

КАЛЁНОВ
Сергей Владимирович

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ И ГАЛОБАКТЕРИЙ
В УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
СТРЕССА**

Специальность: 03.00.23 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва
2007

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Совершенствование традиционных и разработка новых способов культивирования микроорганизмов является основой для получения продуктов их биосинтеза и использования специфических микробных процессов в отдельных областях биотехнологии. Постоянное внимание уделяется поиску средств, позволяющих поддерживать необходимые ростовые и биосинтетические характеристики микробных продуцентов на протяжении определенной ферментационной стадии или всего жизненного цикла. Широко применяются такие методы как иммобилизация клеток, управляемое культивирование с использованием современных оперативных средств и математических моделей, направленное вмешательство в метаболические процессы и др. Отклонение сбалансированного процесса микробного синтеза от заданных оптимальных параметров ведет к ухудшению показателей биосинтеза, а нарушение этих параметров индуцирует развитие в клетках микроорганизмов состояния стресса. Состояние стресса понимается как совокупность ответных реакций, направленных на преодоление неблагоприятных изменений окружения, вызванных стрессорным воздействием.

Длительное время считали, что стресс неблагоприятно воздействует на микроорганизмы, что выражается в подавлении их физиологической активности, снижении эффективности биосинтеза. Однако, в последние годы появилось много данных, свидетельствующих о том, что в определенных условиях воздействие оптимальных доз стрессорных факторов (стрессоров) приводит к улучшению ростовых характеристик микроорганизмов, стимуляции биосинтетических процессов, повышению скорости биотрансформации и разложения загрязнений [Davies et al., 1995, Сафонов, 2002, Сорокодумов, 2005].

Таким образом, воздействие определенными дозами стрессора приводит к мобилизации физиологических и генетических резервов клетки [Hange-Arnonis, 2000]. В этой связи целесообразно использовать понятие **контролируемого стресса**, при котором развивающаяся устойчивость к стрессорному воздействию проявляется как стимуляция метаболизма. Контроль количества и качества стресс-факторов, избирательное усиление или подавление действия их на клетки микроорганизмов может быть эффективным средством совершенствования процессов управляемого культивирования микроорганизмов в лабораторных и промышленных условиях.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы было выяснить закономерности изменения биосинтетических и ростовых характеристик модельных микроорганизмов в условиях контролируемого окислительного стресса для совершенствования ферментационных процессов и разработки новых подходов управляемого культивирования промышленно важных микробных продуцентов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1 – разработать стендовую установку и программное обеспечение для исследования процессов культивирования модельных микроорганизмов в условиях контролируемого окислительного стресса;

2 – исследовать изменения ростовых и биосинтетических характеристик модельных микроорганизмов при воздействии УФ облучением и пероксидом водорода, подобрать оптимальные дозы стрессоров;

3 – проанализировать действие факторов окружения, обладающих антистрессовым эффектом при окислительном стрессе;

4 – исследовать устойчивость к факторам окислительного стресса микроорганизмов различного физиологического состояния;

5 – исследовать совместное действие стрессорных и антистрессорных факторов в процессах культивирования модельных микроорганизмов;

6 – разработать методы, обеспечивающие поддержание состояния оптимального окислительного стресса для увеличения выхода целевого продукта;

7 – разработать автоматизированную систему культивирования и синтеза целевых продуктов в условиях контролируемого окислительного стресса.

Научная новизна. На примере дрожжей *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* и галобактерий *Halobacterium salinarium* показана перспективность использования контролируемого окислительного стресса для повышения эффективности ферментации.

Обнаружено, что контролируемое совместное воздействие стрессоров (H_2O_2 , мягкий ультрафиолет) и антистрессорных факторов (видимый свет низкой интенсивности, антиоксиданты, удаление ингибиторов биосинтеза) улучшает ростовые и биосинтетические характеристики модельных микроорганизмов: повышает выход биомассы, удельную скорость роста, бродильную активность и устойчивость к закислению у дрожжей, способствует поддержанию продуктивности биореактора с высокоплотной культурой дрожжей, повышает уровень накопления бактериородопсина при минимальном накоплении каротиноидов у галобактерий. Показано, что комбинированное действие ультрафиолета и видимого света или монохроматического излучения может выступать в качестве инструмента для управления ростом гетеротрофных микроорганизмов, не чувствительных в обычных условиях (без УФ облучения) к освещению.

Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показана целесообразность использования посевного материала, предобработанного H_2O_2 . Подобраны условия выращивания засевной культуры в условиях окислительного стресса (внесение H_2O_2 в предстационарной фазе роста разово в дозе 0,3–0,6 г/л при освещении суспензии фоновым дневным светом), обеспечивающие в основном процессе в аэробных или микроаэрофильных условиях увеличение удельной скорости роста на 15–25%, выхода биомассы на 15–25%, сокращение лаг-фазы более чем в 2 раза; в анаэробных условиях – увеличение удельной скорости роста на 30–50% и сокращение времени сбраживания субстрата на 30%.

Впервые установлено, что в процессе глубинного культивирования галобактерий (ГБ) *H. salinarium* рост культуры и синтез бактериородопсина (БР) в сильной степени зависят от наличия ингибиторов, предположительно продуктов химического и/или фотохимического окисления компонентов среды, образующихся при ее хранении или использовании. С учетом этих факторов получен биосинтетически активный штамм галобактерий, подобраны оптимальные условия (среда, режим аэрации, подготовка посевного материала, освещение) и разработаны режимы культивирования (доливная культура, внесение антиоксидантов, обработка адсорбентами), позволившие увеличить содержание бактериородопсина в клетках и его выход за цикл ферментации с 70–75 мг/л за 6–7 сут. до 1700–1750 мг/л за 8 сут. при одновременном повышении стабильности процесса и снижении содержания каротиноидов, что существенно упрощает процедуры выделения бактериородопсина и его очистки.

Практическая значимость. На основе выявленных закономерностей разработаны новые методы культивирования микроорганизмов в условиях контролируемого окислительного стресса. Предложены система и аппаратура культивирования, названная «солнечным» биореактором, в котором среда освещается одновременно светом видимого и мягкого ультрафиолетового УФА, УФБ диапазонов, что имитирует действие излучения солнца на поверхности земли, или подвергается воздействию подобранных малых доз пероксида водорода и видимого света.

Вариант культивирования дрожжевой засевной культуры при одновременном воздействии пероксида водорода и видимого света предложен для улучшения показателей (жизнеспособности, бродильной активности дрожжей) при получении спирта из зерносырья. Предложение вошло в план перспективных мероприятий Серебряно-Прудского биохимического завода (Московская обл.).

Для управления процессами ферментации галобактерий разработаны программное обеспечение «BioDrome 1.0», автоматизированный комплекс и метод непрерывного контроля уровня накопления биомассы и бактериородопсина. Возможности комплекса позволяют регистрировать и регулировать параметры ферментации, работать в режимах культивирования с обратной связью по показаниям датчиков, а также следить за процессом в режиме удаленного доступа. Согласно предварительной технико-экономической оценке реализация предложенных решений на базе разработанного автоматизированного комплекса и методов культивирования галобактерий при промышленном получении бактериородопсина (в составе пурпурных мембран) позволит снизить его стоимость с 500–5000 руб. за 1 мг (в зависимости от чистоты продукта) до 20–100 руб. за 1 мг. Отдельные элементы комплекса и разработанное программное обеспечение используются в научных исследованиях на стендах ГУП НПО «Астрофизика», ВНИИ Молочной промышленности, а также в учебном процессе в РХТУ им. Д.И. Менделеева (каф. биотехнологии, каф. процессов и аппаратов).

Разработанные новые способы культивирования микроорганизмов защищены патентами РФ.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены на российских и международных научно-технических конференциях и конгрессах: Международная конференция «Успехи в химии и химической технологии» (Москва, 2002 г.); Международная конференция «Математические методы в технике и технологиях» (Кострома, 2004); конференция «Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LabView и технологии National Instruments» (Москва, 2003 г.); V и VI Международный Форум «Высокие технологии XXI века» (Москва, 2004 г., 2006 г.); European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004, Oostende, Belgium); Международная школа-конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва-Пушино, 2006 г.); I, III, IV Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2005, 2007 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 7 статей, 8 тезисов сообщений, получен 1 патент РФ на изобретения и поданы 2 заявки на патентование.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, трех глав по результатам экспериментальной работы, выводов, списка использованной литературы, включающего ____ источников. Работа изложена на ____ стр. машинописного текста, иллюстрирована ____ рисунками, ____ таблицами. В приложении представлены протоколы и акты внедрений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований были дрожжи *Candida tropicalis* шт. СК-4 и *Saccharomyces cerevisiae* шт. SL-100 и Meуen расы Т 985. Дрожжи выращивали в колбах на стандартной минеральной среде с сахарозой, в стандартных условиях культивирования, в асептических условиях. О накоплении биомассы судили по изменению оптической плотности на КФК-3.01 ($\lambda=540$ нм, $l=3$ мм) с последующим пересчетом на сухой вес.

Содержание сахарозы определяли модифицированным методом Бертрана-Шарля. Содержание НАД⁺ определяли спектрофотометрически по нарастанию поглощения при 340 нм в присутствии этанола и алкогольдегидрогеназы. Содержание этанола определяли методом ГЖХ. Бродильную активность определяли методом вытеснения.

Другим объектом исследований были галобактерии. Использовались штаммы *Halobacterium salinarium* шт. 353П, ST-033, а также спонтанные мутанты, полученные из шт. ST-033 облучением ультрафиолетом. Среда для выращивания галобактерий содержала, г/л: NaCl – 250, MgSO₄×7H₂O – 20, KCl – 2, цитрат Na – 3, CaCl₂ – 0,2, триптон (пептон) – 5, дрожжевой экстракт – 2, глицерин – 4, вода – водопроводная. Состав и содержание органических компонентов среды варьировали. Культивирование в 100 мл колбах проводили в периодических условиях на

качалке G10 (New Brunswick) при 150 об/мин, температуре 37–38 °С, объеме среды в колбах 25–75 мл. Уровень аэрации регулировали степенью заполнения колб. Объем посевного материала (клетки стационарной фазы роста) составлял 2–20% об. Время культивирования – 3–8 сут, в зависимости от целей эксперимента.

Опыты в лабораторном биореакторе с обечайкой из стекла, рабочим объемом 3 л («Фермус–3», НИЦ «Биоавтоматика», г. Н. Новгород) проводили при 37–38 °С в режиме глубинного культивирования в стерильных условиях с автоматическим контролем pH, pO₂, Eh с использованием разработанного программного обеспечения «BioDrome 1.0» на базе инструментария LabView 7.0 фирмы National Instruments (США). Величина pH (6,8–7,2) регулировалась подтитровкой NaOH, содержание кислорода поддерживалось и изменялось расходом подаваемого воздуха и/или интенсивностью перемешивания. В качестве источников мягкого УФА и УФБ-излучения использовали лампы PHILIPS TL 20W/05 и ДРШ-100 со светофильтрами ФС-6 и УФС-8. В качестве источников лазерного излучения использовали He-Ne лазер и Аргон-ионный лазер. Интенсивность освещения определяли с помощью люксметра – УФ-радиометра ТКА-01/3 (г. Санкт-Петербург). Облучение УФ в биореакторе проводили через выносной контур с кварцевой кюветой. Колбы и биореактор освещали лампами дневного света или светодиодными

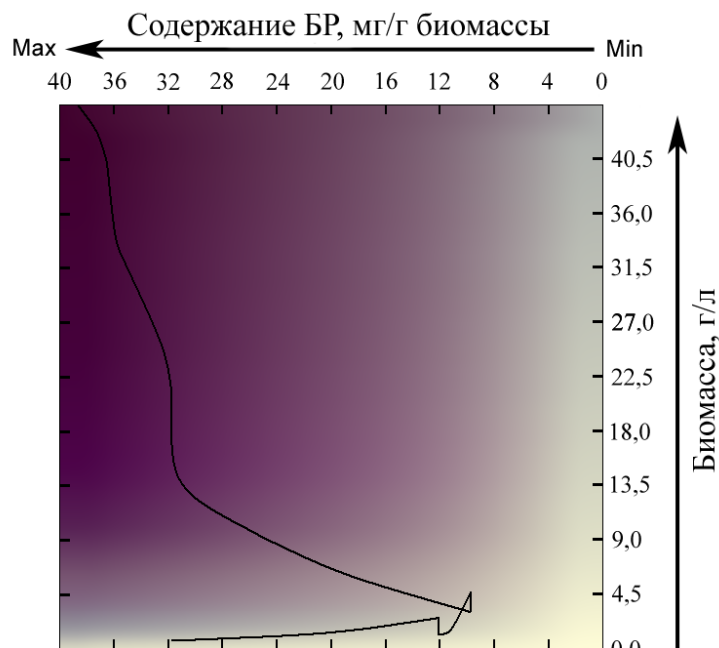


Рис. 1 Карта цвета для определения содержания БР. Кривая – изменение цвета суспензии по ходу культивирования.

матрицами с интенсивностью 10-150 мВт/л (в пересчете на длину волны $\lambda=555$ нм).

При культивировании галобактерий использовали адсорбент (активированный уголь АГ-3) для удаления из среды ингибиторов роста. Для повышения выхода биомассы ГБ и содержания БР в реактор вносили субстратную подпитку, представляющую концентрированный раствор, содержащий триптон, дрожжевой экстракт и глицерин. Содержание клеток определяли турбидиметрически (спектрофотометр Specord M40, $\lambda=660$ нм, $l=10$ мм).

Динамику накопления БР определяли по разработанному экспресс-методу, основанному на цветовом анализе суспензии без непосредственного выделения БР: клеточная суспензия, прокачиваемая через кювету ($l=10$ мм) сканируется с помощью CCD матрицы сканера Epson Perfection 1270. Обработка производится в автоматическом режиме с применением разработанной системы «BioDrome 1.0» и использованием калибровки эталонов БР, построенной согласно [Oosterhelt and Stoeckenius, 1974]. Наличие БР и каротиноидов контролировали также по спектрам лизатов галобактерий (Specord M40, $\lambda=400-620$ нм).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Культивирование дрожжей *Candida tropicalis* в условиях окислительного стресса.

Ранее было показано, что умеренные дозы оксиданта, такого как H₂O₂ улучшают показатели ферментационных процессов при культивировании дрожжей *C. tropicalis* на сахарозе [Сафронов, 2004], дрожжей *S. cerevisiae* на сахарозе и зерновом сусле [Сорокодумов, 2005], а также повышают эффективность биодеструкции фенола микробоценозами с доминированием

дрожжей. Однако не была выяснена возможность использования других агентов окислительного стресса, например УФ-излучения; не изучены эффекты адаптации клеток к окислительному стрессу и продолжительность сохранения адаптивных свойств у дрожжевых популяций, а также сочетание действия оксидантов с антистрессорными факторами для усиления позитивных эффектов у стресс-индуцированных культур. Выяснение особенностей физиологических реакций у дрожжей в условиях окислительного стресса для выбора рациональных режимов их культивирования составило первое направление работы.

В качестве еще одного агента окислительного стресса, действие которого во многом аналогично действию H_2O_2 , использовали ультрафиолетовое излучение ближних УФА и УФБ диапазонов спектра. В клетках оба стрессора индуцируют одну и ту же систему антиоксидантного ответа на воздействие этих стресс-факторов.

В лабораторных экспериментах при выращивании дрожжей *S. tropicalis* в колбах при рассеянном освещении и предварительно облученных УФ-излучением выявили стимулирующее действие мягкого ультрафиолета на скорость роста и выход дрожжей. Эффект зависел от физиологического возраста облучаемой культуры (удельной скорости роста и плотности дрожжевой популяции). Заметное положительное действие УФ-излучения проявлялось для активно растущих культур (фаза экспоненциального роста). Оптимальный режим облучения при использовании УФ-лампы «Филипс»: 1 мин для слоя суспензии толщиной 4 мм с ОП=0,7-1 при дозе излучения 1000 Дж/м^2 (250 Дж/л). Режим был апробован при росте дрожжей в биореакторе (источник УФ-излучения – лампа ДРШ-100) в периодических условиях культивирования. О воздействии УФ-излучения на микроорганизмы судили по показателям концентрации растворенного кислорода pO_2 , pH, Eh, выводимых непосредственно на монитор компьютера, и при сравнении кривых роста биомассы. Так как в ответе микроорганизмов на окислительный стресс, индуцируемый ультрафиолетом, может участвовать система фоторепарации, эксперименты проводили в двух вариантах: **с освещением биореактора видимым светом и с затемнением.**

Окислительный стресс вызывали в культуре дрожжей с ОП 0,3–3,0 облучением ультрафиолетом интенсивности 0,5–2 Вт/л при скорости вращения мешалки 150–370 об/мин. Освещение видимым светом интенсивностью 40 мВт/л производили через стеклянную обечайку биореактора.

В отмеченных условиях облучения дрожжи реагируют на действие УФ-излучения как при освещении биореактора, так и в темноте, при этом процесс роста становится чувствительным к действию видимого света. Изменение условий освещения индуцирует у культуры переходное состояние, проявляющееся в преломлении кривой pO_2 : в ускорении или замедлении падения pO_2 , колебаниях в показаниях pO_2 . Такой переходный процесс длится 1–2,5 ч.

При освещении биореактора видимым светом включение УФ-облучения влияет положительно на дыхательную активность дрожжей, а отключение УФ-облучения снижает дыхательную активность. В темновом режиме УФ-облучение снижает дыхательную активность, а его отключение либо не влияет на изменение дыхания либо еще более замедляет падение pO_2 по мере роста дрожжей.

В системе, **постоянно облучаемой ультрафиолетом, подача света стимулирует дыхательную активность**, в то время как отсутствие света либо снижает, либо не влияет на нее. При этом **в отсутствие УФ-облучения дрожжи нечувствительны к воздействию видимого света.**

Отклик дрожжевой популяции на режимы УФ и светового облучения, определяемый по изменениям кривой роста, в целом, коррелировал с характером изменения величины pO_2 . Полученные данные позволяют заключить, что совместное действие оптимальных доз УФ-излучения и видимого света стимулирует рост дрожжей *S. tropicalis*. Стимулирующий эффект был подтвержден в экспериментах, когда дрожжи выращивали при постоянном действии ультрафиолета и света (на всем протяжении цикла развития). В этих условиях возрастала удельная скорость роста, а уровень накопления биомассы повышался на 15–20% по сравнению с вариан-

том без облучения. На величину стимулирующего эффекта влияли концентрации посевного материала и субстрата. Разница по выходу биомассы между облучаемыми УФ на свету и в темноте вариантами была больше при концентрации инокулята менее 0,15 г/л (по асд). В темноте при возрастании внесенной концентрации засевных дрожжей выше 5–6 г/л исчезает отрицательное действие примененных доз УФ-облучения; в диапазоне концентрации дрожжей, чувствительном к воздействию ультрафиолета, положительный эффект УФ-облучения сохраняется при повышении концентрации субстрата в среде; с увеличением интенсивности видимого света положительный эффект существенно не меняется; более интенсивное воздействие УФ-излучения лампы ДРШ на суспензию дрожжей – порядка 5–10 Вт/л – вызывает репрессию роста дрожжей независимо от того, освещается ли содержимое биореактора видимым светом или нет, при этом репрессирующий эффект сохраняется даже при высоких стартовых концентрациях дрожжей.

Из полученных данных следует важный вывод: **гетеротрофные микроорганизмы, подвергнутые стрессовым воздействиям, приобретают чувствительность к видимому свету низкой интенсивности.** При этом стрессовое состояние может быть вызвано различными стрессорами: ультрафиолетом, пероксидом водорода, механическим воздействием (замораживанием-оттаиванием) и другими.

Чувствительность стрессированных клеток к видимому свету может быть объяснена индукцией системы фоторепарации с фотолиазой в качестве ключевого фермента.

Таким образом, обнаружен новый подход к улучшению показателей микробных ферментаций, включающий одновременное воздействие на выращиваемую культуру стрессорного фактора, например, оптимальных доз мягкого ультрафиолета или пероксида водорода, и антистрессового фактора – видимого света. Такое сочетание стрессорного-антистрессового воздействия можно охарактеризовать как **контролируемый окислительный стресс**, и использовать для управляемого культивирования гетеротрофных микроорганизмов. По-видимому, этот механизм имеет место в природе.

Комбинированное воздействие видимого света и мягкого ультрафиолета в определенной степени имитирует природное солнечное излучение, имеющее не только видимую, но и УФА и УФА-составляющую и воздействующее на микроорганизмы, обитающие на поверхности воды, почвы, растений.

Исследование роста дрожжей *C. tropicalis* при воздействии УФ-излучения и лазерного излучения видимого диапазона спектра.

Приведенные выше данные свидетельствуют, что в условиях окислительного стресса микроорганизмы приобретают чувствительность к воздействиям, которые принято относить к низкоэнергетическим, в частности к видимому свету низкой интенсивности (10–100 мВт/л). Первичным рецептором этого воздействия может быть фотолиаза, входящая в систему фоторепарации, реагирующая на свет в диапазонах 370–390 нм – для фотолиазы 1-го типа и 430–450 нм – для фотолиазы 2-го типа [Eker et al., 1994, Kim Sang-Tae et al., 1993].

Для подтверждения предположения о чувствительности стресс-индуцированных дрожжей к низкоинтенсивному свету дрожжи облучали низкоинтенсивным светом лазеров (НИЛИ): гелий-неонового (красный свет) и аргон-ионного (сине-зеленый свет).

В контроле – без индукции стресса ультрафиолетом не было значимых различий между вариантами облучения лазерами в темноте или при видимом свете. В опыте, – предварительно стрессированные ультрафиолетом дрожжи становились чувствительными к свету лазера. В вариантах облучения инокулята оптимальной дозой УФ последующее облучение He-Ne лазером с интенсивностью 3 мВт/л увеличивало прирост биомассы на 10–15%, при этом только при использовании в качестве инокулята клеток экспоненциальной фазы роста (но не стациона-

нарных). Аналогичные эффекты давало облучение сине-зеленым светом Ag-ионного лазера интенсивностью около 10 мВт/л.

Для суспензии дрожжевых клеток в лаг-фазе ОП 0,5-1,0 оптимальная доза предоблучения ультрафиолетом составляла около 1000 Дж/л, а для суспензии с ОП 10–100 – около 10000 Дж/л.

Для стимуляции роста дрожжей в ферментере можно рекомендовать режимы: предоблучение ультрафиолетом с интенсивностью 10–100 мВт/л при последующем или одновременном монохроматическом освещении видимым светом с интенсивностью 40 мВт/л, или 1–10 мВт/л – при освещении красным монохроматическим светом, или 5–50 мВт/л – сине-зеленым монохроматическим светом, при дозе засеваемого материала в периодической культуре 0,08–0,8 ед. опт. пл. (0,06–0,6 г асд/л).

Позитивное воздействие окислительного стресса на рост дрожжей р. *Candida* может отражать их приспособленность к экологическим условиям обитания на поверхности растений, в ситуациях избытка углеводного субстрата, кислорода и одновременно освещенности солнечным светом.

2. Исследование процесса культивирования дрожжей-сахаромицетов в присутствии агентов окислительного стресса.

Природные условия обитания широко используемых в промышленности дрожжей-сахаромицетов и дрожжей р. *Candida* схожи, однако в отличие от первых, представители р. *Candida*, в частности *C. tropicalis* не являются истинными бродильщиками. Однако в наших экспериментах наблюдалось повышение их бродильной активности после воздействия оптимальных доз факторов окислительного стресса. Поэтому было интересно исследовать воздействие окислительного стресса (пероксид водорода и мягкий ультрафиолет) на рост сахаромицетов.

В задачи входило более детальное выяснение особенностей отклика дрожжей на окислительный стресс с учетом возможного вклада фотореактивации и скорости адаптации дрожжей к воздействию разных стрессоров в условиях контролируемого освещения культур, а также получение разных линий дрожжей при последовательных пассажах в асептических условиях. Дрожжи выращивали при освещении и без освещения. Варьировали: аэробные, микроаэрофильные, анаэробные условия роста при воздействии разных концентраций H₂O₂ (дозы мягкого УФ), количество инокулята и субстрата (сахарозы) в ферментационной среде.

В условиях освещения опыты выявили: чувствительность сахаромицетов к сублетальным дозам агентов окислительного стресса; зависимость реакции клеток от фазы роста культуры и концентрации субстрата; адаптацию дрожжей к стрессу при последовательных пассажах в условиях воздействия сублетальных доз окислителей. При культивировании с малой концентрацией субстрата – 5 г/л клетки менее устойчивы к воздействию H₂O₂ и мягкого УФ, чем при его больших концентрациях – 30 г/л и 150 г/л, что проявляется в увеличении доли мертвых клеток. По мере адаптации дрожжей к H₂O₂ при последовательных пересевах доля мертвых клеток снижается. Так, при выращивании штамма Meulen T 985 при 30 г/л сахарозы и внесении H₂O₂ в концентрациях 0,6 г/л и 0,3 г/л (культура конца экспоненциальной фазы, содержание биомассы 2,2–2,4 г/л) в первом случае доля мертвых клеток снижалась с 70% в первом пассаже до 25% в десятом; во втором – с 60% в первом пассаже до 35% в десятом, что говорит об адаптационных изменениях. При содержании сахарозы 5 г/л количество мертвых клеток во всех пассажах остается практически неизменным.

Адаптированные к H₂O₂ линии дрожжей при последующем пересеве в свежую среду и культивировании без внесения пероксида имели более высокие показатели физиологической активности, что проявлялось в повышении уровня накопления биомассы, скорости роста, устойчивости к низким рН. Так, при концентрации субстрата 30 г/л, внесении

0,3 г/л H_2O_2 и без подтитровки среды в первом пассаже к концу роста дрожжей рН достигал 2,35, в десятом – 2,12; при внесении 0,6 г/л H_2O_2 в первом пассаже рН падал до 2,35, а в десятом – до 2,05. При этом уже в пятом пассаже во втором случае уровень биомассы составлял 2,7 г/л по сравнению с 2,2 г/л в первом пассаже. Скорость роста к концу перепассирования увеличивалась на 15–20%. Подобным же образом клетки дрожжей реагировали на облучение мягким УФ в пассажах.

При адаптации к H_2O_2 или к мягкому УФ решающее значение имел фактор освещения. В условиях полной темноты клетки не адаптировались ни к мягкому УФ, ни к пероксиду и при пересевах погибали. Однако достаточно было рассеянного дневного освещения (например, света с интенсивностью 40 мВт/л), чтобы кардинально изменилась выживаемость культуры. Таким образом, **свет в данном случае выступает как антистрессор**, вероятно, через механизм фоторепарации [Jagger et al., 1970, Eker, 1986]. Аналогичные вышеописанным эффекты адаптации к воздействию пероксида водорода наблюдали у штамма SL-100 при концентрации сахарозы 150 г/л при росте дрожжей в аэробных условиях и в микроаэрофильном режиме. В анаэробных условиях дрожжевые клетки не адаптировались к внесению пероксида: доля жизнеспособных клеток не возрастала.

Таким образом, выявлена корреляция между возрастанием числа жизнеспособных клеток, уровнем накопления биомассы, удельной скоростью роста и устойчивостью к неоптимальным рН в пересевах линий дрожжей, выросших при оптимальных условиях внесения H_2O_2 (или воздействия мягкого УФ). Адаптация выражалась также в повышении устойчивости клеток к внесению повышенных доз H_2O_2 – 1,8–2,4 г/л, тогда как в контрольных вариантах клетки погибали при дозе 1,2 г/л пероксида. Такая перекрестная адаптация дрожжей к H_2O_2 , УФ и рН подтверждает ранее полученные данные о позитивном эффекте преадаптации дрожжей к рН и пероксиду для повышения их устойчивости к УФ- или гамма облучению [Singh et al., 1999].

При пересевах дрожжей, адаптированных к H_2O_2 , на среду без пероксида водорода, устойчивость клеток к стрессорным воздействиям сохраняется лишь в первом пассаже. При 2-ом пересеве положительные эффекты (устойчивость к внесению H_2O_2) нивелируются и к 3-му – показатели роста и активности культуры возвращаются к уровню контроля, то есть наблюдается быстрая деадаптация дрожжей. Возможно процессы адаптации обусловлены индукцией систем репарации, помогающих клеткам преодолевать неблагоприятные воздействия, при этом, скорее всего, не происходит отбора относительно устойчивых субклонов на генетическом уровне, что согласуется с литературными данными [Davies et al., 1995].

Следующий этап исследований включал культивирование дрожжей в лабораторном биореакторе с поддержанием рН (4–4,5), при достатке кислорода в среде, или в анаэробном режиме, при уровне освещенности не менее 40 мВт/л или в темноте, при использовании в качестве инокулята неадаптированных (рис. 2А) или адаптированных к пероксиду (5-й и 10-й пассажи) дрожжей (рис. 2В, 2С). Основная задача – выяснение влияния преадаптации инокулята к стрессу на показатели роста и брожения основной культуры. В результате этой серии экспериментов выявлено следующее:

1.) На свету по сравнению с контролем (рис. 2А) продолжительность лаг-фазы в культуре дрожжей с инокулятом 10-го пассажа (рис. 2С) снижается более чем в 2 раза.

2.) При освещении в культуре с преадаптированным к H_2O_2 инокулятом количество накопленной биомассы увеличивается по сравнению с контролем, а именно при использовании адаптированных дрожжей 5-го пассажа – на 11%, а 10-го пассажа – на 19%.

3.) Добавление пероксида в предстационарную фазу роста (на 17–22 ч культивирования) индуцировало автолиз клеток как в адаптированной затемненной (5 пассаж), так и неадаптированной культурах (рис. 2А, 2В). Однако внесение H_2O_2 при освещении не индуцировало гибель

клеток у адаптированной линии (рис. 2В, 2С), то есть свет протектировал клетки при окислительном стрессе.

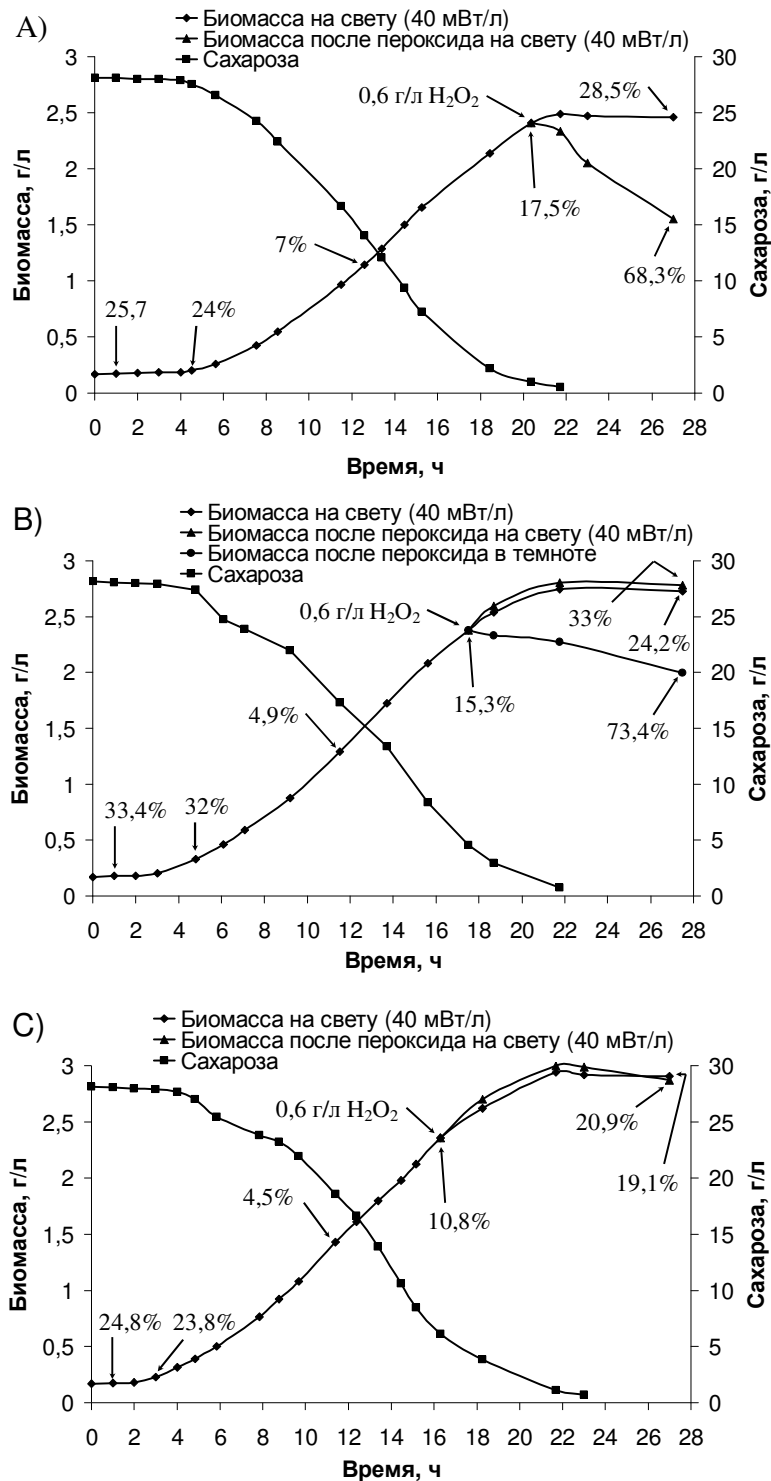


Рис. 2. Накопление биомассы и потребление субстрата штаммом сахаромикетов *Meuен T 985* при росте в аэробных условиях в биореакторе (сахароза 30 г/л).

А – неадаптированная к H_2O_2 культура (контроль); В – адаптированная к H_2O_2 линия 5-го пассажа; С – адаптированная к H_2O_2 линия 10-го пассажа.

Цифрами у стрелок указана доля мертвых клеток.

При добавлении H_2O_2 во всех вариантах опыта наблюдали резкое усиление дыхательной активности (рис. 3), свидетельствующее о существенном изменении окислительно-восстановительного баланса клетки. Это могло приводить к изменению соотношения $НАД^+/НАДН$ по мере адаптации к H_2O_2 в дрожжевых клетках, что косвенно было выявлено по увеличению содержания в них $НАД^+$ (рис. 4).

Анализ количества $НАД^+$ в клетках адаптированных линий дрожжей (инокулят 5-го и 10-го пассажей) через 3 ч после внесения H_2O_2 показал, что в адаптированных линиях его было существенно больше чем в клетках неадаптированной линии. Активация $НАДН$ -зависимых систем в адаптированных линиях после внесения H_2O_2 , может приводить к переводу большей части $НАДН$ в окисленную форму, чему дополнительно способствует ингибирование при воздействии пероксида основных поставщиков $НАДН$: ЦТК и гликолиза. Соответственно, наблюдаемое усиление дыхательной активности повышает баланс $НАД^+/НАДН$ [Godon, 1998].

В анаэробной культуре (рис. 5А), развивающейся в темноте, засеянной клетками адаптированной к H_2O_2 линии дрожжей, выращенных в аэробных условиях (инокулят линии 5-го пассажа, рис. 2В), клетки в лаг-фазе продолжали отмирать, лаг-фаза составляла 47 ч, удельная скорость роста в экспоненциальной фазе $0,044\text{ ч}^{-1}$, конечный выход биомассы был низким (2,2 г/л), в середине экспоненциальной фазы доля мертвых клеток достигла 42%, а к концу культивирования 92% (рис. 5А), при этом

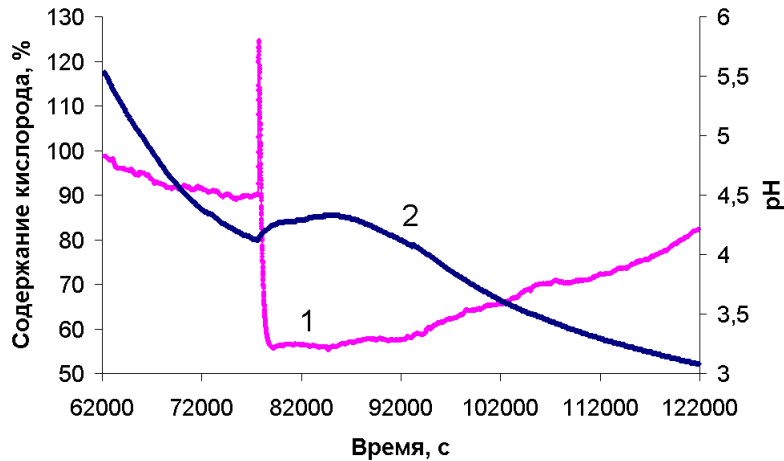


Рис. 3. Усиление потребления кислорода после внесения H_2O_2 в культуру с адаптированным инокулятом 10-го пассажа (см. рис. 2С).

1 – содержание кислорода, %; 2 – рН.

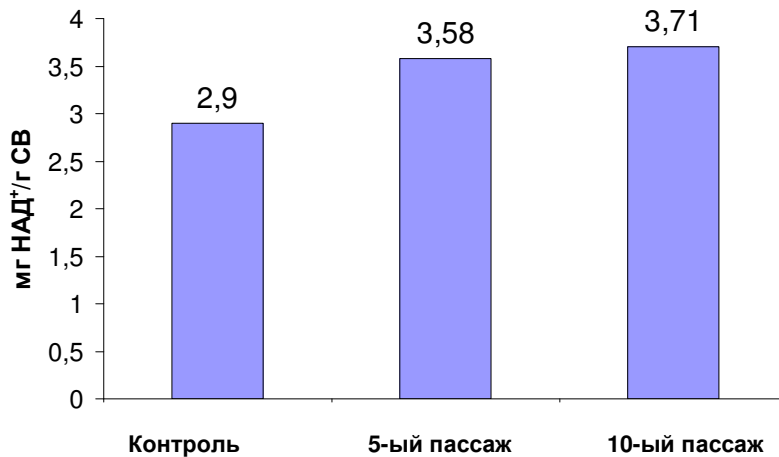


Рис. 4. Изменение содержания $НАД^+$ в линиях дрожжей по мере адаптации к перексиду водорода, через 3 ч после внесения пероксида в культуру предстационарной фазы.

дозами стрессорных факторов (пероксида водорода или мягкого ультрафиолета) и антистресс-фактором, в частности, видимым светом, что позволяет предложить новый способ ведения процесса спиртового брожения. По предлагаемому способу для поддержания высокой физиологической активности дрожжей-сахаромицетов посевной материал получают при росте дрожжей в аэробных или микроаэрофильных условиях и совместном воздействии видимого света и H_2O_2 или мягкого ультрафиолета диапазона УФА/УФБ.

Линию стресс-индуцированных дрожжей поддерживают путем пересевов на среду с содержанием сбраживаемых углеводов 30 г/л и более, при периодическом внесении H_2O_2 в дозах 0,3–0,6 г/л, содержании дрожжевых клеток не менее 1–2 г/л, при освещении культуры видимым светом с интенсивностью около 40 мВт/л. Основной ферментационный процесс также необходимо вести в условиях освещения видимым светом той же интенсивности, но без внесения пероксида водорода.

бродильная активность была невелика (рис. 6А), продолжительность брожения составила около 93 ч, а содержание этанола 4,1%.

В культурах, растущих при освещении (рис. 5С, D), засеянных клетками линий, адаптированных к H_2O_2 , рост и брожение были существенно интенсивнее (рис. 5С, D; 6С, D) по сравнению как с предыдущим опытом, так и с контрольной культурой, засеянной клетками, не подвергавшимися воздействию пероксида водорода (рис. 5В, 6В).

Наибольшую удельную скорость роста ($0,067 \text{ ч}^{-1}$) в экспоненциальной фазе и бродильную ак-

тивность имела культура с инокулятом 10-го предадаптированного пассажа, далее (по убыванию) – вариант 5-го предадаптированного пассажа ($\mu=0,059 \text{ ч}^{-1}$) и контроль ($\mu=0,046 \text{ ч}^{-1}$). Содержание спирта по окончании брожения во всех вариантах существенно не отличалось и составило 6,2–6,4% масс. Все выявленные закономерности наблюдались и для штамма SL-100.

Таким образом, показана возможность существенного улучшения показателей роста дрожжевых культур и процесса спиртового брожения при сочетанном воздействии на дрожжи оптимальными

Предложенный способ позволяет поддерживать высокую физиологическую активность клеток дрожжей и способствует повышению производительности процесса – сокращению времени брожения на 30%.

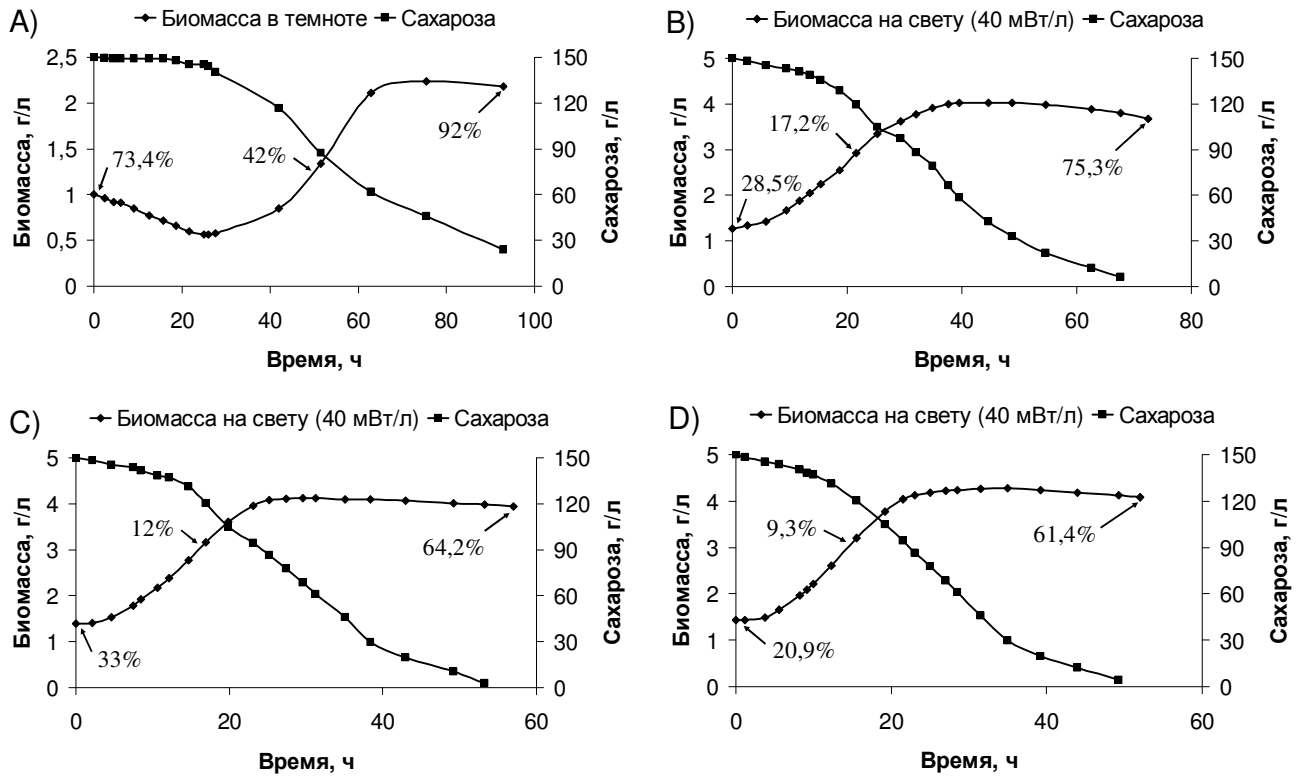


Рис. 5. Динамика накопления биомассы и потребления субстрата клетками штамма Меуен Т 985 при анаэробном культивировании в биореакторе. А – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост в темноте; В – неадаптированная культура (контроль), рост на свету; С – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост на свету; D – адаптированная культура (инокулят – линия 10-го пассажа), рост на свету.

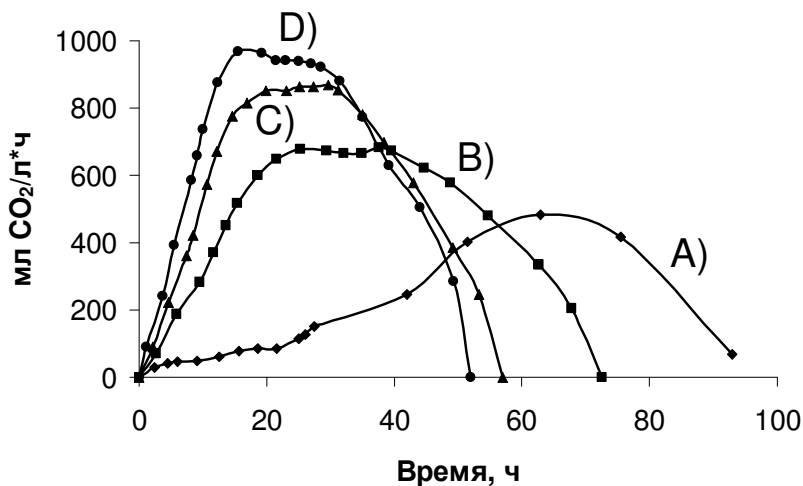


Рис. 6. Бродильная активность при анаэробном культивировании штамма сахаромецетов Меуен Т 985 в биореакторе. А – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост в темноте; В – неадаптированная культура (контроль), рост на свету; С – адаптированная культура (инокулят – линия 5-го пассажа), рост на свету; D – адаптированная культура (инокулят – линия 10-го пассажа), рост на свету.

3. Модификация культивирования галобактерий для получения бактериородопсина.

Фототрофные галофильные бактерии р. *Halobacterium* являются практически важными продуцентами бактериородопсина (БР) [Oesterhelt, 1971], находящего в настоящее время все более широкое применение в биомолекулярных устройствах [Birge, 1990, Wu et al., 2002, Seitz et al., 2000]. Среда обитания галобактерий – сильно минерализованные озера и лиманы, зачастую недостаток кислорода, интенсивное освещение, солнечная иррадиация способствовала выработке ими адаптивных механизмов экстремофилии. Исследования галобактерий могут служить основой для разработки более совершенных по сравнению с существующими способов культивирования.

Наблюдаемые при стандартном культивировании [Mukohata et al., 1982] неудовлетворительные воспроизводимость и нестабильность результатов, зачастую плохой рост галобактерий, вариабельность в морфологии и цвете колоний и клеток могут быть обусловлены как свойствами штаммов, так и большой зависимостью от состава органических компонентов питательных сред и наличия в них примесей. В нашей работе с использованием процедуры облучения ультрафиолетом была получена серия мутантов, рост которых и способность к синтезу БР были исследованы на среде

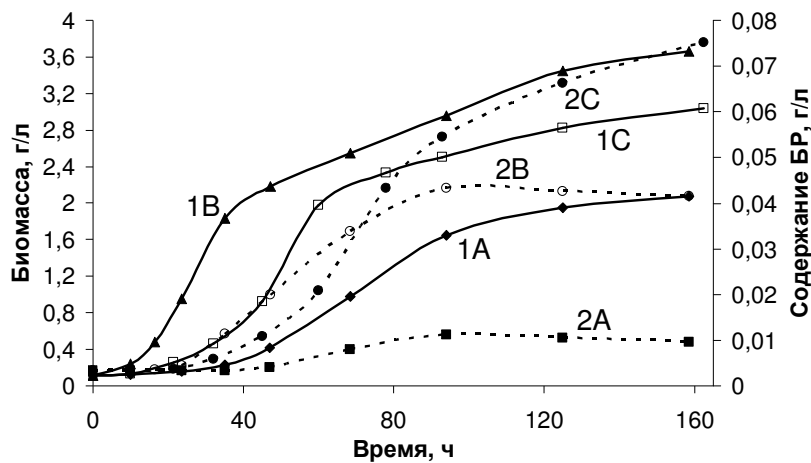


Рис. 7. Сравнительная характеристика роста биомассы и накопления БР штаммом UM-17 на средах с различным составом органических компонентов.

А – 5,5 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 4 мл/л глицерина; В – 5 г/л триптона (Hispanlab), 2 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 4 мл/л глицерина; С – 5 г/л триптона (Serva), 2 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 4 мл/л глицерина. 1 – накопление биомассы, 2 – накопление бактериородопсина.

с триптоном (Serva) – 5 г/л, дрожжевым экстрактом (Organotechnie) – 2 г/л и глицерином – 4 мл/л (рост в колбах). Был отобран наиболее перспективный штамм UM-17, показавший наибольшую способность к синтезу БР при приемлемых ростовых характеристиках.

Характеристики роста штамма UM-17 и накопление им БР были проверены при использовании с триптоном, пептоном, дрожжевым экстрактом различных марок и варьировании их концентрации, а также варьировании количества посевного материала. На рис. 7 представлена динамика накопления биомассы и синтеза БР штаммом UM-17 на некоторых из сред. Среда, содержащая 5 г/л триптона или пептона, 2 г/л дрожжевого экстракта и 4 мл/л глицерина, оказались наиболее предпочтительными. Однако рост бактерий и синтез БР на них сильно зависели от марки используемых триптона или пептона. Наилучшим оказался триптон фирмы Serva (рис. 7, вариант С), на среде с которым конечный уровень биомассы составил 3 г/л, удельная скорость роста в экспоненциальной фазе – $0,054 \text{ ч}^{-1}$, максимальное накопление БР – 75 мг/л. На среде с триптоном Hispanlab выход биомассы был выше – 3,7 г/л, удельная скорость роста – $0,1 \text{ ч}^{-1}$, но накопление БР меньше – 43–44 мг/л. Марка дрожжевого экстракта (Hispanlab, Organotechnie, Difco) на рост галобактерий существенно не влияла. Рост штамма ST-033 на тех же питательных средах был аналогичен, однако накопление им бактериородопсина составило лишь 55–60% от уровня штамма UM-17.

Как видно из динамики роста бактерий (рис. 7), в фазе линейного роста, обусловленной в том числе дефицитом кислорода, синтез БР продолжается, но до определенного момента, после которого на некоторых средах происходит падение содержания БР.

Качественные изменения в состоянии культуры хорошо прослеживаются по спектрам лизатов галобактерий, выращенных на средах с триптоном разных марок (рис. 8). При использовании триптона Hispanlab ярко выраженные пики каротиноидов проявляются уже на 158 ч культивирования. Содержание БР к этому времени составляет 44 мг/л, а на 210 ч падает до 38 мг/л. При использовании среды с дрожжевым экстрактом, но без триптона или пептона, пики каротиноидов проявляются еще раньше. Последующие опыты проводили со штаммом UM-17, растущим на среде,

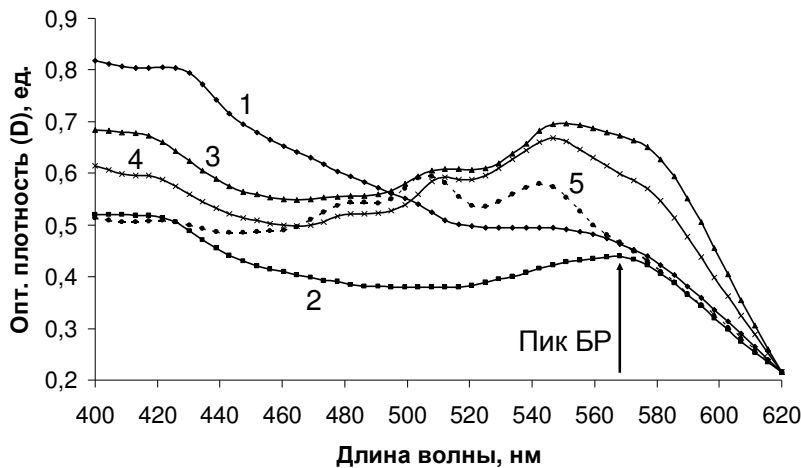


Рис. 8. Изменения в спектрах лизатов клеток культур штамма UM-17 разного возраста, выращенных на: 1–4 – среде с триптоном Serva, 5 – среде с триптоном Hispanlab. Время культивирования: 1 – 45 ч; 2 – 93 ч; 3 – 162 ч; 4 – 210 ч, 5 – 158 ч.

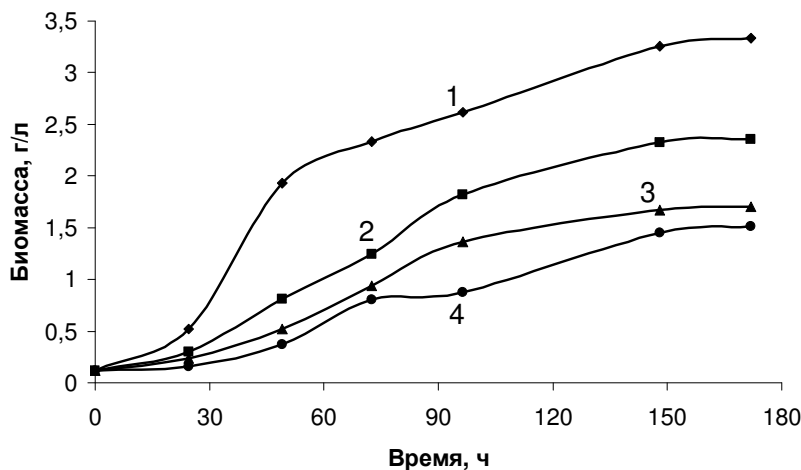


Рис. 9. Влияние «возраста» питательной среды на накопление биомассы штаммом UM-17, инокулят вносили в: 1 – свежеприготовленную среду, 2 – 2 сут. аэрации и освещения среды до засева, 3 – 4 сут. аэрации и освещения среды до засева, 4 – 6 сут. аэрации и освещения среды до засева.

обеспечившей максимальный синтез бактериородопсина (триптон Serva с дрожжевым экстрактом Organotechnie и глицерином).

Выбор направления дальнейших исследований был основан на наблюдениях, предполагавших наличие эффекта старения среды при ее хранении. Предположительно старение могло быть связано с образованием продуктов химического и/или фотохимического окисления органических компонентов, способных ингибировать рост бактерий и биосинтез БР. При культивировании на среде, хранящейся при комнатной температуре и дневном освещении в течение 2-х суток, наблюдались ухудшение роста галобактерий и накопления БР. Аналогичные, но более интенсивные процессы старения среды могут протекать, очевидно, и в ходе культивирования галобактерий (5–7 суток роста при температуре 37–38 °С и аэрации). Известно, что такие соединения как липиды, которые могут входить в состав примесей используемых органических субстратов или экскретироваться, могут подвергаться перекисному окислению [Кудряшов, 2004] равно как и другие соединения. Образовавшиеся продукты окисления могут оказывать токсическое действие на клетки, вызывать в них состояние окислительного стресса и индуцировать

синтез веществ-антиоксидантов, участвующих в ответе бактерий на стресс-факторы. В частности, у галобактерий такими антиоксидантами являются каротиноиды [Карнаухов, 1988, Sies et al., 1992, Krinsky, 1998].

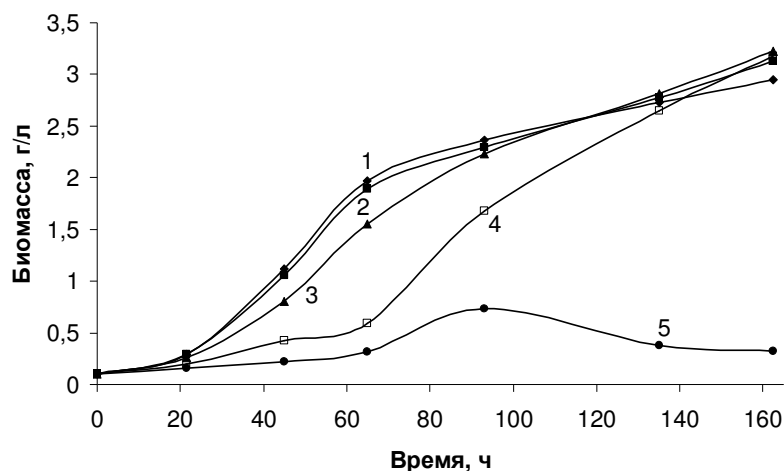


Рис. 10. Динамика накопления биомассы штамма UM-17 при внесении отработанной культуральной жидкости в питательную среду: 1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Во всех вариантах среды содержали одно и то же количество органического субстрата.

Таким образом, вероятно, в питательной среде протекают процессы химического или фотохимического окисления ее компонентов, приводящие к ингибированию роста галобактерий, синтеза ими БР и индукции синтеза каротиноидов, что определяется по более раннему проявлению пиков каротиноидов в спектрах лизатов. Можно предположить, что продукты окисления участвуют в регуляции синтеза каротиноидов и БР на клеточном уровне.

Накопление окисленных продуктов – ингибиторов роста и биосинтеза БР, при выращивании бактерий на свежеприготовленной питательной среде происходит по ходу культивирования в результате упомянутых процессов, а также окисления образующихся при росте галобактерий метаболитов. Их совместное действие приводит к замедлению и торможению роста галобактерий и накопления ими бактериородопсина. На рис. 10–12 представлены результаты опытов с внесением отработанной культуральной жидкости (ОКЖ) в питательную среду. Существенное замедление роста наблюдается, когда содержание ОКЖ в исходной питательной среде составляет около половины общего объема среды (рис. 10).

Снижение в уровне накопления БР начинается уже при внесении ОКЖ в объеме 1/5 от общего объема питательной среды, а спектры лизатов клеток в этих вариантах демонстрируют, что с увеличением доли внесенной ОКЖ увеличивается содержание каротиноидов по отношению к содержанию БР (рис. 11,12).

Основываясь на полученных данных были предложены приемы культивирования, нивелирующие отрицательные воздействия продуктов окисления. Апробированы следующие подходы: 1 – **культивирование при дефиците кислорода** (для уменьшения количества окисленных продуктов – ингибиторов); 2 – **культивирование с доливом свежеприготовленной среды** (за счет разбавления снижается содержание токсичных окисленных продуктов); 3 – **внесение антиокси-**

С целью выяснения роли «старения» среды в опытах стерильную среду выдерживали в колбах на качалке без засева 2, 4, 6 суток при аэрации и освещении, после чего вносили инокулят (рис. 9).

Как видно из представленных данных, уровень накопления биомассы закономерно снижался по мере «старения» среды перед посевом. К концу культивирования на среде 6 суточного возраста накопление биомассы составило лишь около 50% по сравнению с использованием свежеприготовленной среды. Содержание БР после 160 ч культивирования галобактерий составило: для свежеприготовленной среды – 72 мг/л, при использовании 2-суточной питательной среды – 37 мг/л, 4-суточной – 22 мг/л, 6-суточной – 14 мг/л.

дантов; 4 – подбор условий освещения (стимулирование синтеза БР при одновременном уменьшении фотохимического воздействия на среду); 5 – селективное извлечение ингибиторов сорбентом в процессе роста культуры.

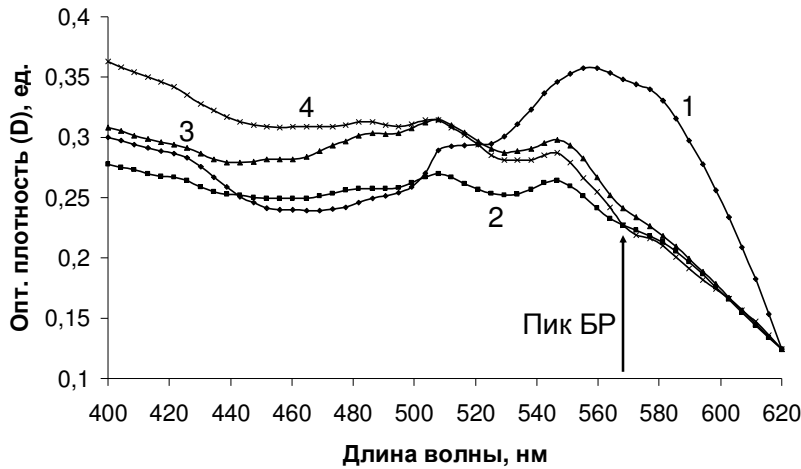


Рис. 11. Спектры лизатов биомассы штамма UM-17 при культивировании с внесением отработанной культуральной жидкости в питательную среду: 1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Во всех вариантах среды содержали одно и то же количество органического субстрата.

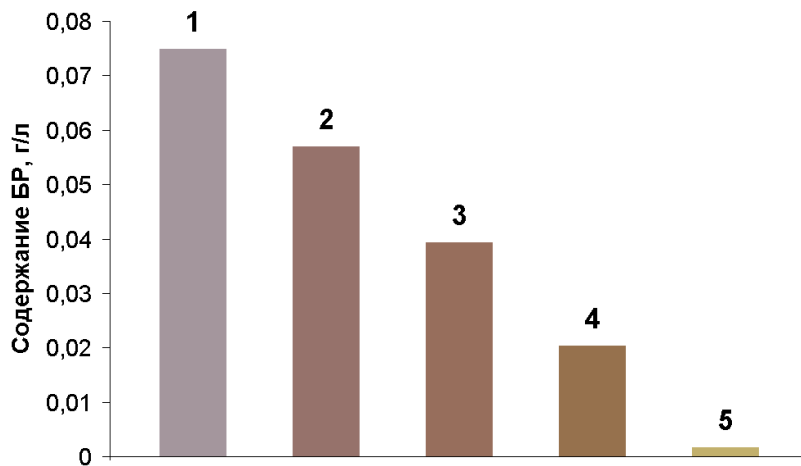


Рис. 12. Цвет суспензии и уровень накопления БР штаммом UM-17 при культивировании с внесением отработанной культуральной жидкости в питательную среду: 1 – контроль, без внесения ОКЖ, 2 – с внесением 1/5 части ОКЖ от общего объема, 3 – 2/5 объема, 4 – 3/5 объема, 5 – 4/5 объема. Во всех вариантах среды содержали одно и то же количество органического субстрата.

Крайне важно, что в этом варианте культивирования в спектре лизата клеток галобактерий практически полностью отсутствуют пики каротиноидов и проявляется только ярко выраженный

Эксперименты проводились со штаммом UM-17 в колбах и биореакторе.

Опыты в колбах показали, что первые четыре подхода позволяют лишь незначительно повысить уровень накопления биомассы и бактериородопсина без существенного уменьшения содержания каротиноидов в клетках галобактерий. Так, внесение антиоксидантов (цистеина, токоферола, сульфита натрия) увеличивает выход биомассы и БР на 10–15%. Изменение условий освещения (интенсивности, длины волны) повысили выход биомассы не более, чем на 10%, а БР – на 22%.

Самым действенным оказался вариант с удалением ингибиторов роста галобактерий сорбентом непосредственно в ходе ферментации. Применение сорбента позволило (рост в колбах) повысить выход биомассы на 45–50%, а БР – на 70–75% по сравнению с контролем. На рис. 13 приведены результаты одного из экспериментов при выращивании штамма UM-17 в биореакторе с прокачкой ферментируемой культуры через выносной контур с емкостью, содержащей сорбент для извлечения ингибиторов биосинтеза и доливом свежеприготовленной концентрированной питательной среды. Через 8 сут. культивирования галобактерий в этом режиме удалось достичь конечного уровня накопления биомассы 45 г/л (по сухому веществу) при суммарном содержании бактериородопсина 1700–1750 мг/л.

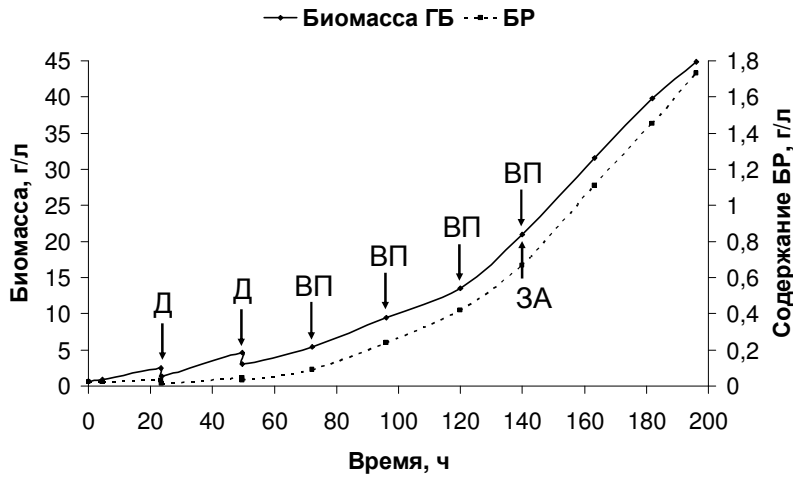


Рис. 13. Накопление биомассы при выращивании штамма UM-17 в биореакторе, предусматривающем извлечение ингибиторов биосинтеза сорбентом (ЗА – замена адсорбента), доливы среды в биореактор (Д) и внесение подпиток (ВП).

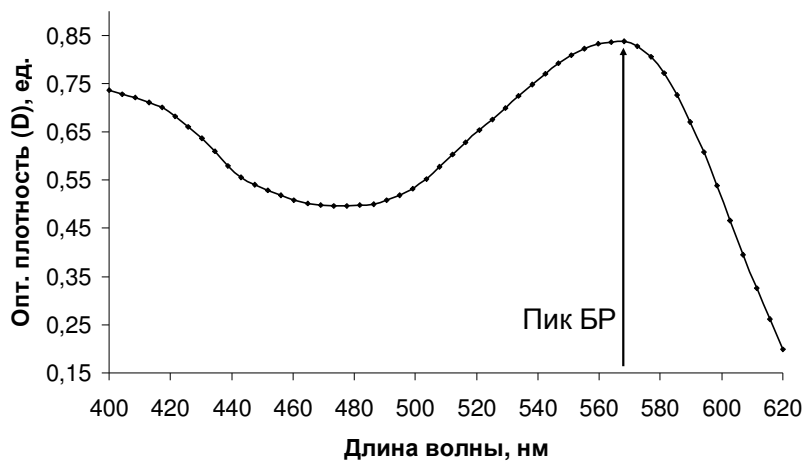


Рис. 14. Спектр лизата биомассы штамма UM-17 при культивировании с извлечением ингибиторов биосинтеза.

Выводы.

1. Разработано аппаратное оформление и программное обеспечение «BioDrome 1.0» для управляемого культивирования микроорганизмов в биореакторах. Система внедрена в РХТУ им. Д.И. Менделеева для проведения научных исследований и учебного процесса, а также в ГУП НПО «Астрофизика», ВНИИ Молочной промышленности (г. Москва).

2. Разработана концепция «солнечного биореактора», в котором культивирование микроорганизмов осуществляется при одновременном освещении рабочей зоны светом видимого и ультрафиолетового диапазона. На примере культивирования дрожжей *S. tropicalis* и *S. cerevisiae* показано, что такой прием позволяет повысить выход биомассы с единицы субстрата на 10-20% без ухудшения производительности биореактора.

пик БР (рис. 14). Это в дальнейшем позволяет существенно облегчить выделение БР из биомассы, очистку его от каротиноидов и обеспечит получение относительно дешевых препаратов БР.

Для реализации такого способа культивирования (с доливом среды и прокачкой через сорбент) в автоматическом режиме нами разработан метод экспресс анализа содержания БР, позволяющий сравнивать показатели текущего процесса культивирования с эталонным вариантом и своевременно заменять отработанный адсорбент. Метод основан на анализе цвета среды культивирования с клетками галобактерий с помощью CCD матрицы сканера Epson Perfection 1270 и включает соответствующее разработанное программное обеспечение.

Предварительная технико-экономическая оценка показала, что получение БР (в составе пурпурных мембран) по разработанной технологии позволит снизить стоимость его с 500–5000 руб. за 1 мг (в зависимости от чистоты продукта) до 20–100 руб. за 1 мг.

3. Предложено использование пероксида водорода или УФ-облучения для подготовки преадаптированного посевного материала *S. cerevisiae* с целью улучшения физиологических характеристик культуры. При выращивании посевного материала в аэробном или микроаэрофильном режимах пероксид водорода в пассажах лучше всего вносить в предстационарной фазе роста в дозе 0,3–0,6 г/л при концентрации биомассы дрожжей 2,2–2,4 г/л в условиях освещения суспензии фоновым видимым светом.

4. Показаны адаптационные изменения культуры *S. cerevisiae* в пассажах при внесении пероксида водорода или воздействии УФ, которые нивелируются через определенное время после прекращения адаптационной обработки.

5. Отработаны варианты анаэробной ферментации дрожжей *S. cerevisiae* с использованием преадаптированного к пероксиду посевного материала, приводящие к интенсификации спиртового брожения и сокращению времени сбраживания субстрата на 30%.

6. Подобрана питательная среда, режимы аэрации и освещения для культивирования галобактерий с целью получения бактериородопсина. Показана необходимость учета фактора «старения» питательной среды для обеспечения стабильности роста галобактерий и синтеза бактериородопсина.

7. Предложен режим культивирования галобактерий с доливом питательной среды и использованием инкапсулированного адсорбента для уменьшения концентрации накапливающихся в среде ингибиторов роста, в том числе, продуктов абиотического окисления. Режим позволяет получать до 1700–1750 мг/л бактериородопсина за 8 сут. культивирования при одновременном повышении стабильности процесса и минимизации содержания каротиноидов.

8. Предложен метод оценки результативности культивирования галобактерий в отношении накопления бактериородопсина. Метод основан на количественной оценке цветовой гаммы бактериальной суспензии с использованием фотосканера, включает обработку результатов и регулирование на их основе течения процесса, для чего создано программное обеспечение, интегрированное в общий пакет BioDrome 1.0.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Кузнецов А.Е., Неручев Ф.А., Карпов А.В, Каленов С.В., Сафронов В.В., Серегин А.М. Исследование совмещенных гибридных процессов биодеструкции и биосинтеза на примере модельной системы роста дрожжей *Candida tropicalis*. – В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 1-го Международного конгресса (Москва, 14-18 октября 2002г.). – М.: ЗАО "ПИК "Максима", РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2002, с. 207,208.

2. Каленов С.В., Кузнецов А.Е., Косивцов Ю.Ю. Лабораторный биореактор с системой удаленного доступа для сбора данных и контроля ферментационного процесса. – В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 1-го Международного конгресса (Москва, 14-18 октября 2002г.). – М.: ЗАО "ПИК "Максима", РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2002, с. 208,209.

3. Харитонов Л.Ю., Андреев Д.М., Кузнецов А.Е., Каленов С.В. Математическая обработка данных экспериментов по культивированию микроорганизмов. – В сб. трудов XVII Международной научной конф. Математические методы в технике и технологиях – ММТТ-17 (Кострома, 1-3 июня 2004 г.). Изд-во КГТУ, 2004, т. 8.

4. Каленов С.В., Кузнецов А.Е. Лабораторный биореактор с системой удаленного доступа для сбора данных и контроля ферментационных процессов на базе LabView фирмы "National Instruments". – В сб. трудов конф. Образовательные, научные и инженерные приложения в среде LabVIEW и технологии National Instruments (Москва, 14-15 ноября 2003 г.) – М.: Изд-во РУДН, 2003, с. 138-141.

5. Серегин А.М., Солдатов В.И., Складнев Д.А., Кузнецов А.Е., Калёнов С.В. Использование лазерного излучения при культивировании галобактерий. – В сб. Высокие технологии XXI века: Материалы конференции V Международного Форума (Москва, 19-23 апреля 2004 г.). – М.: Российский Фонд развития высоких технологий (РФРВТ), 2004, с. 335-338.

6. Kouznetsov A.Y., Kalyonov S.V., Soldatov V.I., Seregin A.M., Strakhovskaya M.G., Skladnev D.A. Light as an ambient control factor in the systems of microbiological cultivation and biodestruction. – European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004), Oostende (Belgium), April 25-28, 2004, 4pp.

7. Kouznetsov A.Ye., Kalyonov S.V. Simultaneous hybrid processes as a way to improve characteristics of cultivation of micro-organisms and biodestruction of pollutants. – European Symposium on Environmental Biotechnology (ESEB 2004), Oostende (Belgium), April 25-28, 2004, 4 pp.

8. Калёнов С.В., Неручев Ф.А., Карпов А.В., Кузнецов А.Е. Проведение совмещенных ферментационных и фотохимических процессов в гибридном лабораторном биореакторе. – В сб. Успехи в химии и химической технологии: Том XVI: N5. /РХТУ им. Д.И. Менделеева. М., 2002, с. 84-86.

9. Патент РФ № 2268924 с приоритетом от 23.11.2004. Способ получения биомассы дрожжей. // Кузнецов А.Е., Сорокодумов С.Н., Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Каленов С.В., Крылов И.А.

10. Кузнецов А.Е., Сорокодумов С.Н., Калёнов С.В., Винаров А.Ю. Использование перекиси водорода для совершенствования процессов культивирования микроорганизмов. – В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 3-го Международного конгресса (Москва, 14-18 марта 2005г.). – М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", 2005, т.1, с. 335,336.

11. Калёнов С.В., Кузнецов А.Е., Складнев Д.А., Синайский В.В. Оптимизация процесса культивирования галобактерий с целью получения бактериородопсина. – В сб. Высокие технологии XXI века: Материалы конференции VI Международного Форума (Москва, 24-28 апреля 2006 г.). – М.: Российский Фонд развития высоких технологий (РФРВТ), 2006.

12. Kouznetsov A.Ye., Kalyonov S.V. Simultaneous hybrid processes as a way to improve characteristics of cultivation of micro-organisms and biodestruction of pollutants. // In New Research on the Environment and Biotechnology, Nova Science Publishers Inc, New York, 2006, pp. 99-104.

13. Suyasov N.A., Karetkin B.A., Kalyonov S.V., Shakir I.V. and Panphilov V.I. Increasing efficiency of biodegradation of fat-containing wastes of meat-processing industry. // In Industrial Application of Biotechnology, Nova Science Publishers Inc, New York, 2006, pp. 105-113.

14. Калёнов С.В., Кузнецов А.Е., Складнев Д.А. Аспекты культивирования галобактерий, связанные с увеличением выхода бактериородопсина. – В сб. трудов Международной школы-конференции "Генетика микроорганизмов и биотехнология" посвященной 100-летию со дня рождения С.И. Алиханяна. – Москва-Пушино, 2006, с. 122-123.

15. Заявка на патентование № 20006118728 от 30.05.2006. Способ получения биомассы галобактерий. // Калёнов С.В., Кузнецов А.Е.

16. Заявка на патентование № 20006118729 от 30.05.2006. Способ получения бактериородопсина. // Кузнецов А.Е., Калёнов С.В.

17. Каленов С.В., Кузнецов А.Е.. Ресурсосберегающая технология получения бактериородопсина на основе галобактерий. / Химическая промышленность сегодня, 2007, №3, с. 23-32.

18. Лосева С.А., Кузнецов А.Е., Каленов С.В. Культивирование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в условиях окислительного стресса. – В сб. Биотехнология: состояние и перспективы развития: Материалы 4-го Международного конгресса (Москва, 12-16 марта 2007г.). – М.: ЗАО "Экспо-биохим-технологии", 2007, т.2, с. 76,77.