизмы
Вид иммобилизации	Иммобилизация в Са-альгинатный гель		Иммобилизация в криогель ПВС
Режим замораживания	Двухстадийный -80 ⁰ С / -196 ⁰ С	Одностадийный	Одностадийный
Температура хранения, ⁰ С	-196	-20	-70
Криопротектор	0,7 М сахара	нет	нет
Жизнеспособность клеток в образце, %	77 (после 48 ч криохранения)	47-49 (после 1 г криохранения)	90-95 (после 1,5 лет криоконсервации и криохранения)
Ссылка	[69]	[70]	Данная работа

Разработанный способ не требует использования специального низкотемпературного и термоизолирующего, как в случае с жидким азотом, оборудования для хранения образцов клеток при их криоконсервации, что позволяет хранить большие объемы замороженного материала.

Впервые было показано, что предложенный способ иммобилизации и криоконсервации пригоден для широкого спектра клеток фототрофных микроорганизмов – зеленых, сине-зеленых, красных и диатомовых микроводорослей (Таблица 30). Следует отметить, что полученные результаты могут иметь огромное практическое значение, в частности, при создании и хранении коллекций указанных микроорганизмов.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что разработанный новый способ иммобилизации, заключающийся в иммобилизации клеток путем их включения в криогель ПВС, универсален и может успешно применяться для широкого спектра клеток фототрофных микроорганизмов. Одно из основных преимуществ разработанного способа заключается в том, что он обеспечивает длительный срок хранения клеток (не менее 1,5 лет) при сохранении их жизнеспособности на 90-95%.

Полученные результаты являются абсолютно конкурентоспособными по сравнению с

аналогами, имеют высокую научную и практическую значимость и могут быть использованы для хранения большого количества биоматериала, а также при разработке технологии очистки сточных вод, альтернативной традиционно используемой на основе активного ила.

Результаты, изложенные в этом разделе работы, послужили основой для получения Патента РФ на изобретение № 2508397 «Способ криоконсервации клеток фототрофных микроорганизмов», который подтвердил оригинальность, новизну и преимущества разработанного подхода к получению иммобилизованных форм клеток различных микроводорослей.

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

Было решено исследовать возможность универсального использования разработанного ИБК на основе клеток бактерий *A. succinogenes* для получения ЯК из гидролизатов различного возобновляемого сырья. В результате исследований впервые была показана принципиальная возможность эффективной биотрансформации в ЯК гидролизатов биомассы различных видов фототрофных микроорганизмов, а также макроводорослей и различных образцов ЦСО под действием разработанного ИБК (Таблица 32).

Информации относительно получения ЯК из возобновляемого сырья под действием иммобилизованных клеток бактерий *A. succinogenes* в литературе не найдено. Сравнение полученных результатов с известными из литературы данными по получению ЯК из гидролизатов аналогичного сырья с использованием свободных клеток бактерий *A. succinogenes* (Таблица 6) позволяет заключить, что использование разработанного ИБК для конверсии гидролизатов пшеничной соломы в ЯК обеспечивает увеличение показателя $S_{ЯК\max}$ в 1,8 раз, показателя $Q_{ЯК}$ – в 2,7 раз.

Иммобилизация клеток обеспечивает возможность значительного увеличения длительности эффективного использования одной и той же биомассы: для процессов конверсии гидролизатов пшеничной соломы - в 12,5 раз ([146], Таблица 6), для процессов конверсии гидролизатов багассы – в 25 раз ([150], Таблица 6), при этом достигается увеличение показателя суммарного количества ЯК, которое можно получить при использовании 1 г сух. в-в биомассы клеток бактерий *A. succinogenes*: для процессов конверсии гидролизатов пшеничной соломы - с 12,7 до 165 г ЯК/г сух. в-в биомассы, то есть в 13 раз, а для процессов конверсии гидролизатов багассы - с 22,5 до 116 г ЯК/г сух. в-в биомассы, то есть в 5 раз.

Таблица 32 - Характеристики процессов трансформации гидролизатов различных видов возобновляемого сырья в ЯК под действием ИБК (С_{ИБК}=20 г сух. в-в/л) на основе клеток бактерий *A. succinogenes*, включенных в криогель ПВС

Гидролизат	С _{ВСО} , г/л	ΔС _{ВСО} , %	С _{ЯК} , г/л	У _{ЯК/ВСО}	Q _{ЯК} , г/л/ч	ПП _{ИБК} , ч	П _{ИБК} , г ЯК/ч/кг ИБК
ЦСО							
Пшеничная солома	66,4±2,6	74,8±1,9	33,7±1,3	0,68±0,02	1,06±0,03	600	52,8±2,5
Рисовая солома	66,5±2,1	78,8±2,1	31,4±1,5	0,60±0,03	1,08±0,03	420	53,9±2,3
Багасса	32,0±1,3	96,2±3,0	19,7±0,7	0,64±0,02	0,70±0,01	600	35,2±1,4
Свекловичный жом	44,2±1,8	95,2±1,3	23,9±1,2	0,57±0,03	1,01±0,01	410	50,3±2,1
Осиновые опилки	64,2±2,9	78,3±1,4	29,6±1,6	0,59±0,03	1,08±0,03	396	54,2±2,5
Березовые опилки	58,4±2,5	86,8±2,1	30,8±1,3	0,61±0,03	1,04±0,02	420	52,2±2,3
Сосновые опилки	64,8±2,3	75,8±1,3	29,4±1,2	0,60±0,03	1,07±0,03	396	53,7±2,6
Клубни топинамбура	74,6±3,2	51,6±1,0	16,2±1,1	0,42±0,01	0,63±0,01	596	31,5±1,1
Стебли топинамбура	62,2±1,9	57,1±1,2	15,3±0,9	0,43±0,02	0,70±0,02	476	34,9±1,6
Фототрофные микроорганизмы							
<i>Arthrospira platensis</i>	36,7±1,1	82,3±2,1	18,7±0,7	0,62±0,02	0,66±0,01	424	33,0±1,1
<i>Cosmarium sp.</i>	52,5±1,7	89,7±2,5	31,1±1,3	0,66±0,02	1,11±0,03	536	55,5±2,1
<i>Dunaliella salina</i>	62,3±2,1	57,8±0,8	29,9±1,0	0,51±0,01	0,66±0,01	490	33,0±1,0
<i>Nannochloropsis sp.</i>	51,1±1,9	88,9±2,6	20,1±1,3	0,66±0,02	1,07±0,03	408	53,5±2,2
<i>Nostoc sp.</i>	47,3±1,1	72,1±1,8	15,4±0,6	0,59±0,02	0,77±0,02	432	38,7±1,6
Макроводоросли							
<i>Laminaria saccharina</i>	36,6±1,1	82,8±2,8	15,7±0,7	0,52±0,01	0,61±0,01	552	30,3±1,3
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	56,0±1,5	70,2±2,3	21,6±1,3	0,55±0,02	0,77±0,02	600	38,6±1,7
<i>Ulva lactuca</i>	24,1±0,8	85,5±1,8	10,1±0,4	0,49±0,01	0,44±0,01	504	21,9±0,9

Таким образом, из полученных результатов следуют выводы:

- 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), включая биомассу *C. vulgaris*, при этом в зависимости от сырья при $C_{\text{ИБК}}=20$ г сух. в-в/л, основные показатели процесса за 1 цикл лежат в диапазонах: $S_{\text{ЯКмакс}} = 10 \div 34$ г/л, $Y_{\text{ЯК/ВС}} = 0,42 \div 0,68$, $Q_{\text{ЯК}} = 0,44 \div 1,11$ г/л/ч, $P_{\text{ИБК}} = 21,9 \div 55,5$ г ЯК/ч/кг ИБК;

- возможность эффективной реализации биотехнологического процесса получения ЯК из гидролизатов биомассы фототрофных микроорганизмов, макроводорослей и некоторых видов ЦСО (свекловичного жома, древесных опилок, клубней и стеблей топинамбура) при использовании клеток бактерий *A. succinogenes* продемонстрирована в данной работе впервые;

- разработанный ИБК может длительно использоваться в периодическом процессе получения ЯК из возобновляемого сырья, период его полуинактивации в зависимости от исходного сырья составляет $ПП_{\text{ИБК}}=396 \div 600$ ч, длительность его эффективного функционирования многократно превышает лучшие из известных аналогов;

- предложенная в данной работе стратегия получения ЯК из различных видов возобновляемого сырья с использованием ИБК, заключающаяся в создании в реакционной среде высоких концентраций биомассы продуцента (3 г сух. в-в/л) за счет иммобилизации в криогель ПВС и реализуемая возможность длительного ее использования, позволила в 5-13 раз интенсифицировать биотехнологический процесс получения ЯК из целлюлозосодержащего сырья по показателю суммарного количества ЯК, которое можно получить при использовании 1 г сух. в-в биомассы клеток бактерий *A. succinogenes* в сравнении с известными из литературы данными (Таблица 6).

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

При проведении процессов конверсии ВС, содержащихся в ферментолизатах биомассы *C. vulgaris*, в органические кислоты образуется ряд нерастворимых твердых отходов: негидролизуемые остатки биомассы микроводорослей, отделяемые от ферментоллизатов, а также использованные ИБК на основе клеток бактерий и мицелиальных грибов.

Ранее в лаборатории эковиокатализа МГУ имени М.В. Ломоносова, где была выполнена эта работа, была продемонстрирована возможность реутилизации ИБК на основе

бактериальных клеток и криогеля ПВС путем нагрева гранул при 108°C в течение 20 мин для расплавления криогеля, термолиза иммобилизованных клеток и получения раствора ПВС, обогащенного остатками термолизированных бактериальных клеток [206]. Было показано, что такой раствор полимера может быть успешно использован вновь для иммобилизации клеток бактерий.

Ранее также было показано, что утилизация остатков биомассы фототрофных микроорганизмов может быть реализована в процессе метаногенеза. При этом процент конверсии такой биомассы в метан может достигать 55÷69% [13, 207, 208].

Что касается утилизации биомассы грибного мицелия – отхода многих биотехнологических производств, то эта проблема остаётся на сегодняшний день практически нерешённой [209]. Известно, что свободный грибной мицелий после специальной предобработки может быть использован в качестве сорбента для ионов различных металлов, удобрения в сельском хозяйстве [210-212].

Что касается утилизации иммобилизованной биомассы мицелиальных грибов, то здесь предложений крайне мало. Так, ранее было установлено, что биомасса иммобилизованных клеток мицелиальных грибов после применения в процессах очистки сточных вод может быть использована для получения метана, при этом процент конверсии может достигать 31,4 % [111]. Таким образом, применение процесса метаногенеза для утилизации биомассы мицелиальных грибов оказалось возможным, но существенно менее эффективным, чем в случае биомассы клеток микроводорослей.

Здесь следует отметить, что в ходе разработанных в данной работе процессов получения МК и ФК из ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* под действием ИБК на основе клеток разных штаммов мицелиальных грибов *R. oryzae* на каждую тонну МК и ФК, соответственно, накапливается до 100-110 кг (по сухому весу) использованных ИБК на основе клеток мицелиальных грибов в виде отходов, подлежащих утилизации. В этой связи вопрос утилизации иммобилизованной биомассы мицелиальных грибов после получения МК и ФК является актуальным.

Анализ литературы показал, что сорбционная способность поверхности клеток мицелиальных грибов довольно высока по отношению к разным химическим соединениям, а также к отдельным видам клеток микроорганизмов [213]. На предположение о том, что клетки мицелиальных грибов, в том числе находящиеся в иммобилизованном состоянии, могут обладать хорошей сорбционной способностью и по отношению к клеткам микроводорослей, натолкнул тот факт, что отдельные грибы способны вступать в формирование сложных симбиотических взаимоотношений с микроводорослями и длительно сосуществовать с ними в таких отношениях, формируя в том числе лишайники, а

начало этих взаимоотношений начинается с адсорбции клеток микроводорослей на клеточной стенке грибов [213]. Исходно предполагалось при этом, что сорбирувавшиеся на мицелии клетки микроводорослей могли, таким образом, «обогатить» грибные отходы биоорганическими веществами (прежде всего липидами), которые бы способствовали повышению уровня выхода метана в случае утилизации биомассы мицелиальных грибов.

В этой связи в данной работе впервые была исследована возможность биосорбции клеток микроводорослей *C. vulgaris* с использованием в качестве «сорбента» гранул ИБК на основе клеток мицелиальных грибов, «отработанных» в процессах получения органических кислот (Рисунок 45).

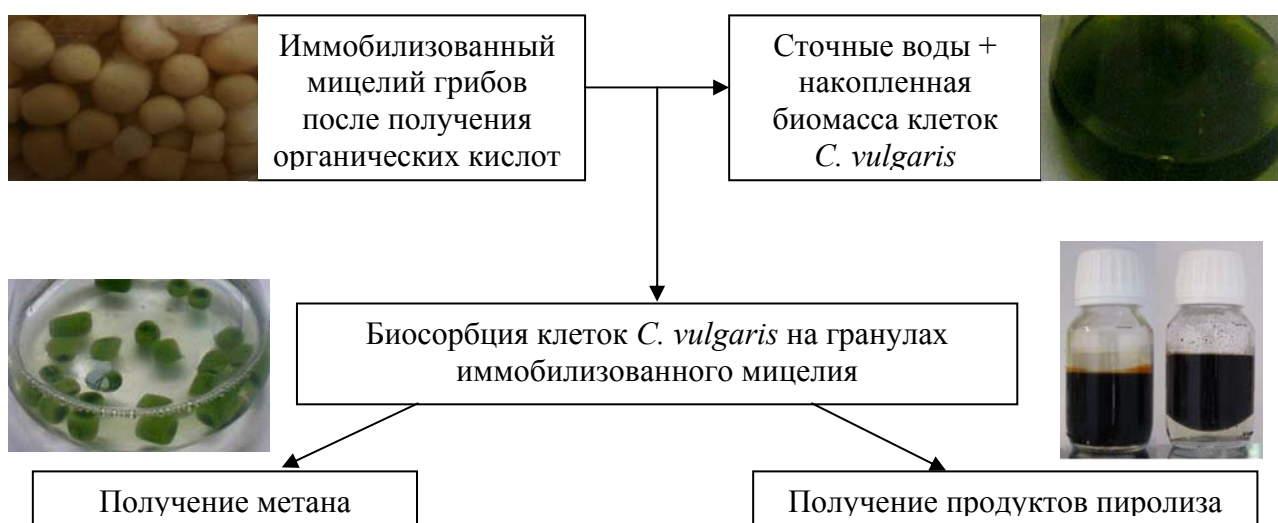


Рисунок 45 – Схема получения сорбированной на иммобилизованном грибном мицелии биомассы клеток *C. vulgaris* и ее конверсии в различные виды биотоплива

В исследованиях применялись ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae*, которые до этого использовались в процессах получения органических (молочной и фумаровой) кислот из ферментолитатов биомассы микроводорослей *C. vulgaris* (Рисунок 46). Были протестированы оба штамма мицелиальных грибов на способность сорбировать клетки микроводорослей, поскольку они отличались морфологией мицелия. Для этого в сточные воды с накопленной биомассой клеток *C. vulgaris* вносились гранулы ИБК на основе иммобилизованных клеток мицелиальных грибов так, что концентрация биомассы микроводорослей и гранул ИБК была по 1,7 г сух. в-в/л. Процесс биосорбции проводился при 28°C и 180 об/мин в течение 24 ч.

Очевидно, что основной процесс сорбции клеток микроводорослей *C. vulgaris* проходил в течение первых 6 ч, к 12-ому часу он практически завершался.

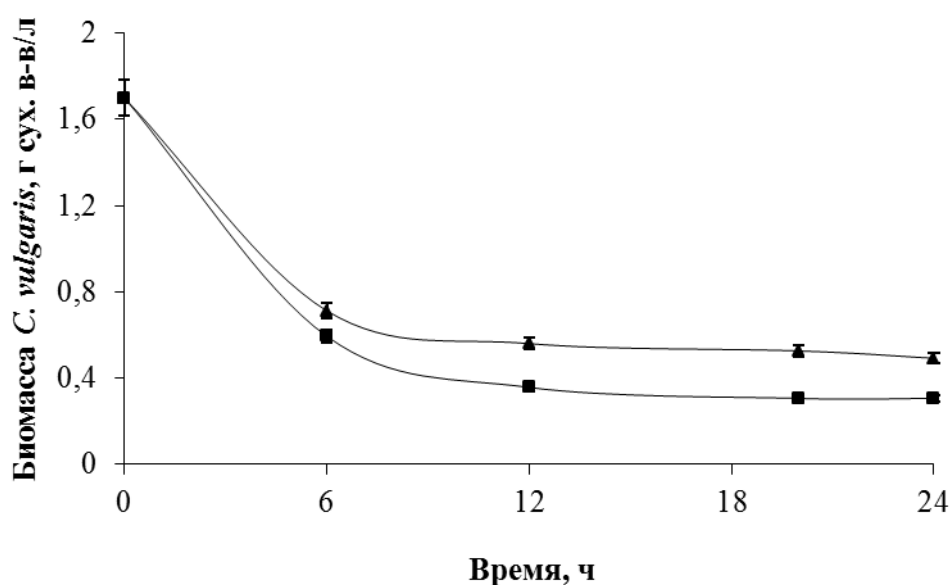


Рисунок 46 – Изменение концентрации биомассы клеток микроводорослей *C. vulgaris* в среде сточных вод № 2 (см. п. 2.2.1) в процессе их сорбции ИБК на основе клеток мицелиальных грибов (▲) *R. oryzae* F-814 (производитель МК) и (■) *R. oryzae* F-1032 (производитель ФК)

Расчет сорбционной ёмкости гранул иммобилизованного мицелия на 20-ом часу, показал, что наиболее эффективным было использование для этих целей гранул ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 (после получения ФК), сорбционная ёмкость которых составила $0,82 \pm 0,03$ г/г по сух. в-вам (аналогичная характеристика для *R. oryzae* F-814 - $0,71 \pm 0,03$ г/г по сух. в-вам). Очевидно, это было связано с тем, что данная культура обладает более «рыхлым» по морфологии мицелием.

При этом необходимо отметить, что использование «отработанного» в процессах получения органических кислот свободного грибного мицелия для целей биосорбции клеток микроводорослей было практически невозможным вследствие того, что к окончанию процесса получения кислот из различных возобновляемых источников сырья наблюдался лизис и деструкция неиммобилизованного грибного мицелия.

Следует отметить, что хотя пустые гранулы (без клеток мицелиальных грибов) криогеля ПВС способны сорбировать клетки микроводорослей *C. vulgaris* из их суспензии, в данном случае величина сорбционной ёмкости использованных гранул была обусловлена исключительно иммобилизованным мицелием, плотная упаковка которого в объеме гранул криогеля ПВС была неоднократно продемонстрирована ранее [214].

На примере ИБК на основе клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F-1032 далее был оптимизирован процесс сорбции биомассы микроводорослей *C. vulgaris* из культуральной жидкости, сформировавшейся в процессе культивирования клеток *C. vulgaris* в сточной воде № 2. Было проведено варьирование соотношения биомассы (по сух. в-вам) клеток

C. vulgaris, присутствующих в среде, и гранул иммобилизованного мицелия, вводимого в ту же среду (Рисунок 47).

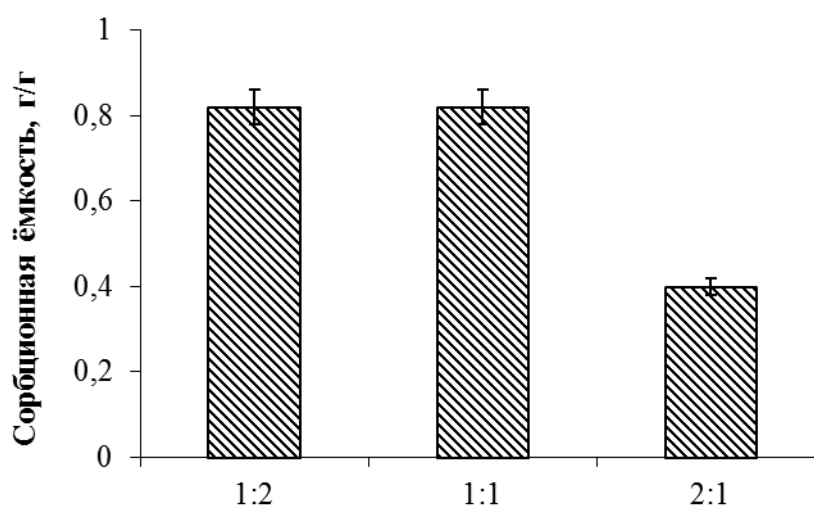


Рисунок 47 – Зависимость сорбционной ёмкости гранул иммобилизованного мицелия *R. oryzae* F-1032 от соотношения биомассы (по сухим веществам) гранул иммобилизованного мицелия и клеток микроводорослей в среде сточных вод №2 (см.п. 2.2.1), использованных исходно для накопления биомассы *C. vulgaris*

Было установлено, что оптимальным соотношением является 1:1, поскольку при увеличении концентрации ИБК на основе клеток мицелиальных грибов *R. oryzae* F-1032 в 2 раза, наблюдалось снижение удельной концентрации клеток микроводорослей, сорбированных в образцах иммобилизованной биомассы гриба, также в 2 раза, а увеличение концентрации биомассы микроводорослей в среде в 2 раза не приводило к изменению удельной концентрации сорбированных клеток *C. vulgaris*. Таким образом, сорбционная ёмкость гранул криогеля ПВС с иммобилизованным мицелием составила $0,82 \pm 0,03$ г/г по сух. в-вам.

В данной работе полученная таким образом биомасса иммобилизованного грибного мицелия, обогащенная сорбированной биомассой микроводорослей, использовалась в качестве исходного сырья для получения метана (Таблица 33), которое проводилось с применением активного анаэробного ила, взятого с очистных сооружений завода по изготовлению чипсов ФритоЛей (г. Кашира) из действующего анаэробного реактора. Для сравнения проводились аналогичные процессы с использованием в качестве субстратов для метаногенеза отдельно образца биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, полученной при культивировании на сточной воде №2, а также отдельно образца иммобилизованного грибного мицелия *R. oryzae* F-1032, полученного после многократного его использования в

процессе получения ФК. Эти эксперименты проводились совместно с к.х.н. Гладченко М. А. (МГУ имени М.В. Ломоносова). Перед началом исследования было проведено определение состава основных биоорганических компонентов указанных видов биомассы (Таблица 33). Следует отметить, что все образцы биомассы перед началом метаногенеза подвергались термообработке при 108°C и 0,5 ати в течение 0,5 ч.

Таблица 33 – Результаты получения метана с использованием различных типов биомассы в качестве исходного субстрата в процессе метаногенеза

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

В результате было установлено, что обогащение «отработанного» иммобилизованного мицелия *R. oryzae* F-1032 сорбированной биомассой *C. vulgaris* и использование полученной «смешанной» биомассы для получения метана позволило увеличить его выход на 20%.

Таким образом, была продемонстрирована возможность эффективной утилизации биомассы иммобилизованного грибного мицелия после процесса получения ФК и использования его для биосорбции клеток микроводорослей из культуральной жидкости, а также последующая трансформация полученной таким образом «смешанной» биомассы в метан под действием клеток метаногенов с выходом 61,3±1,9%.

Еще одним привлекательным способом переработки различных видов возобновляемой биомассы сегодня считается «быстрый» пиролиз, который завоёвывает все больший интерес к себе в связи с тем, что он представляет собой простой и быстрый способ получения топлива [215]. Известно, что в результате пиролиза биомассы с увеличением температуры до 500 °С можно получить газообразную, жидкую и твердую фракции, соотношение между которыми зависит от условий проведения процесса – скорости нагрева и температуры обработки [178]. «Быстрый» пиролиз, происходящий, как правило, при температуре 350-500 °С в течение нескольких минут, интересен именно тем, что позволяет получать преимущественно жидкую фракцию [216], называемую «пиролизным маслом» или

«бионефтью», которая может быть использована непосредственно как котельное топливо или подвергаться очистке для получения топлив высокого качества [217]. При этом выходы бионефти могут достигать 75 % от сухого веса исходной биомассы [218]. Физико-химические свойства получаемой бионефти определяются непосредственно ее химическим составом и зависят от исходно применяемого типа биомассы.

В данной работе была оценена возможность использования «отработанного» иммобилизованного мицелия *R. oryzae* F-1032 с сорбированной биомассой *C. vulgaris* в качестве исходного сырья для получения бионефти в результате ее пиролиза при 500 °С в течение 5 мин (Таблица 34), а также был проведен первичный анализ химического состава полученной бионефти (Рисунок 48). Параллельно аналогичные эксперименты были проведены с биомассой микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной в среде сточных вод №2 (Рисунок 49, Таблица 34). Данные исследования проводились совместно с к.х.н. Ломакиным С. М. (ИБХФ РАН).

Таблица 34 – Продукты пиролиза биомассы микроводорослей *C. vulgaris* и иммобилизованного мицелия *R. oryzae* F-1032 с сорбированной биомассой *C. vulgaris*

Субстрат	Выход продукта, %	
	Жидкая фракция	Твердая фракция
Биомасса <i>C. vulgaris</i>	50,5±2,1	12,5±0,4
Иммобилизованный мицелий <i>R. oryzae</i> F-1032 с сорбированной биомассой <i>C. vulgaris</i>	58,3±2,3	14,5±0,7

Было установлено, что использование для пиролиза «смешанной» биомассы микроводорослей *C. vulgaris* и иммобилизованного грибного мицелия позволило увеличить выход жидкой фракции пиролиза (бионефти) на 8 % по сравнению со свободной биомассой микроводорослей *C. vulgaris*.

Хромато-масс-спектрометрическое исследование составов образцов бионефти (жидкой фракции), полученных при пиролизе двух разных видов биомассы (Рисунки 48, 49) показало, что только при использовании в качестве исходного сырья для пиролиза «смешанной» биомассы иммобилизованного грибного мицелия с сорбированными на нем клетками микроводорослей *C. vulgaris* было выявлено наличие алифатических длинноцепочечных нитрилов, которые в потенциале могут быть использованы в качестве компонентов высокоэнтальпийных топлив.

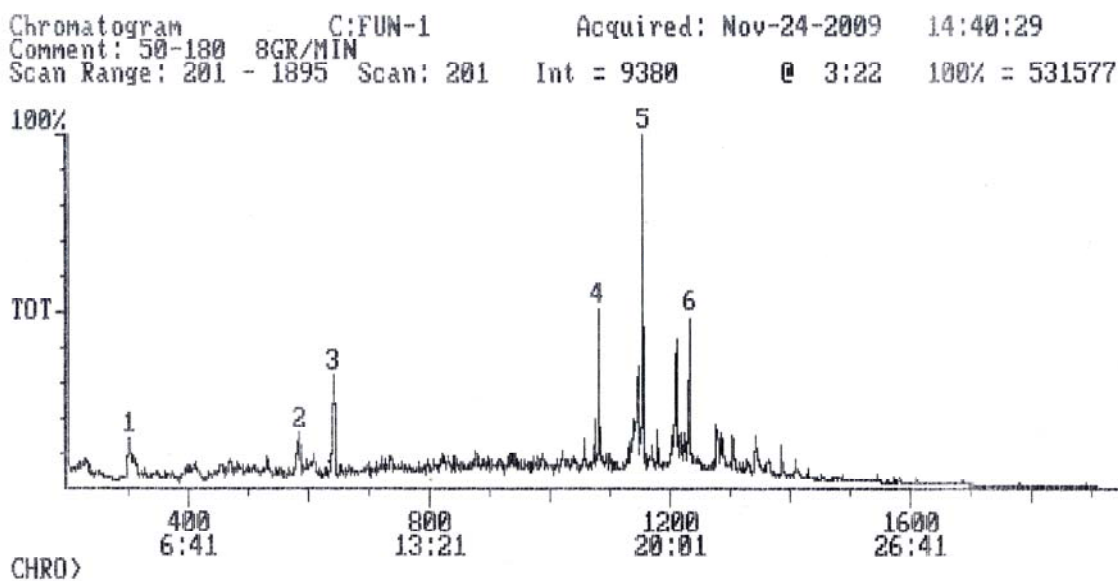


Рисунок 48 – Хромато-масс-спектрометрическое исследование образца бионефти, полученного при пиролизе «смешанной» биомассы иммобилизованного грибного мицелия *R. oryzae* F-1032 и сорбированных на нем клеток *C. vulgaris*. Идентифицированные пики: 1 – фенол, 2 – бутилбензол, 3 – индол, 4 – гексадеканнитрил, 5 – гептадеканнитрил, 6 – эйкозаннитрил

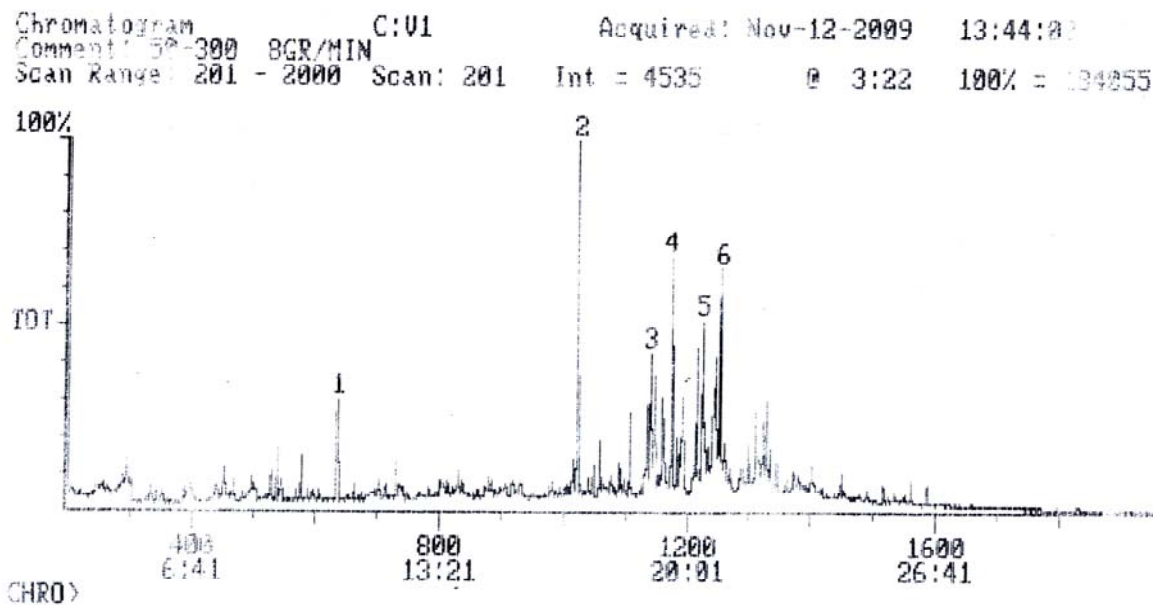


Рисунок 49 – Хромато-масс-спектрометрическое исследование образца бионефти, полученного при пиролизе биомассы микроводорослей *C. vulgaris*, накопленной в среде сточных вод №2. Идентифицированные пики: 1 – индол, 2 – нонадекан, 3 – линолевая кислота, 4 – олеиновая кислота, 5 – пентадецилциклогексан, 6 – докозен-1

Было отмечено отсутствие в составе обоих образцов бионефти серосодержащих соединений, которые часто присутствуют в образцах природной нефти, что свидетельствует о несомненном преимуществе такого пиролитического продукта и открывает перспективы для возможного практического использования полученных образцов бионефти.

Появление длинноцепочечных нитрилов в образце, полученном быстрым пиролизом «смешанной» биомассы микроводорослей *C. vulgaris* и иммобилизованного мицелия, очевидно, обусловлено химическим составом биомассы мицелиальных грибов *R. oryzae* F-1032. Известно, что клеточные стенки большинства микроскопических грибов состоят из хитин-глюканового комплекса, который может составлять до 45 % от общей массы всех клеточных полисахаридов [212, 219]. При этом, очевидно, питательная среда, выбранная для культивирования грибного продуцента, также оказывает значительное влияние на химический состав полученной биомассы [206].

Следует отметить, что получение нитрилсодержащих соединений, вводимых в состав ракетных топлив в концентрации 3-4%, осуществляется сегодня в промышленных условиях в результате многостадийного и дорогостоящего химического синтеза [220]. Причем химически синтезированные нитрилы типично представляют собой короткоцепочечные углеродные соединения, тогда как полученные в данной работе имеют длину цепи C_{16} - C_{20} . В настоящее время ведётся активный поиск новых путей получения нитрилов, в том числе длинноцепочечных, и поэтому получение пиролизным путем бионефти, содержащей подобные нитрильные соединения, несомненно, может иметь огромное научно-практическое значение. При этом очевидно, что присутствие нитрилов определяется возобновляемым источником, используемым для получения бионефти, то есть биомассой мицелиальных грибов *R. oryzae* F-1032.

Таким образом, показано, что с использованием метода пиролиза из биомассы микроводорослей, а также из биомассы микроводорослей, сорбированной на «отработанный» биокатализатор в виде иммобилизованного грибного мицелия, возможно получение пиролизной нефти, в составе которой отсутствуют серосодержащие соединения, при этом при использовании «смешанной» биомассы выход бионефти увеличивается на 8 %. В образце, полученном быстрым пиролизом «смешанной» биомассы микроводорослей *C. vulgaris* и иммобилизованного мицелия, впервые отмечено наличие длинноцепочечных нитрилов – потенциальных компонентов современных ракетных топлив.

Таким образом, в ходе выполнения работы и решения исходно поставленных задач были получены дополнительные результаты, а именно:

- продемонстрирована возможность универсального использования разработанного способа иммобилизации для клеток различных фототрофных микроорганизмов, обеспечивающего продолжительное их хранение при высоком уровне сохранения у них способности к пролиферации;

- показана возможность универсального эффективного использования ИБК, разработанного на основе включённых в криогель ПВС клеток бактерий *A. succinogenes*, для получения в биотехнологических процессах ЯК из различных образцов возобновляемого сырья;

- предложены подходы к утилизации иммобилизованных клеток мицелиальных грибов, использованных в качестве биокатализаторов в процессах получения органических кислот, с образованием таких продуктов, как метан и пиролизная нефть, которые могут иметь дополнительную коммерческую значимость в процессах переработки биомассы микроводорослей *C. vulgaris*.

3.5 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 позволил прийти к выводу о том, что фактически в работе пошагово разработана концепция биотехнологического комплекса (Рисунок 50), которая может иметь в потенциале практическую реализацию.

В составе такого комплекса может быть обеспечено накопление клеток микроводорослей с одновременной очисткой сточных вод и последующим использованием 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 бioneфть.

На основе представленной концепции была проведена сравнительная экономическая оценка эффективности функционирования такого комплекса. Известно, что на пищевом производстве объем сточных вод может составлять около 1500 м³/сутки [221]. Предположим, что в комплексе очистных сооружений имеется три блока по 30 очистных ректоров объемом 50 м³ каждый. Один блок рассчитан на очистку сточных вод, вырабатываемых на пищевом производстве за 1 сутки, функционирование одного блока обеспечивает за 3-е суток снижение ХПК до 8 раз и накопление биомассы микроводорослей. За 1 месяц подобный

комплекс, имеющий 90 очистных реакторов объемом по 50 м³, может провести очистку 43 500 м³ сточных вод, снизив их ХПК в 8 раз. За это время из отходов может быть получено до 70 т сух. биомассы микроводорослей. Функционирование такого комплекса в течение 1 месяца может обеспечить производство от 10 до 16 т одного из видов выпускаемой продукции (Таблица 35) и получить выручку от его реализации от 1,2 до 4,7 млн. рублей, при этом будет проведена очистка сточных вод одного пищевого производства. При необходимости и экономической целесообразности получаемая и предобработанная биомасса микроводорослей может направляться одновременно на получение в составе комплекса сразу четырех продуктов в 4-х разных микробиологических реакторах с различными биокатализаторами.



Рисунок 50 – 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

Таблица 35 – Оценка выходов продуктов и выручка от их реализации, которые могут быть получены при биотрансформации 70 т сух. биомассы микроводорослей, получаемых при реализации сформулированной концепции битехнологического комплекса в течение 1 месяца

Продукт	Выход продукта, т	Рыночная стоимость продукта, руб/кг	Выручка от реализации, тыс. руб
МК	16	120	1 920
ФК	14	90	1 260
ЯК	18	260	4 680
ПГА	10	120	1 200

Известно, что использование продуцентов в иммобилизованном виде обеспечивает длительное эффективное применение одной и той же биомассы клеток в биотехнологических процессах, при этом затраты на наращивание свежей биомассы для каждого рабочего цикла в таких процессах резко сокращаются. Ранее уже была рассчитана экономия от использования иммобилизованных клеток вместо свободных в процессах получения МК и ФК [111]. Был проведен пересчет полученной величины такой экономии на 1 кг сухого ИБК (Таблица 36). С учетом этих показателей и данных Таблицы 35 была проведена оценка экономии от отсутствия затрат на накопление биомассы продуцента для каждого биотехнологического цикла получения органических кислот при функционировании комплекса в течение 1 месяца при использовании иммобилизованных биокатализаторов, а не свободных клеток продуцентов (Таблица 36).

Таблица 36 – Оценочный экономический анализ эффективности использования клеток-продуцентов органических кислот в иммобилизованном виде в составе биотехнологического комплекса

Продукт	Экономия от использования клеток в иммобилизованном виде в процессе, руб/ с 1 кг ИБК по сухому весу [111]	Выход кислоты с 1 кг ИБК, кг	Экономия при использовании иммобилизованных клеток-продуцентов в составе комплекса за 1 месяц, тыс. руб.
МК	8,8	9,3	15 136
ФК	6	9,7	8 640

Из анализа показателей, представленных в Таблице 36, следует вывод о существенной экономической выгоде, получаемой при проведении процессов получения органических кислот при использовании иммобилизованных клеток продуцентов.

Таким образом, в результате выполнения работы была пошагово разработана 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, полигидроксиалканоаты, метан и пиролизную нефть), реализация которого на практике может иметь значимый экономический эффект.

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 ($76,13 \pm 2,41\%$), 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 ($81 \div 89\%$) от общего содержания углеводов в исходной биомассе.
3. Предложены условия оптимального применения иммобилизованных клеток мицелиальных грибов вида *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 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 $61,3 \pm 1,9\%$) или пиролизной нефти (с выходом $58,3 \pm 2,3\%$), 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae [Текст] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 65. – p. 635–648.
2. Harun R., Singh M., Forde G. M., Danquah M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products [Текст] // Renew. Sust. Energ. Rev. – 2010. – V. 14. – I. 3. – p. 1037–1047.
3. Babich I.V., van der Hulst M., Lefferts L., Moulijn J.A., O'Connor P., Seshan K. Catalytic pyrolysis of microalgae to high-quality liquid bio-fuels [Текст] // Biomass Bioenerg. – 2011. – V. 35. – I. 7. – p.3199–3207.
4. Heavy Metals in Waste 2002 [Электронный ресурс] // URL: <http://www.agrohayat.com>
5. Моисеев И., Тарасов В., Трусов Л. Эволюция биоэнергетики. Время водорослей [Текст] // The Chemical Journal. – 2009. – № 12. – с. 24–29.
6. Roudsari F.P., Mehrnia M.R., Asadi A., Moayedi Z., Ranjbar R. Effect of microalgae/activated sludge ratio on cooperative treatment of anaerobic effluent of municipal wastewater [Текст] // Appl Biochem Biotechnol. – 2014. – V.172. – I. 1. – p.131 – 140.
7. Асонов А. М., Ильясов О. Р., Кириллов М. В. Активный ил станций аэрации — биологический ресурс органических удобрений [Текст] // Аграрный вестник Урала. – 2012. – № 4(96). – с. 45–47.
8. Rulkens W. Sewage Sludge as a Biomass Resource for the Production of Energy: Overview and Assessment of the Various Options [Текст] // Energy Fuels – 2008. – V. 22. – I. 1. – p. 9–15
9. Тарасюк В. Т Актуальность и перспективы применения биополимеров в пищевой промышленности [Текст] // Консервная промышленность сегодня: технологии, маркетинг, финансы. – 2011. – № 3. – с 55–62.
10. Wolf O. Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe [Текст] // Sevilla, Spain: Technical report series, 2005. – p.260.
11. Becker E.W. Micro-algae as a source of protein [Текст] // Biotechnol. Adv. – 2007. – V. 25. – I. 2. – p. 207–210.
12. Guedes A. C., Amaro H. M., Malcata F. X. Microalgae as Sources of Carotenoids [Текст] // Mar. Drugs. – 2011. – V. 9. – I. 4. – p. 625–644.
13. Сенько О.В., Гладченко М.А., Лягин И.В., Никольская А.Б., Маслова О.В., Чернова Н.И., Киселева С.В., Коробкова Т.П., Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Трансформация биомассы фототрофных микроорганизмов в метан [Текст] // Альтернативная энергетика и экология. – 2012. – Т. 108. – В. 3. – с. 89–94.
14. Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P., Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella*

- vulgaris* for biodiesel production [Текст] // Chem. Eng. Process. – 2009. – V. 48. – I. 6. – p.1146–1151.
15. Skjånes K., Rebours C., Lindblad P. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process [Текст] // Crit. Rev. Biotechnol. – 2013. – V. 33. – I. 2: – p. 172–215.
16. Halim R., Danquah M. K., Webley P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review [Текст] // Biotechnol. Adv. – 2012. – V. 30. – I. 3. – p. 709–732.
17. Цоглин Л. Н. Биотехнология микроводорослей [Текст] / Цоглин Л. Н., Пронина Н. А.. – Москва: Научный мир. – 2012. – 182 с.
18. Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P., Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production [Текст] // Chem. Eng. Process. – 2009. – Vol. 48. – № 6. – p. 1146–1151.
19. Chen C.-Y., Yeh K.-L., Aisyah R., Lee D.-J., Chang J.-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – Vol. 102. – № 1. – p. 71–81.
20. Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H. Photobioreactors for mass cultivation of algae [Текст] // Bioresource Technol. – 2008. – V. 99. – I. 10. – p. 4021–4028.
21. Chernova N.I., Korobkova T.P., Kiseleva S.V. Use of Biomass for Producing Liquid Fuel: Current State and Innovations [Текст] // Therm. Eng. – 2010. – V. 57. – I. 11. – p. 937–945.
22. Liang Y., Sarkany N., Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions [Текст] // Biotechnol. Lett. – 2009. – V. 31. – p. 1043 – 1049.
23. Wan M., Liu P., Xia J., Rosenberg J. N., Oyler G. A., Betenbaugh M. J., Nie Z., Qiu G. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana* [Текст] // Appl. Microbiol. Biot. – 2011. – V. 91. – I. 3. – p. 835–844.
24. Combres C., Laliberté G., Reyssac J. S., de la Noüe J. Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus* [Текст] // Physiol. Plantarum. – 1994. – V. 91. – I. 4. – p. 729–734.
25. Heredia-Arroyo T., Wei W., Ruan R., Hu B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials [Текст] // Biomass bioenerg. – 2011. – V. 35. – I. 5. – p. 2245 – 2253.
26. Mayur M. Phukan, Rahul S. Chutia, B.K. Konwar, R. Katakib Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock [Текст] // Appl. Energ. – 2011. – V. 88. – I. 10. – p. 3307–3312.

27. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, second edition [Текст] / Editors: Richmond A., Hu Q. USA: Wiley-Blackwell. – 2013. – 736 p.
28. Wu Y.-H., Hu H.-Y., Yu Y., Zhang T.-Y., Zhu S.-F., Zhuang L.-L., Zhang X., Lu Y. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review [Текст] // Renew. Sust. Energ. Rev. – 2014. – V. 33. – p. 675–688.
29. Pittmana J. K., Dean A. P., Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – V. 102. – I. 1. – p. 17–25.
30. Yang J., Xu M., Zhang X., Hu Q., Sommerfeld M., Chen Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – V. 102. – I. 1. – p. 159–165.
31. Källqvist T., Svenson A. Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta [Текст] // Water Res. – 2003. – V. 37. – I. 3. – p. 477–484.
32. Yuan X., Kumar A., Sahuc A. K., Ergas S. J. Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – V. 102. – I. 3. – p. 3234–3239.
33. Su Z.-F., Li X., Hu H.-Y., Wu Y.-H., Noguchi T. Culture of *Scenedesmus* sp. LX1 in the modified effluent of a wastewater treatment plant of an electric factory by photo-membrane bioreactor [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – V. 102. – I. 17. – p. 7627–7632.
34. Larsdotter K. Wastewater treatment with microalgae – a literature review [Текст] // VATTEN. – 2006. – V. 62. – p. 31–38.
35. Johnson M. B., Wen Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production [Текст] // Appl. Microbiol. Biot. – 2010. – V. 85. – I. 3. – p. 525–534.
36. Wang L., Li Y., Chen P., Min M., Chen Y., Zhu J., Ruan R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 8. – p. 2623–2628.
37. Woertz I., Feffer A., Lundquist T., Nelson Y. Algae Grown on Dairy and Municipal Wastewater for Simultaneous Nutrient Removal and Lipid Production for Biofuel Feedstock [Текст] // J. Environ. Eng. – 2009. – V. 135. – I. 11. – p. 1115–1122.
38. Zeng X., Danquah M. K., Zheng C., Potumarthi R., Chen X. D., Lu Y. NaCS–PDMDAAC immobilized autotrophic cultivation of *Chlorella* sp. for wastewater nitrogen and phosphate removal [Текст] // Chem. Eng. J. – 2012. – V. 187. – I. 1. – p. 185–192.
39. Ruiz-Marin A., Mendoza-Espinosa L. G., Stephenson T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 1. – p. 58–64.

40. Gao Q.T., Wong Y.S., Tam N.F.Y. Removal and biodegradation of nonylphenol by immobilized *Chlorella vulgaris* [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – V. 102. – I. 22. – p. 10230–10238.
41. Lau P. S., Tam N. F. Y., Wong Y. S. Wastewater Nutrients (N and P) Removal by Carrageenan and Alginate Immobilized *Chlorella vulgaris* [Текст] // Environ. Technol. – 1997. – V. 18. – I. 9. – p. 945–951.
42. Jiang Z., Zhongbao L., Yinghua L., Xuemin T., Bin L., Yuanyue L., Zhiqiang L., Yaojiang L., Jixin Z. Cultivation of the microalga, *Chlorella pyrenoidosa*, in biogas wastewater [Текст] // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – V. 10. – I. 61. – p. 13115–13120.
43. Chinnasamy S., Bhatnagar A., Hunt R. W., Das K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 9. – p. 3097–3105.
44. Kim M.K., Park J.W., Park C.S., Kim S.J., Jeune K.H., Chang M.U., Acreman J. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater [Текст] // Bioresource Technol. – 2007. – V. 98. – I. 11. – p. 2220–2228.
45. Martínez M. E., Sánchez S., Jiménez J. M., Yousfi F. E., Muñoz L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus* [Текст] // Bioresource Technol. – 2000. – V. 73. – I. 3. – p. 263–272.
46. Hameed M. S. A. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal [Текст] // Afr. J. Biotechnol. – 2007. – V. 6. – I. 10. – p. 1185–1191.
47. Liu K., Li J., Qiao H., Lin A., Wang G. Immobilization of *Chlorella sorokiniana* GXNN 01 in alginate for removal of N and P from synthetic wastewater [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 114. – p. 26–32.
48. Цуцаева А. А., Ананьина А. Е., Балыбердина Л. М., Степанюк Л. В., Павленко Н. В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов [Текст] // Микробиология. – 2008. – Т.77. – № 5. с. 696–700.
49. Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур [Текст] / Сидякина Т.М. – Сб. науч. тр. АН СССР, Пушинский научн. центр. Институт биологической физики, Пушино: Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы. – 1991. – с. 81–159.
50. Chen Y.-C. Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for longterm storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures [Текст] // J. Appl. Phycol. – 2003. – V. 15. – p. 439–444.

51. Marsalek B., Rojickova-Padrtova R. Long-term maintenance of alga strains for use in biomass assays and biotechnology [Текст] // Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud. – 1988. – V. 124. – p. 121–136.
52. Poncet J. M., Benoit V. Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata* [Текст] // Biotechnol. Lett. – 2003. – V. 25. – I. 23. – p. 2017–2022.
53. Day J. G. Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria [Текст] // Methods Mol Biol. – 2007. – V. 368. – p. 141–151.
54. Taylor R., Fletcher R. L. Cryopreservation of eukaryotic algae – a review of methodologies [Текст] // J. Appl. Phycol. – 1998. – V. 10. – I. 5. – p. 481–501.
55. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms [Текст] // Cryobiology. – 2003. – V. 46. – p. 205–229.
56. Piaseck B. P., Dille K. R., Brand J. J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density [Текст] // Cryobiology. – 2009. – V. 58. – p. 103–109.
57. Mortain-Bertrand A., Etchart F., Boucaud M.-Th. A method for the cryoconservation of *Dunaliella salina* (CHLOROPHYCEAE): effect of glycerol and cold adaptation [Текст] // J. Phycol. – 1996. – V. 32. – p. 346–352.
58. Poncet J.-M., Veron B. Cryopreservation of the unicellular marine alga, *Nannochloropsis oculata* [Текст] // Biotechnol. Lett. – 2003. – V. 25. – p. 2017–2022.
59. Piaseck B.P., Dille K.R., Brand J.J. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii*: A cause of low viability at high cell density [Текст] // Cryobiology. – 2009. – V. 58. – p. 103–109.
60. Guermazi W., Sellami-Kammoun A., Elloumi J., Drira Z, Aleya L., Marangon R., Ayadi H., Maalej S. Microalgal cryopreservation using dimethylsulfoxide (Me₂SO) coupled with two freezing protocols: Influence on the fatty acid profile [Текст] // J. Therm. Biol. – 2010. – V. 35. – p. 175–181.
61. Roshani O., Yap L.V., Jeevan R.R., Mohd Syahril M.Z A Preliminary Study Towards Cryopreservation of Unicellular Green Algae, *Chlorella vulgaris* [Текст] / Proceedings of Universiti Malaysia Terengganu 10th International Annual Symposium UMTAS 2011: Empowering Science, Technology and Innovation Towards a Better Tomorrow. – 2011. – p. 141–144.
62. Fenwick C., Day J.G. Cryopreservation of *Tetraselmis suecica* cultured under different nutrients regimes [Текст] // J. Appl. Phycol. – 1992. – V. 4. – p. 105–109.
63. Nakanishi K., Deuchi K., Kuwano K. Cryopreservation of four valuable strains of microalgae, including viability and characteristics during 15 years of cryostorage [Текст] // J. Appl. Phycol. – 2012. – V. 24. – I. 6. – p. 1381–1385.

64. Gwo J.-C., Chiu J.-Y., Chou C.-C., Cheng H.-Y. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) [Текст] // Cryobiology. – 2005. – V. 50. – p. 338–343.
65. Youn J.-Y., Hur S. B. Cryopreserved Marine Microalgae Grown Using Different Freezing Methods [Текст] // Algae. – 2009. – V. 24. – I. 4. – p. 257–265.
66. Rhodes L., Smith J., Tervit R., Robert R., Adamson J., Adams S., Decker M. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae [Текст] // Cryobiology. – 2006. – V. 52. – p. 152–156.
67. Tzovenisa I., Triantaphyllidis G., Naihong X., Chatzinikolaou E., Papadopoulou K., Xouri G. Tafas T. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain [Текст] // Aquaculture. – 2004. – V. 230. – I. 1-4. – p. 457–473.
68. Park H.-K. Long-term Preservation of Bloom-forming Cyanobacteria by Cryopreservation [Текст] // Algae. – 2006. – V. 21. – I. 1. – p. 125–131.
69. Tanniou A., Turpin V., Lebeau T. Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia* (simonsen) [Текст] // Cryobiology. – 2012. – V. 65. – p. 45–50.
70. Choudhary K. K. Post-storage viability and metabolic stability of immobilized cyanobacteria [Текст] // Nova Hedwigia, – 2010. – V. 90. – I. 1-2. – p. 215—226.
71. Efremenko E. N., Tatarinova N. Y. The effect of long-term preservation of bacterial cells immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel on their viability and biosynthesis of target metabolites [Текст] // Microbiology – 2007. – V. 76. – I. 3. – p. 336–341.
72. Yang Z., Guo R., Xu X., Fan X., Li X. Thermo-alkaline pretreatment of lipid-extracted microalgal biomass residues enhances hydrogen production [Текст] // J. Chem. Technol. Biot. – 2011. – V. 86. – I. 3. – p. 454–460.
73. Halim R., Harun R., Danquah M. K., Webley P. A. Microalgal cell disruption for biofuel development [Текст] // Appl. Energ. – 2012. – V. 91. – I. 1. – p. 116–121.
74. Zhou N., Zhang Y., Gong X., Wang Q., Ma Y. Ionic liquids-based hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars [Текст] // Bioresource Technol. – 2012. – V. 118. – p. 512–517.
75. Kim K. H., Choi I. S., Kim H. M., Wi S. G., Bae H. J. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation [Текст] // Bioresource Technol. – 2014. – V. 153. – p. 47–54.

76. Prabakaran P., Ravindran A.D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae [Текст] // Lett. Appl. Microbiol. – 2011. – V. 53. – I. 2. – p. 150–154.
77. M. A. Rodrigues, da Silva Bon E. P. Evaluation of *Chlorella* (Chlorophyta) as Source of Fermentable Sugars via Cell Wall Enzymatic Hydrolysis [Текст] // Enzyme Research. – 2011. – V. 2011. – p. 1–5.
78. Miranda J. R., Passarinho P. C., Gouveia L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production [Текст] // Bioresource Technol. – 2012. – V. 104. – p. 342–348.
79. Cao Y., Wu J., Zhang J., Li H., Zhang Y., He J. Room temperature ionic liquids (RTILs): A new and versatile platform for cellulose processing and derivatization [Текст] // Chem. Eng. J. – 2009. – V. 147. – p. 13–21.
80. Shill K., Padmanabhan S., Xin Q., Prausnitz J. M., Clark D. S., Blanch H. W. Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: Enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle [Текст] // Biotechnol. Bioeng. – 2011. – V. 108. – I. 3. – p. 511–520.
81. Сашина Е.С., Новоселов Н.П. Влияние строения ионных жидкостей на их растворяющую способность по отношению к природным полимерам [Текст] // Журн. общ. Химии. – 2009. – Т. 79. – В. 6. – с. 885–890.
82. Zavrel M., Bross D., Funke M., Buchs J., Spiess A. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (lingo-)cellulose [Текст] // Bioresour. Technol. – 2009. – V. 100. – p. 2580–2587.
83. Xiao W., Yin W., Xia S., Ma P. The study of factors affecting the enzymatic hydrolysis of cellulose after ionic liquid pretreatment [Текст] // Carbohydr. Polym. – 2011. – V. 87. – p. 2019–2023.
84. Liu C.-H., Chang C.-Y., Cheng C.-L., Lee D.-J., Chang J.-S. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* CGS5 using carbohydrate-rich microalgal biomass as feedstock [Текст] // Int. J. Hydr. Energ. – 2012. – V. 37. – I. 20. – p. 15458–15464.
85. Ho S.-H., Huang S.-W., Chen C.-Y., Hasunuma T., Kondo A., Chang J.-S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock [Текст] // Bioresource Technol. – 2013. – V. 135. – p. 191–198.
86. Zhou N., Zhang Y., Wu X., Gong X., Wang Q. Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂ [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – V. 102. – I. 21. – p. 10158–10161.
87. Nguyen M. T., Choi S. P., Lee J., Lee J. H., Sim S. J. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production [Текст] // J. Microbiol. Biot. – 2009. – V. 19. – I. 2. – p. 161–166.

88. Harun R., Danquah M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production [Текст] // Process Biochem. – 2011. – V. 46. – I. 1. – p. 304–309.
89. Talukder M. M. R., Das P., Wu J. C. Microalgae (*Nannochloropsis salina*) biomass to lactic acid and lipid [Текст] // Biochem. Eng. J. – 2012. – V. 65. – p. 109–113.
90. Kapaun E., Loos E., Reisser W. Cell wall composition of virus-sensitive symbiotic *Chlorella* species [Текст] // Phytochemistry. – 1992. – V. 31. – I. 9. – p. 3103–3104.
91. Kapaun E., Reisser W. A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae) [Текст] // Planta. – 1995. – V. 197. – p. 577–582.
92. Gerken H. G., Donohoe B., Knoshaug E. P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production [Текст] // Planta. – 2013. – V. 237. – I. 1. – p. 239–253.
93. Takeda H. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of chlorella (chlorophyceae) [Текст] // J. Phycol. – 1991. – V. 27. – I. 2. – p. 224–232.
94. Blumreisinger M., Meindl D., Loos E. Cell wall composition of chlorococcal algae [Текст] // Phytochemistry. – 1983. – V. 22. – I. 7. – p. 1603–1604.
95. Dragone G., Fernandes B. D., Abreu A. P., Vicente A. A., Teixeira J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae [Текст] // Appl. Energ. – 2011. – V. 88. – I. 10. – p. 3331–3335.
96. Chen C.-Y., Zhao X.-Q., Yen H.-W., Hod S.-H., Cheng C.-L., Lee D.-J., Bai F.-W., Chang J.-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production [Текст] // Biochem. Eng. J. – 2013. – V. 78. – p. 1–10.
97. Zheng H., Yin J., Gao Z., Huang H., Ji X., Dou C. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves [Текст] // Appl. Biochem. Biot. – 2011. – V. 164. – I. 7. – p. 1215–1224.
98. Fu C.-C., Hung T.-C., Chen J.-Y., Su C.-H., Wu W.-T. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 22. – p. 8750–8754.
99. Choi S. P., Nguyen M. T., Sim S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 14. – p. 5330–5336.
100. Harun R., Danquah M. K. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production [Текст] // Chem.Eng. J. – 2011. – V. 168. – I. 3. – p. 1079–1084.
101. Nguyen C. M., Kim J.-S., Song J. K., Choi G. J., Choi Y. H., Jang K. S., Kim J.-C. D-Lactic acid production from dry biomass of *Hydrodictyon reticulatum* by simultaneous saccharification

- and co-fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. Torquens [Текст] // Biotechnol. Lett. – 2012. – V. 34. – I. 12. – p. 2235–2240.
102. Nguyen C. M., Kim J.-S., Hwang H. J., Park M. S., Choi G. J., Choi Y. H., Jang K. S., Kim J.-C. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli [Текст] // Bioresource Technol. . – 2012. – V. 110. – p. 552–559.
103. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae [Текст] // J. Biosci. Bioeng. – 2006. – V. 101. – I. 2. – p. 87–96.
104. Matsukawa R., Hotta M., Masuda Y., Chihara M., Karube I. Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana* [Текст] // J. Appl. Phycol. – 2000. – V. 12. – I. 3-5. – p. 263–267.
105. Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review [Текст] // Renew. Sust. Energ. Rev. – 2010. – V. 14. – I. 1. – p. 217–232.
106. Siracusa V., Rocculi P., Romani S., Dalla Rosa M. Biodegradable polymers for food packaging: a review [Текст] // Trends Food Sci. Tech. – 2008. – V. 19. – p. 634–643.
107. Gironi F., Piemonte V. Bioplastics and petroleum-based plastics: strengths and weaknesses [Текст] // Energ. Sourc., Part A. – 2011. – V. 33. – p. 1949–1959.
108. Press releases: European bioplastics [электронный ресурс] // URL: <http://en.european-bioplastics.org/press/press-releases/>
109. Schut J.H. PLA biopolimers [Текст] // Plast Technol. – 2008. – V. 11. – p. 66-69.
110. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Архипов А.В. Исследование материалов медицинского назначения на основе полилактатов и полилактидов [Текст] // Стоматология. – 2013. – Т. 5. – с. 4–8.
111. Сенько О.В. Биокатализаторы в виде иммобилизованных в криогель поливинилового спирта клеток мицелиальных грибов в процессах получения органических кислот, биоэтанола, гидролитических ферментов и разложения фосфорорганических пестицидов: диссертация ... кандидата химических наук: 03.01.06. — Москва, 2013. — 170 с.
112. Garde A., Jonsson G., Schmidt A. S., Ahring B. K. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis* [Текст] // Bioresource Technol. – 2002. – V. 81. – I. 3. – p. 217–223.
113. Martinez F. A. C., Balciunas E. M., Salgado J. M., Domínguez González J. M., Converti A., Oliveira R. P. S. Lactic acid properties, applications and production: A review [Текст] // Trends Food Sci. Tech. – 2013. – V. 30. – I. 1. – p. 70–83.
114. Vodnar D. C., Dulf F. V., Pop O. L., Socaciu C. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol [Текст] // Microbial Cell Factories. – 2013. – V. 92. – p. 1-12.

115. Yang C.W., Lu Z., Tsao G.T. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. [Текст] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1995. – V. 51-52. – I. 1. – p. 57–71.
116. Park E. Y., Anh P. N., Okuda N. Bioconversion of waste office paper to L(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae* [Текст] // Bioresource Technol. – 2004. – V. 93. – p. 77–83.
117. Vially G., Marchal R., Guilbert N. L(+) Lactate production from carbohydrates and lignocellulosic materials by *Rhizopus oryzae* UMIP 4.77 [Текст] // World J Microbiol Biotechnol. – 2010. – V. 26. – p. 607–614.
118. Goldberg I., Rokem J.S., Pines O. Organic acids: old metabolites, new themes [Текст] // J. Chem. Tech. Biotechnol. – 2006. – V. 81. – p. 1601–1611.
119. Vroman I., Tighzert L. Biodegradable Polymers [Текст] // Materials – 2009. – V. 2. – p. 307–344.
120. Xu J., Guo B.-H. Microbial succinic acid, its polymer poly(butylene succinate), and application [Текст] // Plastics from Bacteria. Microbiology Monographs – 2010. – V. 14. – p. 347–388.
121. Rehm B. H. A. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives [Текст] // Massey university, New Zealand: Horizon Scientific Press. – 2009. – p. 294
122. Efremenko E., Spiricheva O., Lozinsky V., Varfolomeev S. *Rhizopus oryzae* fungus cells producing l(+)-lactic acid: kinetic and metabolic parameters of free and pva-cryogel-entrapped mycelium [Текст] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – V. 72. – I. 3. – p. 480–485.
123. Efremenko E. N., Spiricheva O. V., Veremeenko D. V., Baibak A. V., Lozinsky V. I. L(+)-lactic acid production using pva-cryogel entrapped *Rhizopus oryzae* fungus cells [Текст] // J. Chem. Tech. Biotechnol. – 2006. – Vol. 81. – P. 519–522
124. Matthey M. The Production of Organic Acids [Текст] // Crit. Rev. Biotechnol. – 1992. – V. 12. – I. 1-2. – p. 87–132.
125. Roa Engel C. A., Straathof A. J. J., Zijlmans T.W., van Gulik W. M., van der Wielen L. A. M. Fumaric acid production by fermentation [Текст] // Appl Microbiol Biotechnol. – 2008. – V. 78. – p. 379–389.
126. Lee S.Y., Hong S.H., Lee S.H., Park S.J. Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis [Текст] // Macromol. Biosci. – 2004. – V. 4. – p. 157–164.
127. Ranucii E., Liu Y., Lindblad M. S., Albertsson A.-C.. New biodegradable polymers from renewable sources. High molecular weight poly(ester carbonate)s from succinic acid and 1,3-propanediol [Текст] // Macromol. Rapid Comm. – 2000. – V. 21. – p. 680–684.
128. Bechthold I., Bretz K., Kabasci S., Kopitzky R., Springer A.. Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources [Текст] // Chem. Eng. Technol. – 2008. – V. 31. – I. 5. – p. 647–654.

129. Zeikus J. G., Jain M. K., Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products [Текст] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – V. 51. – I. 5. – p. 545-552.
130. Barros M., Freitas S., Padilha G.S., Alegre R.M. Biotechnological production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* using different substrate [Текст] // Chem. Eng. Transactions. – 2013. – V.32. – p. 985-990.
131. Song H., Lee S-Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation [Текст] // Enzyme Microb Technol. – 2006. – V. 39. – p. 352–361.
132. Hong S. H. Systems approaches to succinic acid-producing microorganisms [Текст] // Biotechnol. Bioproc. Eng. – 2007. – V. 12. – I. 2. – p. 73–79.
133. Taing O., Taing K. Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* [Текст] // Eur. Food Res. Tech. – 2007. – V. 224. – I. 3. – p. 343–347.
134. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Sobolevskaya T.I., Laptev I.A., Vybornaya T.V., Larina A.S., Matsui K., Fukui K., Sineoky S.P. Production of succinic acid at low pH by a recombinant strain of the aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* [Текст] // Biotechnol. Bioeng. – 2010. – V. 107. – I. 4. – p. 673–682.
135. Raab A. M., Gebhardt G., Bolotina N., Weuster-Botz D., Lang C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid [Текст] // Metabolic Eng. – 2010. – V. 12. – I. 6. – p. 518–525.
136. de Barros M., Freitas S., Padiha G.S., Alegre R.M. Biotechnological production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* using different substrates [Текст] // Chem. Eng. Transaction. – 2013. – V. 32. – p. 985–990.
137. Guettler M. V., Rumler D., Jain M. K. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen [Текст] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 49. – p. 207–216.
138. Vlysidis A., Binns M., Webb C., Theodoropoulos C. Glycerol utilization for the production of chemicals: conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study [Текст] // Biochem. Eng. J. – 2011. – V. 58/59. – p. 1–11.
139. Corona-González R. I., Bories A., González-Álvarez V., Pelayo-Ortiz C. Kinetic study of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* ZT-130 [Текст] // Process Biochem. – 2008. – V. 43. – I. 10. – p. 1047–1053.
140. Xi Y., Chen K., Dai W., Ma J., Zhang M., Jiang M., Wei P., Ouyang P. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source [Текст] // Bioresource Technol. – 2013. – V. 136. – p. 775–779.

141. Liu Y.-P., Zheng P., Sun Z.-H., Ni Y., Dong J.-J., Zhu L.-L. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* [Текст] // Bioresource Technol. – 2008. – V. 99. – I. 6. – p. 1736–1742.
142. Lia Q., Yanga M., Wang D., Li W., Wu Y., Zhang Y., Xing J., Su Z. Efficient conversion of crop stalk wastes into succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 9. – p. 3292–3294.
143. Corona-González R. I., Miramontes-Murillo R., Arriola-Guevara E., Guatemala-Morales G., Toriz G., Pelayo-Ortiz C. Immobilization of *Actinobacillus succinogenes* by adhesion or entrapment for the production of succinic acid [Текст] // Bioresource Technol. – 2014. – V. 164. – p. 113–118.
144. Urbance S. E., Pometto III A. L., DiSpirito A. A., Denli Y. Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors [Текст] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 65. – I. 6. – p. 664-670.
145. J. Yu, Li Z., Ye Q., Yang Y., Chen S. Development of succinic acid production from corncob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [Текст] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 37. – I. 10. – p. 1033–1040.
146. Zheng P., Dong J.-J., Sun Z.-H., Ni Y., Fang L. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [Текст] // Bioresource Technol. – 2009. – V. 100. – I. 8. – p. 2425–2429.
147. Chen K., Jiang M., Wei P., Yao J., Wu H. Succinic Acid Production from Acid Hydrolysate of Corn Fiber by *Actinobacillus succinogenes* [Текст] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2010. – V. 160. – I. 2. – p. 477–485.
148. Dorado M. P., Lin S. K. C., Koutinas A., Du C., Wang R., Webb C. Cereal-based biorefinery development: Utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid [Текст] // J. Biotechnol. – 2009. – V. 143. – I. 1. – p. 51–59.
149. Chen K., Zhang H., Miao Y., Jiang M., Chen J. Succinic acid production from enzymatic hydrolysate of sake lees using *Actinobacillus succinogenes* 130Z [Текст] // Enzyme Microb. Tech. – 2010. – V. 47. – I. 5. – p. 236–240.
150. Borges E. R., Pereira Jr. N. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [Текст] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – V. 38. – I. 8. – p. 1001–1011.
151. Verlinden R. A. J., Hill D. J., Kenward M. A., Williams C. D., Radecka I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates [Текст] // J. Appl. Microbiol. – 2007. – V. 102. – I. 6. – p. 1437–1449.

152. Reddy C. S. K., Ghai R., Rashmi O., Kalia V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview [Текст] // *Bioresource Technol.* – 2003. – V. 87. – I. 2. – p. 137–146.
153. Маркелова Н.М. Резорбируемые эндопротезы для эндобилиарного стентирования [Текст] // *Современные проблемы науки и образования.* – 2013. – Т. 1. – с. 1–11.
154. Шищацкая Е.И., Волова Т.Г. Полигидроксиалканоаты как матрикс в клеточных технологиях [Текст] // *Гены и клетки.* – 2010. – Т. 3. – с. 55–56.
155. Wu Q., Wang Y., Chen G. Q. Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates [Текст] // *Artif. Cell Blood Substit. Biotechnol.* – 2009. – V. 37. – I. 1. – p. 1–12.
156. Jendrossek D., Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates [Текст] // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – V. 56. – p. 403–432.
157. Yu J., Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates [Текст] // *Bioresource Technol.* – 2008. – V. 99. – I. 17. – p. 8042–8048.
158. Baei M. S., Najafpour G.D., Younesi H., Tabandeh F., Eisazadeh H. Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis by *Cupriavidus necator* DSMZ 545 Utilizing Various Carbon Sources [Текст] // *World Appl. Sci. J.* – 2009. – V. 7. – I. 2. – p. 157–161.
159. Fukui T., Doi Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain [Текст] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – V. 49. – I. 3. – p. 333–336.
160. Rao U., Sridhar R., Sehgal P.K. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil [Текст] // *Biochem. Eng. J.* – 2010. – V. 49. – I. 1. – p. 13–20.
161. Oliveira F.C., Freire D.M.G., Castilho L.R. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha* [Текст] // *Biotechnol. Lett.* – 2004. – V. 26. – I. 24. – p. 1851–1855.
162. Ganzeveld K. J., van Hagen A., van Agteren M. H., de Koning W., Uiterkamp A. J. M. S. Upgrading of organic waste: production of the copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-valerate by *Ralstonia eutrophus* with organic waste as sole carbon source [Текст] // *Journal of Cleaner Production.* – 1999. – V. 7. – I. 6. – p. 413–419.
163. Sangyoka S., Poomipuk N. Reungsang A. Optimum Conditions for the Production of Polyhydroxybutyrate from Cassava Wastewater by the Newly Isolated *Cupriavidus* sp. KKU38 [Текст] // *Sains Malaysiana.* – 2012. – V.41. – I. 10. – p. 1211–1216.
164. Castilho L. R., Mitchell D. A., Freire D. M. G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation [Текст] // *Bioresource Technol.* – 2009. – V. 100. – I. 23. – p. 5996–6009.

165. Algae. Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. IV [Электронный ресурс]. // URL: <http://www.vkm.ru/eCatalogue.htm>.
166. Nopens I., Capalozza C., Vanrolleghem P. A. Department of applied mathematics, biometrics and process control [Текст] // Technical report: Stability analysis of a synthetic municipal wastewater. 2001. – p. 22.
167. Reinhold D., Aryal N. Michigan Department of Agriculture [Текст] // Development of Poplar Plantations for Food Processing Wastewaters. 2012 – p. 11.
168. Nakamura T., Matsuda K. Studies on Luciferase from *Photobacterium phosphoreum* I. Purification and physicochemical properties [Текст] // J. Biochem. - 1971. - V. 70. - p. 35-44.
169. Ефременко Е.Н., Спиричева О.В., Варфоломеев С.Д., Синеокий С.П., Байбак А.В., Лозинский В.И. Имобилизованный биокатализатор, способ его получения и способ получения молочной кислоты с использованием этого биокатализатора [Текст] // Патент РФ № 2253677. – 2002.
170. Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г., Нетрусов А. И., Семенова Е. В., Колотилова Н. Н., Захарчук Л. М., Зинченко В. В., Мыльникова С. И., Нефедова М. В., Ботвинко И. В. Руководство к практическим занятиям по микробиологии [Текст] / Под ред. Егорова Н.С. – М.: Изд. МГУ. – 1995. – 224 с.
171. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues [Текст] // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 226. – I. 1. – p. 497 – 509.
172. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for Biochemical Research (Third Edition) [Текст] / Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1986. – ISBN 0-19-855358-7.
173. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [Текст] // Anal. Chem. – 1956. – V. 28. – I. 3. – p. 350 – 356.
174. Aguirre A.-M., Bassi A. Investigation of Biomass Concentration, Lipid Production, and Cellulose Content in *Chlorella vulgaris* Cultures Using Response Surface Methodology [Текст] // Biotechnol. Bioeng. – 2013. – V. 110. – I. 8. – p. 2114–2122.
175. Updegraff D. M. Semimicro determination of cellulose in biological materials [Текст] // Anal. Biochem. – 1969. – V. 32. – I. 3. – p. 420–424.
176. Fernandes B., Dragone G., Abreu A. P., Geada P., Teixeira J., Vicente A. Starch determination in *Chlorella vulgaris* – a comparison between acid and enzymatic methods [Текст] // J. Appl. Phycol. – 2012. – V. 24. – I. 5. – p. 1203–1208.
177. Дементьева Е.И., Кутузова Г.Д., Люндовских И.А., Угарова Н.Н. Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата. [Текст] // Патент РФ на изобретение № 2164241. 2001.

178. Peng W., Wu Q., Tu P. Effects of temperature and holding time on production of renewable fuels from pyrolysis of *Chlorella protothecoides* [Текст] // J. App. Phycol. – 2000. – V. 12. – I. 2. – p. 147–152.
179. Синицын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов [Текст] / Синицын А.П. – М.: МГУ. – 1995. – 220 с.
180. Мышкина В. Л., Иванов Е. А., Николаева Д. А., Махина Т. К., Бонарцев А. П., Филатова Е. В, Ружицкий А. О., Бонарцева Г. А. Биосинтез сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б [Текст] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. – № 3 – с. 315–323.
181. Ефременко Е.Н., Сенько О.В., Куц В.В., Исмаилов А.Д., Холстов А.В., Аленина К.А. Люминесцентный биокатализатор для определения экотоксикантов // Патент РФ на изобретение №2394910, Бюл. 20 (20.07.2010)
182. Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток [Текст] / Под ред. Работнова И.Л. – М.: Изд. Мир. – 1978. – 332с.
183. Wan M., Liu P., Xia J., Rosenberg J. N., Oylar G. A., Betenbaugh M. J., Niel Z., Qiu G. The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana* [Текст] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – V. 91. – I. 3. – p. 835–844.
184. Yeh K.-L., Chang J.-S., Chen W.-M. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31 [Текст] // Eng. Life Sci. – 2010. – V. 10. – I. 3. – p. 201–208.
185. Lv J.-M., Cheng L.-H., Xu X.-H., Zhanga L., Chen H.-L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 17. – p. 6797–6804.
186. Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Гудков Д.А., Сенько О.В., Лозинский В.И., Варфоломеев С.Д. Имобилизованные грибные биокатализаторы для получения комплекса целлюлаз, гидролизующего возобновляемое растительное сырье [Текст] // Катализ в промышленности. – 2013. – №1. – с. 68–77.
187. Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Никольская А.Б., Сенько О.В., Спиричева О.В., Варфоломеев С.Д. Биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов в процессах получения биоэтанола и биобутанола [Текст] // Катализ в промышленности. – 2010. – №5. – с. 76–77.
188. Лозинский В.И., Дамшкалн Л.Г., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 33. Влияние скорости охлаждения водных растворов поливинилового спирта при их замораживании на физико-химические свойства и

- пористую морфологию криогелей, получающихся после оттаивания [Текст] // Коллоидн. ж. – 2012. – Т. 74. – В. 3. – с. 343–352.
189. Riley M.R., Muzzio F.J., Reyes S.C. Experimental and modeling studies of diffusion in immobilized cell systems [Текст] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1999. – V. 80. – p. 151 – 188.
190. Никольская А.Б. Каталитические системы получения водорода биофотолизом воды: диссертация ... кандидата химических наук: 02.00.15 и 03.01.06. — Москва, 2013. — 169 с.
191. Лозинский В.И., Дамшкалн Л.Г., Шаскольский Б.Л., Бабушкина Т.А., Курочкин И.Н., Курочкин И.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 27. Физико-химические свойства криогелей поливинилового спирта и особенности их макропористой морфологии [Текст] // Колоидн. журн. – 2007. – Т. 69. – В. 6. – с. 798–816.
192. Iranmahboob J., Nadim F., Monemi S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips [Текст] // Biomass and Bioenergy. – 2002. – V. 22. – I. 5. – p. 401–404.
193. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review [Текст] // Bioresource Technol. – 2002. – V. 83. – I. 1. – p. 1–11.
194. Jeong T. S., Choi C. H., Lee J. Y., Keun K. Oh Behaviors of glucose decomposition during acid-catalyzed hydrothermal hydrolysis of pretreated *Gelidium amansii* [Текст] // Bioresource Technol. – 2012. – V. 116. – p. 435–440.
195. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review [Текст] // Bioresource Technol. – 2010. – V. 101. – I. 13. – p. 4851–4861.
196. Gremos S., Zarafeta D., Kekos D., Kolisis F. Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid [Текст] // Bioresource Technol. – 2011. – V. 102. – I. 2. – p. 1378–1382.
197. Tan H.T., Lee K.T. Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on biomass and enzymatic hydrolysis [Текст] // Chem. Eng. J. – 2122. – V. 183. – p. 448–458.
198. Skaisgiriene A., Vaitiekūnas P., Zabukas V. Influence of chlorides and sulphates on quality of biological wastewater treatment using enzyme preparations [Текст] // J. Environ. Eng. Landsc. Manag. – 2004. – V. 12. – I. 3. – p. 91–95.
199. Tripathi A., Sami H., Jain S.R., Vilorio-Cols M., Zhuravleva N., Nilsson G., Jungvid H., Kumar A. Improved bio-catalytic conversion by novel immobilization process using cryogel beads to increase solvent production [Текст] // Enzym. Microb. Tech. – 2010. – V. 47. – p. 44–51.
200. Khanna S., Srivastava A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates [Текст] // Process Biochem. – 2005. – V. 40. – I. 2. – p. 607–619.
201. Volova T., Kiselev E., Vinogradova O., Nikolaeva E., Chistyakov A., Sukovatiy A., Shishatskaya E. A Glucose-Utilizing Strain, *Cupriavidus euthrophus* B-10646: Growth Kinetics,

- Characterization and Synthesis of Multicomponent PHAs [Текст] // Plos one. – 2014. – V. 9. – I. 2. – p. 1-15.
202. El-Sayed, Azhar A., Abdelhady H. M., Hafez A. M. A., Khodair T.A. Batch Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes Latus* Using Bioreactor Different Culture Strategies [Текст] // J. Appl. Sci. Res. – 2009. – V. 5. – I. 5. – p. 556–564.
203. Khanna S., Srivastava A. K. Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha* [Текст] // Process Biochem. – 2005. – V. 40. – I. 6. – p. 2173–2182.
204. Khanna S., Srivastava A. K. Repeated batch cultivation of *Ralstonia eutropha* for Poly (beta-hydroxybutyrate) production [Текст] // Biotechnol. Lett. – 2005. – V. 27. – I. 18. – p. 1401–1403.
205. Kim B. S., Lee S.C., Lee S.Y., Chang H.N., Chang Y.K., Woo S.I. Production of poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate feeding using one-line glucose analyzer [Текст] // Enzyme Microb. Technol. – 1994. – V. 16. – p. 556–561.
206. Ефременко Е.Н. Гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты: диссертация ... доктора биологических наук: 03.00.02 и 03.00.23. — Москва, 2009. — 433 с.
207. Lakaniemi A.-M., Hulatt C. J., Thomas D. N., Tuovinen O. H., Puhakka J. A. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass [Текст] // Biotechnol. Biofuels. – 2011. – V. 4. – p. 34–46.
208. Mussnug J. H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept [Текст] // J. Biotechnol. – 2010. – V. 150. – p. 51–56.
209. Карпова Г.В., Буракаева А.Д. Изучение состава клеточной стенки *Hypomyces Rosellus* в связи с использованием в практике [Текст] // Вестник ОГУ. – 2011. – Т. 12. – В. 131. – с. 193–194.
210. Машукова Н.В., Миронов П.В., Лоскутов С.Р. Сорбция катионов цинка, меди и кобальта отработанной биомассой и полисахаридным комплексом клеточных стенок *Penicillium chrysogenum* [Текст] // Биотехнология. – 2004. – Т. 4. – с. 60–66.
211. Горовой Л.Ф., Косяков В.Н. Клеточная стенка грибов – оптимальная структура для биосорбции [Текст] // Биополимеры и клетка. – 1996. – Т. 12. – В. 4. – с. 49–60.
212. Унрод В. И., Солодовник Т. В. Хитин- и хитозансодержащие комплексы из мицелиальных грибов: получение, свойства, применение [Текст] // Biopolym. Cell. – 2001. – V. 17. – I. 6. – p. 526–533.

213. Gultom S. O., Hu B. Review of Microalgae Harvesting via Co-Pelletization with Filamentous Fungus [Текст] // *Energies*. – 2013. – V.63. – p. 5921–5939.
214. Маслова О.В. Биокаталитические системы на основе иммобилизованных клеток гриба *Rhizopus oryzae*: способы получения и свойства: диссертация ... кандидата химических наук: 02.00.15 и 03.00.23. — Москва, 2006. — 170 с.
215. Czernik S., Bridgwater A. V. Overview of Applications of Biomass Fast Pyrolysis Oil [Текст] // *Energ. Fuel*. – 2004. – V. 18. – I. 2. – p. 590–598.
216. Onay O. Influence of pyrolysis temperature and heating rate on the production of bio-oil and char from safflower seed by pyrolysis, using a well-swept fixed-bed reactor [Текст] // *Fuel Process. Tech.* – 2007. – V. 88. – p. 523–531.
217. Bridgwater A.V. Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass [Текст] // *Chem. Eng. J.* – 2003. – V. 91. – p. 87–102.
218. Maher K.D., Bressler D.C. Pyrolysis of triglyceride materials for the production of renewable fuels and chemicals [Текст] // *Bioresource Technol.* – 2007. – V. 98. – p. 2351–2368.
219. Шубаков А.А., Михайлова Е.А. Полисахариды клеточной стенки мицелиальных грибов [Текст] // *Бутлеровские сообщения*. – 2011. – Т. 28. – В. 20. – с. 53–37.
220. Acton Q.A. Nitriles – advances in research and application [Текст] // *USA: ScholarlyEditions* – 2013. – p. 526.
221. Системы очистки сточных вод для пищевых производств [электронный ресурс] // URL: http://www.oborudunion.ru/i_store/item_999787700/sistemy-ochistki-stochnyh-vod-dlya-ischevyh-proizvodstv.html