

*На правах рукописи*



**Пилигаев Александр Васильевич**

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ,  
ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЛИПИДЫ, И ИХ БИОКАТАЛИТИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА В  
БИОДИЗЕЛЬНОЕ ТОПЛИВО**

03.01.06 - биотехнология  
(в том числе бионанотехнологии)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук (ИК СО РАН), г. Новосибирск.

**Научный руководитель:**

**Сорокина Ксения Николаевна,**  
кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Ефременко Елена Николаевна,**  
доктор биологических наук, профессор,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет им.  
М.В.Ломоносова», заведующая лабораторией  
экобиокатализа кафедры химической энзимологии  
химического факультета

**Гайсина Лира Альбертовна,**  
доктор биологических наук, доцент,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Башкирский государственный педагогический  
университет им.М.Акмуллы», заведующая кафедрой  
биоэкологии и биологического образования

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
науки «Национальный научный центр морской  
биологии» Дальневосточного отделения Российской  
академии наук

Защита диссертации состоится «13» декабря 2018 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.075.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН и на сайте <http://www.ibp.ru>.

Автореферат разослан «   »

2018 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Есимбекова Елена Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Возобновляемые источники сырья находят все большее применение в промышленности, в связи с чем ежегодно растет производство альтернативного моторного топлива. Микроводоросли являются сырьем для получения биотоплива третьего поколения, которое по своим показателям значительно превосходит липидсодержащее сырье, используемое для производства биотоплива предыдущих поколений, в том числе по урожайности биомассы с единицы площади поверхности. Микроводоросли отличаются высоким накоплением липидов, которое составляет 20 - 60% (по массе) и затем используются для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), путем их переэтерификации со спиртами. Показано, что свойства разных штаммов микроводорослей, относящихся к одному виду, могут значительно различаться, в том числе по скорости накопления биомассы, продуктивности по липидам и по их составу. В связи с этим актуален поиск в природе и исследование свойств новых, более эффективных штаммов микроводорослей, продуцирующих липиды, для их последующего применения в процессах получения биотоплива третьего поколения. Наиболее важными критериями для выбора штамма в данном случае являются: высокая скорость накопления биомассы, продуктивность по липидам, способность к массовому культивированию в фотобиореакторах, стрессоустойчивость, а также продукция липидов с оптимальным составом, в частности, с высокой насыщенностью. Показано, что биотопливо, полученное из таких липидов, имеет повышенную стабильность к окислению и высокое цетановое число.

Выявление различий в закономерностях накопления липидов у различных штаммов, относящихся к одному виду, является важным для разработки современных подходов к улучшению их продукции. Для этого необходимо проведение сравнительного исследования метаболизма отдельных штаммов методами метаболического профилирования для выявления перспективных продуцентов липидов, легко адаптируемых к условиям культивирования. Этот метод позволяет выявлять индивидуальные метаболические особенности штаммов микроводорослей и проводить оценку перспективности дальнейшего улучшения их свойств в части повышения продукции липидов методами генетической инженерии.

Для разработки процессов получения биотоплива третьего поколения из микроводорослей необходимо создание эффективных подходов к переработке биомассы, при этом характеризующихся экологической чистотой. Хотя основным способом получения МЭЖК в настоящее время является переэтерификация в присутствии гомогенных катализаторов (кислотных и щелочных), данный подход обладает рядом недостатков, включающих сложность отделения катализатора от продуктов реакции и образование загрязненных сточных вод. Применение для этой цели иммобилизованных липаз является более экологически чистым подходом к получению биодизельного топлива, поскольку позволяет снизить воздействие на окружающую среду, однако, вместе с тем, и более дорогостоящим. Использование попеременно сшитых ферментных агрегатов (ПСФА) позволяет снизить затраты на получение биокатализатора за счет отказа от использования твердого материала-носителя, однако ранее такой тип биокатализаторов не применялся для получения МЭЖК из липидов микроводорослей.

Таким образом, для разработки более эффективных подходов к получению биотоплива из микроводорослей необходимо проведение комплексного исследования, направленного на выделение новых перспективных штаммов-продуцентов липидов, а также изучение их метаболических особенностей для получения биомассы с наиболее приемлемым составом липидов, предназначенных для получения биотоплива с использованием экологически чистого биокаталитического подхода.

**Цель работы** – выделение и поиск липидпродуцирующих штаммов микроводорослей, изучение их свойств, а также исследование подхода к биокаталитической переработке липидов микроводорослей с использованием попеременно сшитых ферментных агрегатов липаз в метиловые эфиры жирных кислот, как основы биодизельного топлива.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выделить новые штаммы микроводорослей из природных источников и исследовать свойства перспективных продуцентов липидов с высокой насыщенностью при фотоавтотрофном и миксотрофном культивировании (с сопоставлением с коллекционными штаммами).

2. Выявить метаболические особенности штаммов микроводорослей с высоким содержанием липидов при культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах.

3. Нарботать партию биомассы микроводорослей с наиболее приемлемым составом для последующей переработки липидов в метиловые эфиры жирных кислот.

4. Разработать биокатализатор на основе поперечно сшитых ферментных агрегатов липазы *Burkholderia cepacia* и оптимизировать реакцию биокаталитической переэтерификации липидов микроводорослей для получения метиловых эфиров жирных кислот.

### **Научная новизна**

В работе были выделены из природных источников и выявлены новые штаммы микроводорослей, продуцирующие нейтральные липиды при фотоавтотрофном и миксотрофном культивировании. Выделенный штамм *Scenedesmus abundans* A-1175 обладал максимальной продукцией биомассы и липидов с высокой насыщенностью при фотоавтотрофном культивировании, поэтому является перспективным для получения биодизельного топлива. Также в работе выделен новый штамм *Micractinium* sp. IC-76, обладающий потенциалом для применения в комбинированном процессе очистки муниципальных сточных вод и получения биомассы с высоким содержанием нейтральных липидов, пригодных для их последующей переработки в биодизельное топливо. В работе впервые с помощью метаболического профилирования с использованием газовой хромато-масс-спектрометрии изучен состав метаболитов микроводорослей, относящихся к видам *Chlorella sorokiniana* и *Micractinium* sp., при миксотрофном культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах и выявлены ключевые метаболиты, связанные с процессом накопления липидов. Также в работе впервые показана возможность применения ПСФА биокатализатора на основе липазы бактерии *B. cepacia* для биокаталитической переработки липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 в МЭЖК.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Выявленные в работе штаммы с высоким содержанием насыщенных липидов и накоплением биомассы могут быть использованы для проведения последующих прикладных исследований, направленных на создание технологий получения компонентов моторных топлив из микроводорослей, в том числе в процессах, совмещенных с водоочисткой муниципальных сточных вод. Примененный в работе подход к переработке липидов микроводорослей с использованием ПСФА имеет потенциал для использования в процессах получения биодизельного топлива из липидов микроводорослей за счет высокого выхода МЭЖК при относительно низкой температуре и концентрации используемого биокатализатора.

С теоретической точки зрения, полученные результаты расширяют данные о свойствах новых штаммов микроводорослей, перспективных для применения в производстве биодизельного топлива. Исследование метаболических особенностей липидпродуцирующих штаммов носит фундаментальный характер, выявившее отдельные особенности процессов накопления липидов в клетках микроводорослей. Полученные данные будут являться основой для работ по улучшению накопления липидов штаммами микроводорослей методами генетической инженерии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Выделенные природные штаммы микроводорослей *S. abundans* A-1175 и *Micractinium* sp. IC-76 с высокой насыщенностью липидов перспективны для применения в процессах получения биодизельного топлива.

2. Накопление липидов при миксотрофном культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах у штамма микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 связано с увеличением внутриклеточной концентрации сахарозы.

3. Определение оптимальной фазы роста штамма микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 является необходимым условием для получения биомассы с высоким содержанием триацилглицеридов для их последующей переработки в биодизельное топливо.

4. Липаза бактерии *Burkholderia cepacia*, иммобилизованная методом ПСФА, применима в качестве биокатализатора процесса переэтерификации липидов микроводорослей с целью получения МЭЖК.

#### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в постановке задач, решаемых в рамках диссертационной работы, проводил анализ литературы по теме исследования, проводил основные эксперименты и обрабатывал результаты, принимал участие в интерпретации полученных данных и осуществлял подготовку к публикации статей.

#### **Степень достоверности результатов**

При проведении данной научной работы были использованы современные подходы и методы исследования. Достоверность полученных результатов была подтверждена с использованием современных статистических методов анализа полученных результатов.

#### **Апробация диссертационной работы**

Основные результаты работы докладывались на российских и международных конференциях, в числе которых: XLVIII Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2010), V съезд ВМСО IV Всероссийская конференция с международным участием. «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (Москва, Россия, 2011), XLIX Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, Россия, 2011), International conference «Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine» (Санкт-Петербург, Россия, 2011), 21th European Biomass Conference & Exhibition (Копенгаген, Дания, 2013), VIII Международной научно-практической конференция «Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков» (Новосибирск, Россия, 2014), Международная молодежная научная конференция "Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии» (Томск, Россия, 2014), VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2015), 19-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, Россия, 2015), 20-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, Россия, 2016), 5<sup>th</sup> International conference «Sustainable Utilization of Tropical Plant Biomass: Bioproducts, Biocatalysts and Biorefinery (SutB4)» (Коимбатор, Индия, 2016), IX Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017), Международная научная конференция «ЭкоБиотех-2017» (Уфа, Россия, 2017), Школа молодых ученых «Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы» (Новосибирск, Россия, 2017).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17-73-30032) – Главы 1,2,3,5,6, а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-08-31589 мол\_а) – Глава 4.

#### **Публикации**

По материалам диссертационной работы опубликована 21 печатная работа, из которых 4 статьи в международных и российских журналах, индексируемых в системе Web of Science, 1 монография, 1 патент РФ, а также 15 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка принятых сокращений, списка использованной литературы и приложения. Работа содержит 20 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает 286 источников, из них 245 иностранных.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Объекты исследования.** Для выделения штаммов микроводорослей использовали образцы почвы и воды, отобранные в Западной Сибири, Северном Казахстане, на северо-восточном побережье Черного моря и на полуострове Камчатка. Из них были выделены в чистую культуру и идентифицированы штаммы *Nannochloris bacillaris* A-1139, *Botryococcus* sp. A-1113, *Chlorella sorokiniana* A-1135, *Botryococcus* sp. A-1162, *Chlorella* sp. A-1182, *Botryococcus* sp. A-1115, *Chlorella* sp. A-1176, *Scenedesmus abundans* A-1175, *Chlorella vulgaris* A-1123, *Botryococcus* sp. A-1138, *Bracteacoccus occidentalis* A-1144, *Scenedesmus obliquus* A-1167, *Nannochloris* sp. A-1001, *Chlamydomonas pitschmannii* A-1151, *Desmodesmus* sp. IC-75, *Desmodesmus* sp. IC-10, *Parachlorella kessleri* IC-11, *Parachlorella* sp. IC-23, *Micractinium* sp. IC-44, *Chlorella sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76, *Chlorella* sp. IC-82.

Штаммы микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (уточненное видовое название *Chlorella sorokiniana*), *Chlorella pyrenoidosa* IPPAS C-2 (уточненное видовое название *Parachlorella kessleri*), *Chlorella kessleri* IPPAS C-9 (уточненное видовое название *Parachlorella kessleri*), *Chlorella vulgaris* IPPAS C-15 (уточненное видовое название *Parachlorella kessleri*) и *Scenedesmus acuminatus* IPPAS S-333 (уточненное видовое название *Parachlorella kessleri*) были получены из коллекции микроводорослей IPPAS Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва). Штаммы *Chlorella protothecoides* NIES-2164 и *Scenedesmus obliquus* NIES-2280 были получены из коллекции микроводорослей NIES Национального института экологических исследований (Япония).

В качестве активного компонента биокатализатора, полученного методом ПСФА, использовали коммерческую липазу бактерии *Burkholderia cepacia* (Amano BH).

**Методы исследования.** Чистые культуры микроводорослей выделяли из накопительных методом последовательного разведения или с использованием метода проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACSAria (ЦКП «Проточная цитометрия» ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН) с подтверждением аксеничности культуры путем посева на различные среды с последующей световой микроскопией. Таксономическую идентификацию микроводорослей проводили путем ПЦР по последовательности гена 18S рНК (для отдельных штаммов дополнительно использовали участки ITS1, 5,8S рНК и ITS2, а филогенетический анализ – с использованием программы MEGA 5 и алгоритма максимального правдоподобия.

Первичный отбор штаммов по способности накапливать липиды при фотоавтотрофном культивировании микроводорослей проводили в 24-луночной планшете в среде BBM путем индукции накопления липидов после инкубации клеток в среде без  $\text{NaNO}_3$ , с их последующей окраской красителем Nile Red и флуоресцентной микроскопией. Первичный отбор штаммов микроводорослей по способности накапливать липиды и биомассу при миксотрофном культивировании проводили в 96-луночных планшетах на среде OECD и в стерилизованных сточных водах с очистных сооружений г. Новосибирска (среда MWW), накопление нейтральных липидов в клетках оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции после окрашивания красителем Nile Red. Кинетические параметры штаммов после первичного отбора (специфическую скорость роста, время удвоения биомассы, продуктивность по биомассе и липидам) оценивали при культивировании штаммов в конических колбах.

Анализ концентрации нитратного азота ( $\text{N-NO}_3^-$ ) в среде при фотоавтотрофном культивировании проводили спектрофотометрически при длине волны 220 нм по методу (Collos et al., 1999). Концентрацию аммонийного азота ( $\text{N-NH}_4$ ) определяли с помощью реактива Несслера в соответствии с известным методом (Clesceri et al., 1998); определение концентрации фосфора в виде ортофосфата ( $\text{P-PO}_4$ ) проводили с использованием молибдата аммония и малахитового зелёного, как описано в (Cogan et al., 1999). Концентрацию анионов ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) в сточных водах измеряли ионной хроматографией на хроматографе 883 Basic IC Plus (Metrohm). Содержания белка в биомассе определяли по методу Брэдфорда, углеводов - фенол-серноокислотным методом (Dubois et al., 1956). Экстракцию липидов из сухой биомассы проводили смесью хлороформа и метанола по методу Фолча (Folch et al., 1957).

Анализ качественного состава липидных экстрактов микроводорослей проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) с использованием смеси гексан-этиловый эфир-уксусная кислота (80:20:1) в качестве элюента. Анализ состава жирных кислот и состава метаболитов микроводорослей проводили методом ГХ/МС на приборе Agilent 7000В. Для анализа метаболических профилей штаммов микроводорослей использовали метод главных компонент (РСА) и метод частичных наименьших квадратов (PLS-DA).

Приготовление биокатализатора на основе липазы бактерии *B. ceracia* проводили методом образования поперечно сшитых ферментных агрегатов (ПСФА) с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве ко-фидера, и глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Реакцию биокаталитической переэтерификации липидов микроводорослей оптимизировали с применением метода поверхности отклика (RSM) с использованием центрального композиционного планирования (ССD). В качестве отклика был выбран прогнозируемый выход МЭЖК в реакции переэтерификации.

Все эксперименты в работе, за исключением экспериментов центрального композиционного плана, были выполнены в трёх повторениях, результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Выделение чистых культур микроводорослей из природных образцов и их видовая идентификация

Из накопительных культур, полученных из природных образцов, с использованием метода проточной цитофлуориметрии и последовательного разведения выделены в чистую культуру 22 штамма микроводорослей. Идентификацию выделенных микроводорослей проводили путем анализа последовательности части гена 18S рРНК (и дополнительного участка ITS1 - 5,8S rRNA - ITS2 для штаммов, относящихся к р. *Chlorella* и *Micractinium*). Показано, что выделенные из природных источников микроводоросли относятся к родам *Parachlorella*, *Chlorella*, *Micractinium*, *Botryococcus*, *Bracteacoccus*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Chlamydomonas* и *Nannochloris* (степень идентичности при видовой идентификации с известными последовательностями составила 99%).

Для фотоавтотрофного культивирования в работе были использованы 12 штаммов (выделенные в ходе работы): *Nannochloris bacillaris* A-1139, *Botryococcus* sp. A-1113 *Chlorella sorokiniana* A-1135, *Botryococcus* sp. A-1162, *Chlorella* sp. A-1182, *Botryococcus* sp. A-1115, *Chlorella* sp. A-1176, *Scenedesmus abundans* A-1175, *Chlorella vulgaris* A-1123, *Botryococcus* sp. A-1138, *Bracteacoccus occidentalis* A-1144 и *Scenedesmus obliquus* A-1167, поскольку они стабильно поддерживаются при многократном пересеве, и поддерживают фотоавтотрофное питание. Штаммы, выделенные в ходе работы (всего 8 штук): *Desmodesmus* sp. IC-75, *Desmodesmus* sp. IC-10, *Parachlorella kessleri* IC-11, *Parachlorella* sp. IC-23, *Micractinium* sp. IC-44, *Chlorella sorokiniana* IC-62, *Micractinium* sp. IC-76 и *Chlorella* sp. IC-82, были выбраны для исследования в миксотрофных условиях, так как обладают способностью к фотоавтотрофному, гетеротрофному и миксотрофному типу питания. В дополнение для миксотрофного культивирования были использованы штаммы: *Chlorella sorokiniana* IPPAS C-1, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-2, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-9, *Parachlorella kessleri* IPPAS C-15, *Parachlorella kessleri* IPPAS S-333, *Chlorella protothecoides* NIES-2164 и *Scenedesmus obliquus* NIES-2280, с целью сопоставления их свойств со свойствами штаммов, выделенными в работе.

### Исследование свойств штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном культивировании

С использованием флуоресцентной микроскопии и красителя Nile Red при первичном отборе штаммов микроводорослей по уровню накопления липидов было показано, что из двенадцати протестированных штаммов только у *C. vulgaris* A-1123, *C. sorokiniana* A-1135, *S. obliquus* A-1167, *Botryococcus* sp. A-1162 и *S. abundans* A-1175, в стационарной фазе роста визуализируется синхронное накопление липидных капель у клеток в культуре, из которых для

штаммов *C. vulgaris* A-1123, *S. abundans* A-1175, *S. obliquus* A-1167 наблюдается накопление липидных капель у более половины клеток (Рисунок 1).

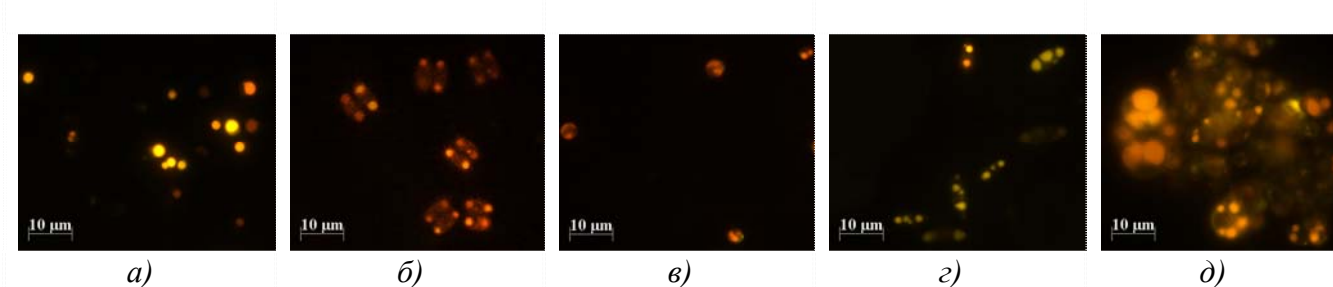


Рисунок 1 - Флуоресцентная микроскопия штаммов микроводорослей в стационарной фазе при окраске красителем Nile Red. а) *Chlorella vulgaris* A1123; б) *Scenedesmus abundans* A1175; в) *Chlorella sorokiniana* A1135; г) *Scenedesmus obliquus* A1167; д) *Botryococcus* sp. A1162

Результаты фотоавтотрофного культивирования выбранных штаммов микроводорослей в колбах в среде ВВМ представлены на рисунке 2. Показано, что штаммы *C. vulgaris* A-1123 и *S. abundans* A-1175 эффективно накапливали биомассу и нейтральные липиды с общим содержанием липидной фракции  $W_{л} = 38,3 \pm 1,0\%$  и  $W_{л} = 44,4 \pm 2,7\%$ , соответственно), а также наиболее полно потребляли  $N-NO_3^-$  из среды. Штамм *S. abundans* A-1175 среди всех исследованных штаммов обладал максимальной продуктивностью по липидам ( $Q_{л} = 32,8 \pm 1,5$  мг л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>) и скоростью накопления биомассы ( $Q_6 = 73,8 \pm 4,5$  мг л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>) при  $\mu = 0,20 \pm 0,01$  сут<sup>-1</sup> и  $T = 3,6 \pm 0,5$  сут.

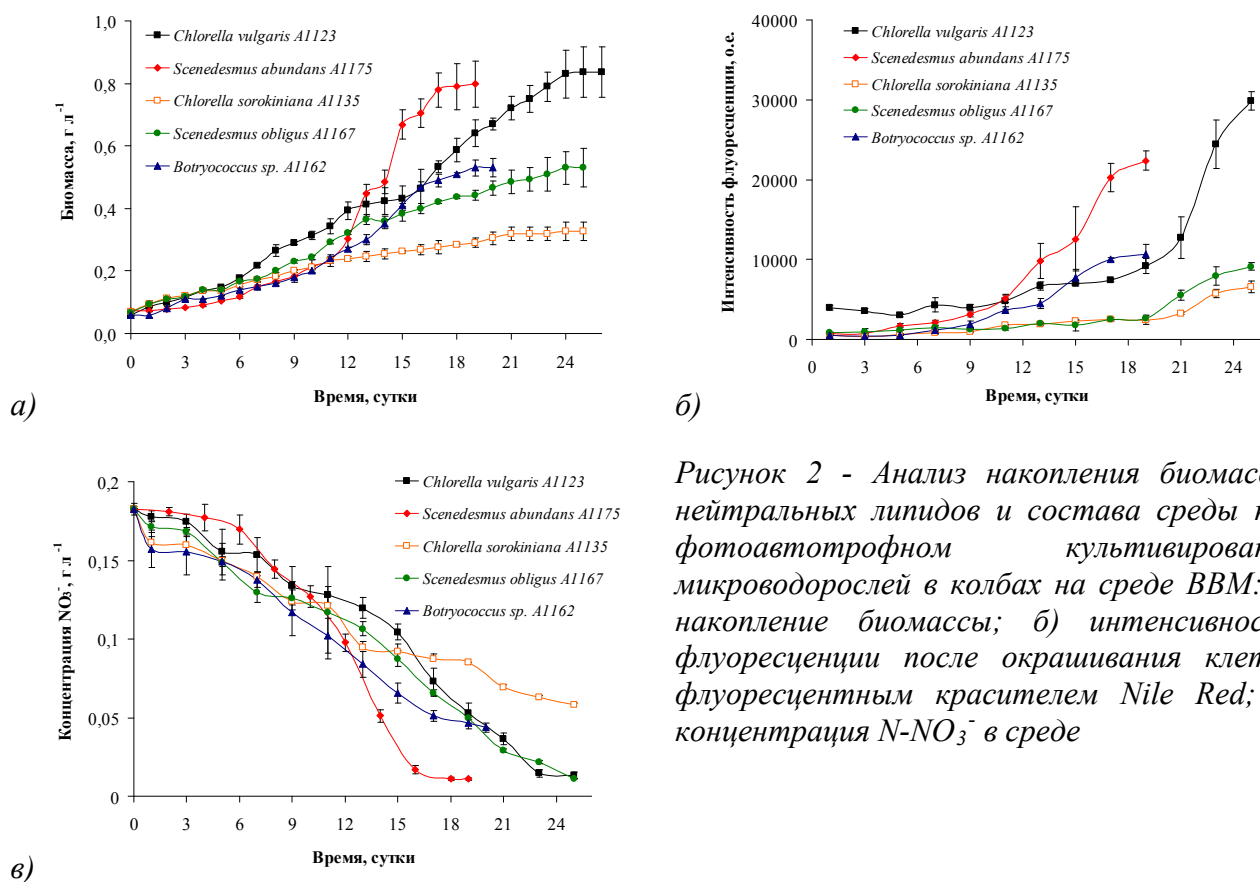


Рисунок 2 - Анализ накопления биомассы, нейтральных липидов и состава среды при фотоавтотрофном культивировании микроводорослей в колбах на среде ВВМ: а) накопление биомассы; б) интенсивность флуоресценции после окрашивания клеток флуоресцентным красителем Nile Red; в) концентрация  $N-NO_3^-$  в среде



Анализ состава липидов с использованием ТСХ показал, что у штаммов *C. vulgaris* A-1123 и *S. abundans* A-1175 было выявлено заметное увеличение содержания триацилглицеридов в стационарной фазе при фотоавтотрофном культивировании по сравнению с другими штаммами, исследованными в работе (Рисунок 3).

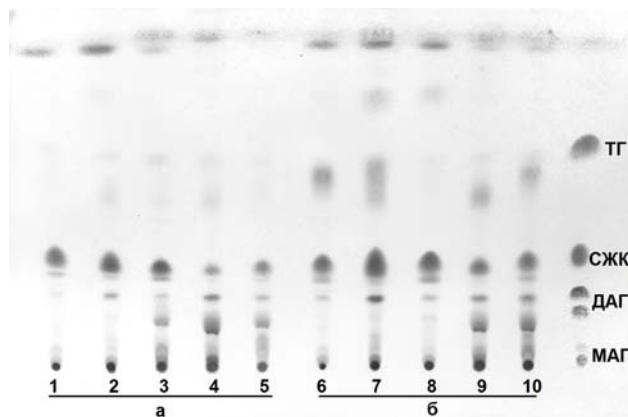


Рисунок 3 - ТСХ липидных экстрактов штаммов микроводорослей в экспоненциальной и стационарной фазе при фотоавтотрофном культивировании: а - экспоненциальная фаза роста; б - стационарная фаза роста; 1,6 - *C. vulgaris* A1123; 2,7 - *S. abundans* A1175; 3,8 - *C. sorokiniana* A1135; 4,9 - *S. obliquus* A1167; 5,10 - *Botryococcus* sp. A1162. ТГ - триацилглицериды, ДАГ - диацилглицериды, МАГ - моноацилглицериды, СЖК - свободные жирные кислоты

Анализ состава липидов пяти штаммов микроводорослей при фототрофном культивировании с использованием ГХ/МС показал, что основными жирными кислотами, входящими в их состав, как в стационарной, так и в экспоненциальной фазе роста являются пальмитиновая С16:0, стеариновая С18:0 и олеиновая С18:1. Выявлено, что жирнокислотный состав липидов зависит от фазы роста для всех штаммов, что необходимо учитывать при наработке биомассы для ее последующей переработки в биотопливо. Кроме того, для получения биотоплива, характеризующегося стабильностью к окислению и высоким цетановым числом, необходимо использование биомассы микроводорослей с высоким содержанием липидов с насыщенными жирными кислотами. В ходе исследования было выявлено, что высоким содержанием таких жирных кислот в стационарной фазе роста при фотоавтотрофном культивировании обладали штаммы *C. vulgaris* A-1123 (47,6%), *S. abundans* A-1175 (51,3%) и *C. sorokiniana* A-1135 (46,7%). Два других протестированных в фотоавтотрофных условиях штамма *C. sorokiniana* A-1135 и *S. obliquus* A-1167 характеризовались высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот С16:3, С18:3; последний также обладал значительным содержанием жирных кислот, предположительно, состава С16:4 и С18:4 в фазе накопления липидов. Штамм *S. abundans* A-1175 на протяжении всего срока культивирования обладал относительно постоянным содержанием насыщенных жирных кислот (НЖК), мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), а также большим коэффициентом насыщенности липидов в обеих фазах роста (1,11 и 1,06, соответственно). Штамм характеризовался наименьшим содержанием жирных кислот с двумя и тремя ненасыщенными связями по сравнению с другими штаммами, что делает его перспективным для получения биотоплива. Таким образом, при сопоставлении данных по продуктивности и по составу биомассы выявлено, что из исследованных штаммов микроводорослей наиболее эффективными при фотоавтотрофном культивировании оказались штаммы *C. vulgaris* A-1123 и *S. abundans* A-1175.

Помимо липидов, биомасса микроводорослей также является источником белка и углеводов, которые могут использоваться для кормовых целей или для получения дополнительных продуктов (например, этанола). Поэтому в данной работе было проведено исследование состава биомассы у штаммов микроводорослей *C. vulgaris* A-1123 и *S. abundans* A-1175, обладающих высокой липидпродуцирующей способностью. Показано, что штамм *S. abundans* A-1175 обладает низким содержанием белка ( $15,7 \pm 0,7\%$ ) и высоким - углеводов ( $43,3 \pm 1,2\%$ ). Напротив, штамм *C. vulgaris* A-1123 обладает высоким содержанием белка ( $26,0 \pm 1,2\%$ ), и меньшим количеством углеводов ( $37,8 \pm 1,4\%$ ). Таким образом, из совокупности полученных результатов можно заключить, что штамм *S. abundans* A-1175 может быть

рекомендован для комплексной переработки его биомассы в биотопливо, а *C. vulgaris* A-1123 – для переработки в биотопливо и для применения в качестве кормовой биомассы.

### Исследование свойств штаммов микроводорослей при миксотрофном культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах

В ряде исследований было показано, что микроводоросли обладают большим потенциалом для применения в процессах водоочистки. В этой связи интересно как изучение свойств отдельных штаммов микроводорослей, так и метаболических изменений, происходящих в их клетках, при культивировании на сточных водах, которые ранее не были исследованы. В дальнейшем это позволит найти подходы для увеличения продукции липидов микроводорослями в миксотрофных условиях. С этой целью в работе было впервые проведено исследование накопления липидов у пятнадцати штаммов микроводорослей (выделенных в этой работе и полученных из коллекций) при миксотрофном культивировании в стерилизованной муниципальной сточной воде (среда MWW), которая по данным проведенного анализа обладает всеми необходимыми компонентами для роста микроводорослей.

Показано, что высокой концентрацией клеток при культивировании на среде MWW обладали коллекционные штаммы *C. sorokiniana* IPPAS C-1 и *P. kessleri* IPPAS C-9. Флуоресцентный анализ с использованием красителя Nile Red (Рисунок 4) показал, что при культивировании на среде MWW высоким содержанием нейтральных липидов обладали штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76. Стоит отметить, что штаммы (IC-44, IC-76 и IC-62), выделенные в ходе этой работы, превосходили штаммы, полученные из коллекций, по своей способности накапливать нейтральные липиды при миксотрофном культивировании. Дальнейшее исследование кинетических параметров культивирования четырех штаммов микроводорослей в колбах на среде MWW показало, что в целом они обладали сравнимыми скоростями накопления биомассы ( $Q_6 = 34,9 \pm 2,9 - 39,0 \pm 4,8$  мг л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>, Рисунок 5а), но значительно различались по продуктивности и содержанию липидов.

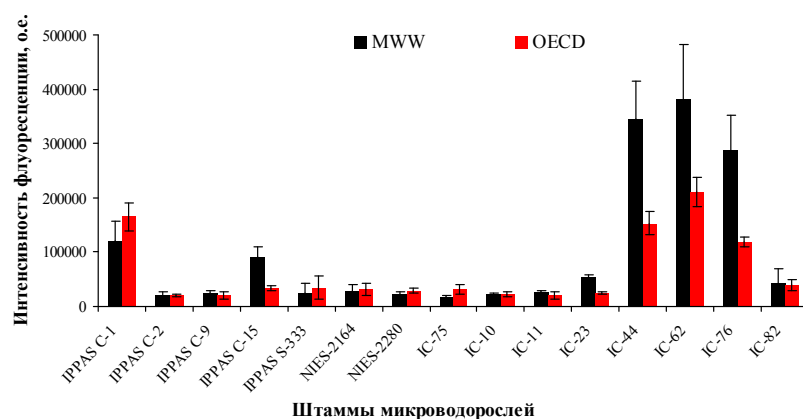


Рисунок 4 - Относительная интенсивность флуоресценции по данным окрашивания клеток микроводорослей красителем Nile Red при культивировании штаммов при первичном отборе по уровню накопления нейтральных липидов в 96-луночных планшетах на средах MWW и OECD

Максимальная продуктивность по липидам была отмечена у штамма *Micractinium* sp. IC-76 и составила  $Q_{\text{л}} = 13,5 \pm 1,5$  мг л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>, при общем содержании липидов  $W_{\text{л}} = 36,3 \pm 0,11\%$  от веса сухой биомассы. Исследование накопления нейтральных липидов показало, что из всех протестированных штаммов, *Micractinium* sp. IC-76 и *Micractinium* sp. IC-44 на 15 сутки культивирования накапливали наибольшее количество нейтральных липидов в стационарной фазе роста (Рисунок 5б).

Также показано, что все четыре исследованных штамма эффективно удаляли соединения азота и фосфора из среды (Рисунок 5в и 5г). Отмечено, что хотя полное потребление

аммонийного азота достигалось на 8 сутки (Рисунок 5в), максимум накопления нейтральных липидов (Рисунок 5б) у штаммов в целом наблюдался на 15 сутки культивирования, что, по-видимому, связано со сложным составом сточных вод, которые помимо  $\text{NH}_4^+$  содержат и другие азотистые соединения. Штамм *Micractinium* sp. IC-76 с наибольшим содержанием липидов обладал высокой эффективностью удаления аммонийного азота ( $96,4 \pm 0,7\%$ ) и ортофосфата ( $77,8 \pm 5,6\%$ ) из среды MWW.

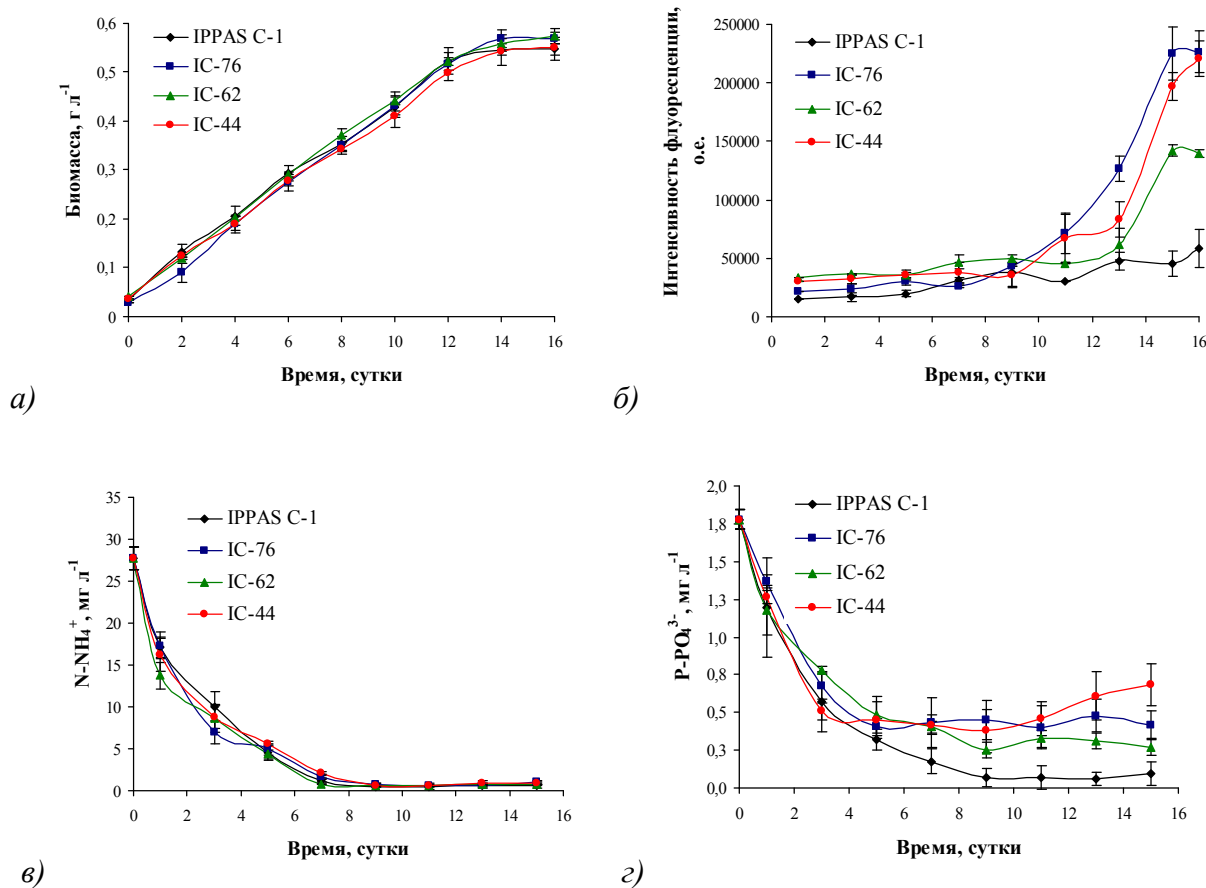


Рисунок 5 - Анализ накопления биомассы и нейтральных липидов, а также состава среды при культивировании микроводорослей на сточных водах в колбах: а) биомасса; б) нейтральные липиды; в) концентрация  $\text{N-NH}_4^+$  в среде; г) концентрация  $\text{P-PO}_4^{3-}$  в среде

При анализе состава липидов микроводорослей методом ТСХ (Рисунок 6) выявлено, что в стационарной фазе наибольшее содержание триацилглицеридов наблюдается у штамма *Micractinium* sp. IC-76, а наименьшее - у штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1. В этой фазе роста также отмечено увеличение концентрации свободных жирных кислот и диацилглицеридов у всех четырех штаммов, в сравнении с экспоненциальной фазой роста.

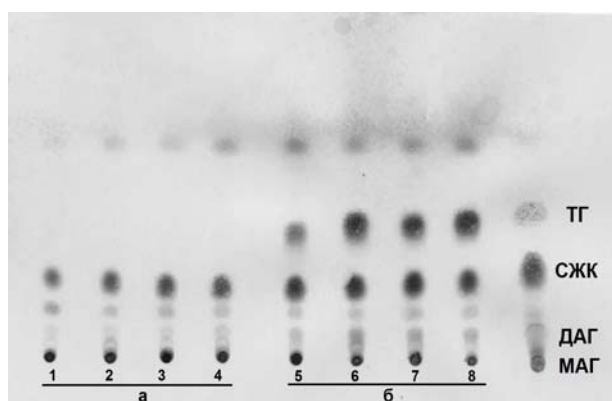


Рисунок 6 - ТСХ липидных экстрактов штаммов микроводорослей в стационарной и экспоненциальной фазах роста при миксотрофном культивировании на среде MWW: а - экспоненциальная фаза (4 сутки); б - стационарная фаза (15 сутки); 1,5 - *C. sorokiniana* IPPAS C-1; 2,6 - *Micractinium* sp. IC-44; 3,7 - *Micractinium* sp. IC-76; 4,8 - *C. sorokiniana* IC-62. ТГ – триацилглицериды, ДАГ – диацилглицериды, МАГ – моноацилглицериды, СЖК – свободные жирные кислоты

Анализ жирнокислотного состава, проведенный методом ГХ/МС, показал снижение содержания пальмитиновой кислоты C16:0 и уменьшение содержания стеариновой кислоты C18:0 при достижении стационарной фазы роста у всех штаммов при культивировании на среде MWW. Наибольшей насыщенностью липидов при культивировании в миксотрофных условиях на стерилизованных сточных водах обладал штамм *Micractinium* sp. IC-76 ( $K_{нас}$  1,22). Штамм *S. sorokiniana* IPPAS C-1, полученный из коллекции, также обладал сравнительно высоким коэффициентом насыщенности ( $K_{нас}$  1,20). Суммарное содержание всех НЖК и МНЖК жирных кислот в исследуемых штаммах в стационарной фазе роста у штаммов отличалось не значительно и составляло от 68,5% до 72,0%.

#### Анализ метаболических особенностей особенности штаммов микроводорослей с высоким содержанием липидов при культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах

Для более подробного изучения различий в накоплении липидов у всех четырех штаммов на уровне метаболизма было проведено метаболическое профилирование состава их биомассы в экспоненциальной и стационарной фазах роста. По данным, полученных методом главных компонент (Рисунок 7) у четырех штаммов, относящихся к *Micractinium* sp. и *S. sorokiniana* были выявлены значительные отличия метаболических профилей в обеих фазах роста по первой главной компоненте (F1). Группировка метаболических профилей в стационарной фазе роста сопряжена с увеличением концентрации метаболитов углеводного обмена (глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата, галактозо-6-фосфата, мио-инозитол-2-фосфата, галактозил глицерола), а также щавелевой и эритроновой кислоты. Выявлено, что близкородственные штаммы родов *Chlorella* и *Micractinium* имеют значительные отличия в метаболизме при накоплении липидов. Для штаммов с высоким содержанием липидов отмечена тенденция к более высокому содержанию метаболитов углеводного обмена в стационарной фазе роста.

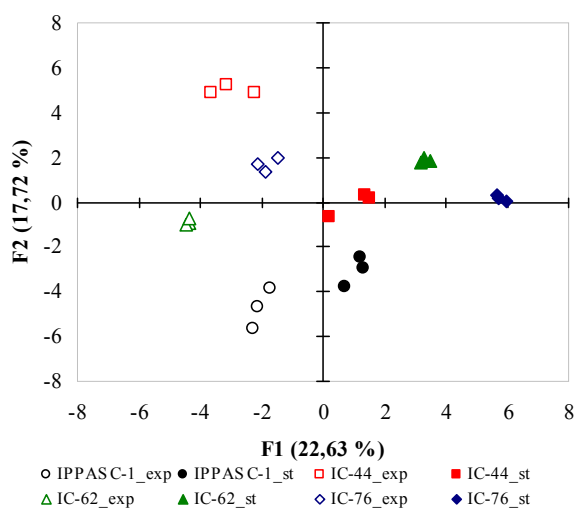


Рисунок 7 - График матрицы счетов в пространстве первой (F1) и второй (F2) главных компонент, полученный в результате анализа метаболических профилей микроводорослей методом главных компонент: exp – экспоненциальная фаза роста (4 сутки), st – стационарная фаза роста (15 сутки)

Анализ метаболических профилей биомассы штамма *Micractinium* sp. IC-76 методом частичных наименьших квадратов выявил 28 метаболитов, участвующих в метаболизме аминокислот и липидов, в процессах углеводного обмена, цикле трикарбоновых кислот. На рисунке 8 приведена диаграмма, отражающая наиболее значимые метаболические изменения штамма *Micractinium* sp. IC-76 в процессе накопления липидов при культивировании на муниципальных сточных водах.

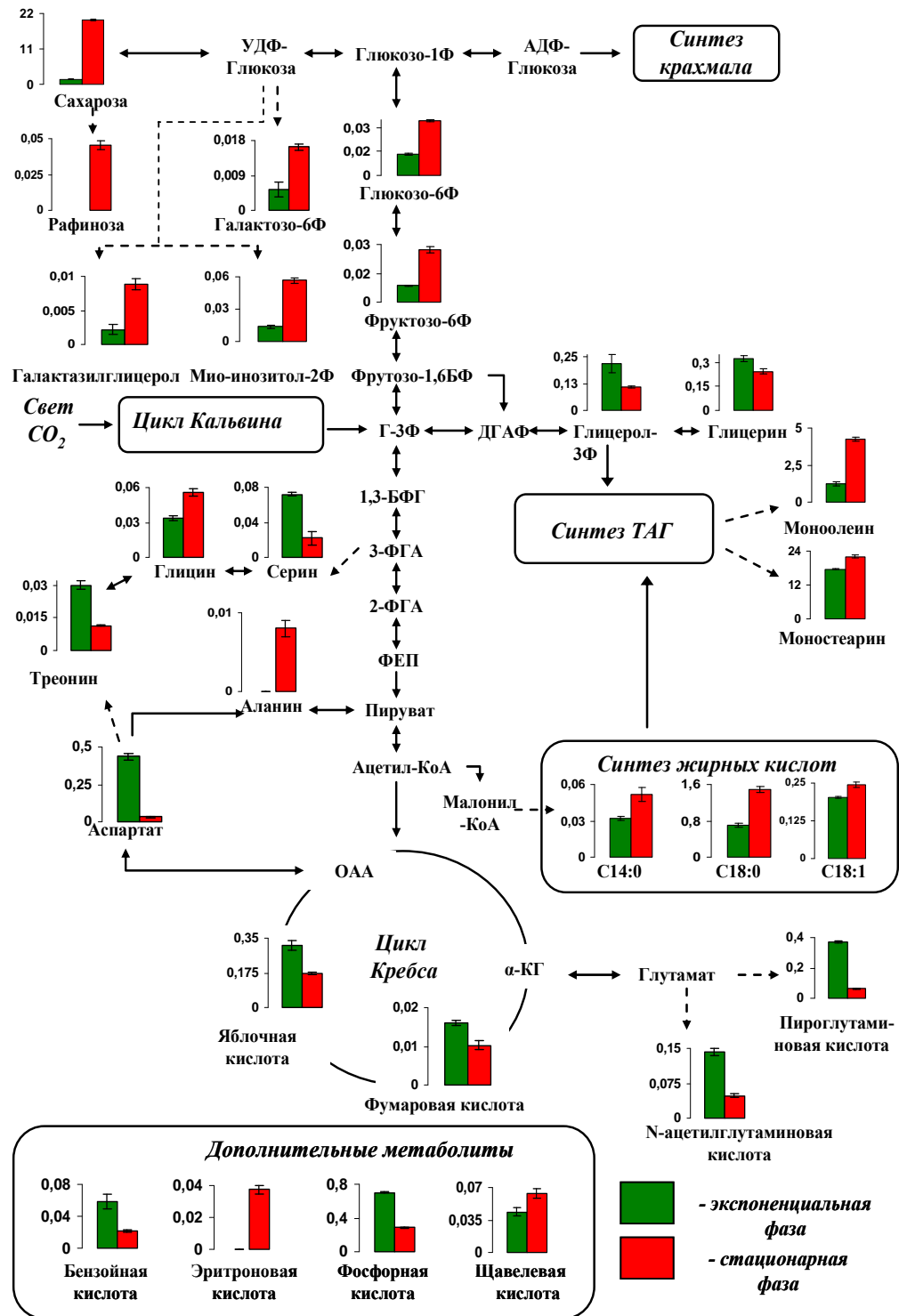


Рисунок 8 – Диаграмма наиболее значимых метаболических изменений штамма *Microstictium* sp. IC-76 в экспоненциальной и стационарной фазах роста по данным метаболического профилирования. УДФ-глюкоза – уридиндифосфатглюкоза; Глюкозо-1Ф – глюкозо-1-фосфат; АДФ-Глюкоза – аденозин-дифосфоглюкоза; Галактозо-6Ф – галактозо-6-фосфат; Глюкозо-6Ф – глюкозо-6-фосфат; Мио-инозитол-2Ф – мио-инозитол-2-фосфат; Фруктозо-6Ф – фруктозо-6-фосфат; Фруктозо-1,6БФ – фруктозо-1,6-бифосфат; Г-3Ф – глицеральдегид-3-фосфат; ДГАФ – дигидроксиацетонфосфат; Глицерол-3Ф – глицерол-3-фосфат; 1,3-БФГ – 1,3-бифосфоглицерат; 3-ФГА – 3-фосфоглицерат; 2-ФГА – 2-фосфоглицерат; ФЕП – фосфоенолпируват; Ацетил-КоА – ацетил-кофермент А; Малонил-КоА – малонил-кофермент А; ОАА – оксалоацетат; α-КГ – альфа-кетоглутарат

В стационарной фазе роста у штамма *Micractinium* sp. IC-76 отмечено изменение уровня отдельных аминокислот (треонина, серина, аланина, глицина, аспарагиновой и пироглутаминовой кислоты), а также метаболитов, участвующих в процессах углеводного обмена (сахарозы, рафинозы, глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата, галактозо-6-фосфата и мио-инозитол-2-фосфата), метаболизме липидов (миристиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот, глицерол-3-фосфата, моноолеина и моностеарина), цикле трикарбоновых кислот (фумаровой и яблочной кислот), при снижении концентрации питательных веществ в среде. Выявлено, что концентрация метаболитов, связанных с циклом глутамата (в том числе пироглутаминовой кислоты и N-ацетилглутаминовой кислоты), участвующих во внутриклеточном перераспределении азотистых веществ при исчерпании питательных веществ в среде, была значительно снижена в стационарной фазе. В этой же фазе роста метаболиты, участвующие в реакциях углеводного метаболизма, показали тенденцию к значительному увеличению их концентрации. При этом наблюдалось почти десятикратное увеличение внутриклеточной концентрации сахарозы в сравнении с экспоненциальной фазой.

### **Сравнительная характеристика свойств выделенных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном и миксотрофном культивировании**

Сравнение характеристик протестированных штаммов при обоих способах культивирования показало, что штаммы *S. abundans* A1175 (при фотоавтотрофном культивировании) и *Micractinium* sp. IC-76 (при миксотрофном культивировании на стерилизованных сточных водах) обладают высоким суммарным содержанием НЖК и МНЖК, что позволяет использовать их для получения биотоплива. Незначительные различия в жирнокислотном составе их липидов наблюдались для C18:0 и C16:0 жирных кислот. При запасании липидов наблюдается ассимиляция азота за счет катаболизма белков и увеличения синтеза отдельных аминокислот, а также значительное увеличение внутриклеточной концентрации метаболитов углеводного обмена.

### **Наработка партии биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 в лабораторной установке и биокаталитическая переэтерификация полученных липидов в МЭЖК**

Получение биомассы с высокой концентрацией липидов с высоким содержанием триацилглицеридов особенно важно при масштабировании процесса производства биодизельного топлива. В связи с этим в данной работе было проведено исследование динамики накопления и состава липидов в биомассе при фотоавтотрофном выращивании штамма *Micractinium* sp. IC-76 в лабораторной установке (с объемом емкости 110 л) (Piligaev et al., 2015) на среде Chu-13 в течение 19 суток. Результаты исследования динамики накопления биомассы и липидов, а также их состава показаны на рисунке 9.

Скорость накопления биомассы при выращивании штамма *Micractinium* sp. IC-76 составила  $Q_b = 35,6 \pm 1,5 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ , продуктивность по липидам  $Q_l = 6,7 \pm 0,7 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  и специфическая скорость роста  $\mu = 0,12 \pm 0,03 \text{ сут}^{-1}$ . По данным ТСХ анализа выявлено, что фаза накопления триацилглицеридов наблюдается в период 12-17 суток от начала выращивания, с максимумом на 17 сутки (Рисунок 9б). При анализе состава биомассы штамма *Micractinium* sp. IC-76 при ее выращивании в установке с использованием ГХ/МС выявлено, что жирные кислоты C16:0, C16:2, C18:1 и C18:2 составляют основную долю всех жирных кислот липидов этой микроводоросли. Суммарное содержание НЖК и МНЖК в стационарной фазе роста на 17 сутки выращивания биомассы составило 44,1%, а урожай биомассы на 17 сутки составил  $0,59 \text{ г л}^{-1}$ .

Использование биокатализаторов на основе ферментов липаз рассматривается как один из перспективных подходов для получения биодизельного топлива, который позволяет снизить образование большого количества отходов при производстве и увеличить энергоэффективность процесса в сравнении с использованием химической переэтерификации липидов. С этой целью в работе был получен биокатализатор на основе липазы *B. ceracia*, удельная активность которого составила  $0,143 \pm 0,005 \text{ ЕА/г}$ . Для оптимизации реакции переэтерификации липидов

*Micractinium* sp. IC-76, полученных на 17 сутки выращивания биомассы в лабораторной установке, был использован метод RSM.

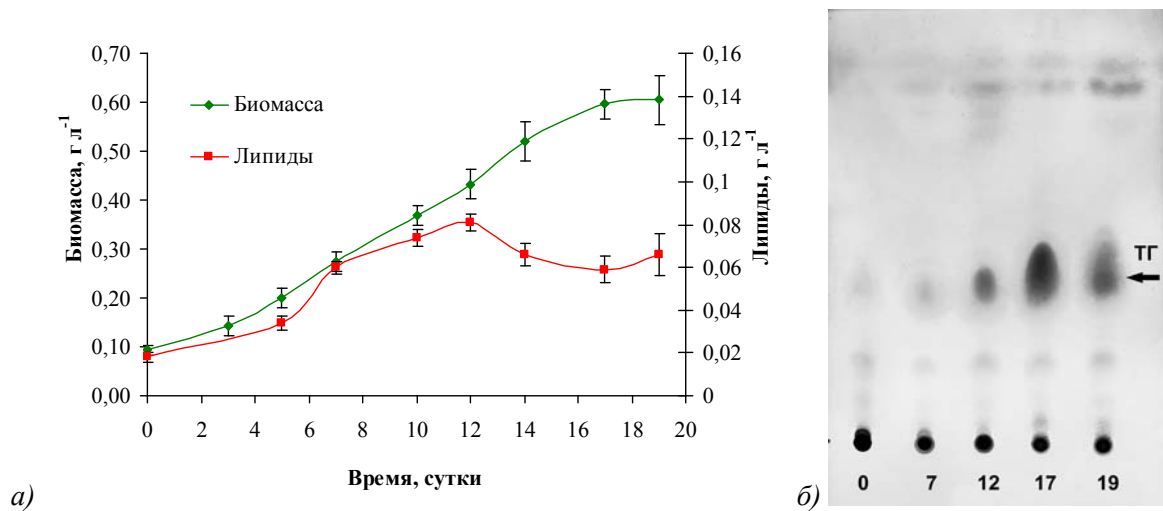


Рисунок 9 – Нарботка партии биомассы штамма микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 в лабораторной установке: а) динамика накопления биомассы и экстрагируемых липидов; б) ТСХ анализ состава липидной фракции микроводоросли. ТГ – триацилглицериды. В качестве внутреннего контроля для ТСХ был использован триолеин (данные не приведены)

Для этого была разработана и оптимизирована (исключение незначимого фактора (С) – содержание воды) полиномиальная модель второго порядка, отражающая зависимость между прогнозируемым выходом МЭЖК и тестируемыми условиями проведения реакции переэтерификации:

$$Y_{\text{пр2}} = 83,69 + 2,41A - 6,30B - 4,54D + 0,13AB - 0,43AD + 0,81BD - 2,78 \times A^2 - 5,05B^2 - 0,13D^2, \quad (1)$$
где  $Y_{\text{пр2}}$  – прогнозируемый выход МЭЖК в реакции переэтерификации в соответствии с оптимизированной моделью, А - количество биокатализатора, В – температура и D – соотношение метанол:масло.

Таблица 1 отражает результаты анализа ANOVA для оптимизированной модели, описываемой уравнением (1), где значение F-критерия увеличилось с 13,49 до 21,7, что указывает на значительное увеличение достоверности полученной модели.

Таблица 1 - ANOVA анализ статистической значимости оптимизированной модели, описываемой уравнением (1)

Источник	Сумма квадратов	df	Средний квадрат	F	$p > F$
Модель	2463,07	9	273,67	21,70	<0,0001
А-концентрация фермента	139,05	1	139,05	11,02	0,0034
В-температура	953,16	1	953,16	75,56	<0,0001
D-метанол:липиды	495,14	1	495,14	39,25	<0,0001
AB	0,26	1	0,26	0,021	0,8867
AD	2,91	1	2,91	0,23	0,6360
BD	10,37	1	10,37	0,82	0,3754
A <sup>2</sup>	216,77	1	216,77	17,18	0,0005
B <sup>2</sup>	714,64	1	714,64	56,65	<0,0001
D <sup>2</sup>	0,45	1	0,45	0,036	0,8523
Остаток	252,28	20	12,61		
Отсутствие соответствия	221,16	15	14,74	2,37	0,1738
Чистая ошибка	31,12	5	6,22		
Скорректированное для среднего	2715,35	29			

На рисунке 10 представлены графики поверхностей модели, полученной после оптимизации, описываемой уравнением (1), где каждый отдельный график поверхности показывает зависимость выхода МЭЖК от двух независимых факторов при фиксированном значении в центральной точке для остальных факторов (температуры, молярное соотношение метанола к липидам, концентрации биокатализатора и воды).

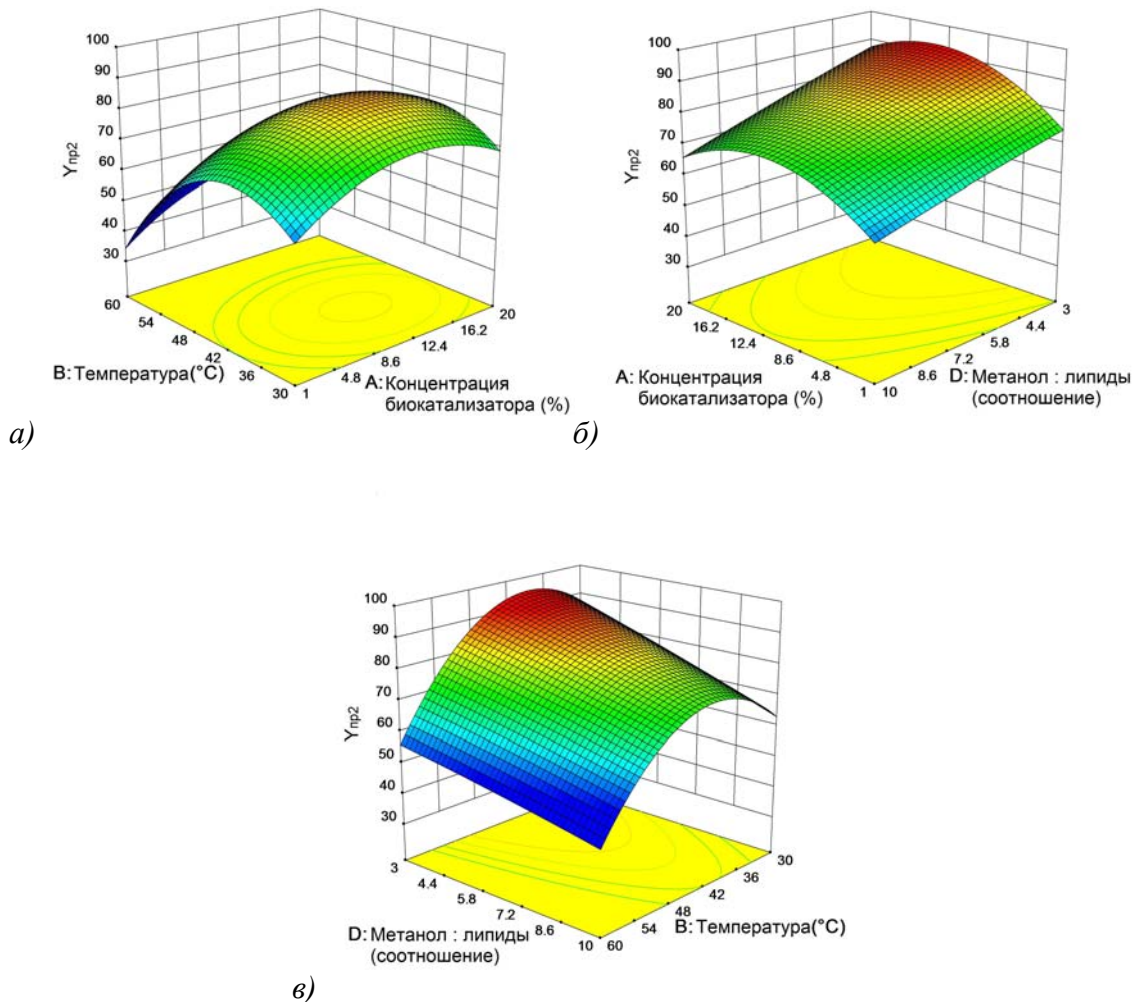


Рисунок 10 - Графики поверхностей отклика независимых переменных: температуры и количества биокатализатора (а), количества биокатализатора и соотношения метанол:липиды (б), соотношения метанол:липиды и температуры (в), на прогнозируемый выход МЭЖК в реакции переэтерификации в соответствии с моделью, описываемой уравнением (1)

С использованием оптимизированной модели максимальный выход  $Y_{пр2}$  был предсказан для следующих условий: количество биокатализатора 9,1%, температура 38,1 °C, концентрация воды 2,5% и соотношение метанол:липиды 1:3,1. Экспериментальное значение выхода МЭЖК в оптимальных условиях ( $Y_{МЭЖК} = 92,3 \pm 1,5\%$ ) хорошо коррелировало с максимальным прогнозируемым выходом ( $Y_{пр2} = 93,9\%$ ). Исследование операционной стабильности биокатализатора в реакции переэтерификации показало, что на четвертом цикле (96 ч) активность биокатализатора в реакции переэтерификации составляет  $48,7 \pm 7,0\%$  от исходной. Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы для получения биодизельного топлива из липидов *Micractinium* sp. IC-76 с использованием экологически чистых биокатализаторов на основе липазы *B. ceracia*.



## ВЫВОДЫ

1. Из природных источников выделены и введены в лабораторную культуру 22 новых штамма микроводорослей, относящихся к родам *Chlorella*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*, *Nannochloris*, *Bracteacoccus*, *Parachlorella*, *Micractinium*, *Chlamydomonas* и *Desmodesmus*.

2. При фотоавтотрофном способе культивирования максимально достигнутой скоростью накопления биомассы обладает природный штамм *S. abundans* A-1175, содержащий  $44,4 \pm 2,7\%$  липидов и  $43,3 \pm 1,2\%$  углеводов в стационарной фазе роста. Содержание насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот у штамма составляет  $72,8\%$ , что позволяет применять его для получения биодизельного топлива. Штамм *Micractinium* sp. IC-76 при миксотрофном культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах обладает содержанием липидов  $36,3 \pm 0,1\%$  и суммарным количеством насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот  $71,9\%$ , что превосходит параметры коллекционного штамма *C. sorokiniana* IPPAS C-1. Высокая эффективность удаления аммонийного азота ( $96,4\%$ ) и ортофосфата ( $71,9\%$ ) из среды делает штамм *Micractinium* sp. IC-76 потенциально применимым для использования в очистке муниципальных сточных вод и для получения биодизельного топлива.

3. У штамма *Micractinium* sp. IC-76 при миксотрофном культивировании на стерилизованных муниципальных сточных водах в процессе накопления липидов в стационарной фазе роста с использованием метаболического профилирования и метода частичных наименьших квадратов выявлено десятикратное увеличение внутриклеточной концентрации сахарозы, по сравнению с экспоненциальной фазой роста.

4. При наработке партии биомассы микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76 в лабораторной установке выявлена фаза роста (17 сутки культивирования), при которой биомасса обладает максимальным содержанием триацилглицеридов, а суммарное количество насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот составляет  $44,1\%$ .

5. Разработан биокатализатор на основе поперечно сшитых ферментных агрегатов липазы *B. ceracia* с удельной активностью  $0,143 \pm 0,005$  ЕА/г. С использованием метода поверхности отклика получена статистическая модель реакции переэтерификации липидов микроводоросли *Micractinium* sp. IC-76, учитывающая влияние температуры, молярного соотношения метанола к липидам, концентрации биокатализатора и воды на выход реакции. Максимально достигнутый выход реакции в оптимальных условиях составил  $92,3 \pm 1,5\%$ .

## Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

### Статьи в журналах

1. Сорокина К.Н., Яковлев В.А., Пилигаев А.В., Кукушкин Р.Г., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А., Пармон В.Н. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики // Катализ в промышленности. – 2012. - №2. – С. 63-72.
2. Piligaev A.V., Sorokina K.N., Bryanskaya A.V., Peltek S.E., Kolchanov N.A., Parmon V.N. Isolation of prospective microalgae strains with high saturated fatty acid content for biofuel production // Algal research. – 2015. – V12. – P. 368-376.
3. Piligaev A.V., Sorokina K.N., Shashkov M.V., Parmon V.N. Screening and comparative metabolic profiling of high lipid content microalgae strains for application in wastewater treatment // Bioresource Technology. – 2018. – V. 250C. – P. 538-547.
4. Piligaev A.V., Sorokina K.N., Samoylova Y.V., Parmon V.N. Lipid production by microalga *Micractinium* sp. IC-76 in a flat panel photobioreactor and its transesterification with cross-linked enzyme aggregates of *Burkholderia cepacia* lipase // Energy Conversion and Management. – 2018. – V. 156. - P. 1–9.

### Монография

Сорокина К.Н., Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Тулупов А.А., Пармон В.Н. Применение биотехнологии для переработки липидов растительного происхождения в ценные продукты и их влияние на здоровье человека. Монография, Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск: ИПЦ НГУ. 2017. 150 с.

### Патент

Сорокина К.Н., Пилигаев А.В., Брянская А.В., Пельтек С.Е., патент RU №2508398 «Штамм микроводоросли *Chlorella vulgaris* A-1123 для получения липидов в качестве сырья для производства моторного топлива».

### Тезисы докладов и материалов конференций

1. Пилигаев А.В., Куклин А.Л., Кукушкин Р.Г. Разработка метода быстрой видовой идентификации и анализ углеводородного состава микроводоросли *Botryococcus braunii* UTEX 2441 // XLVIII Международная научная студенческая конференция "Студент и научно-технический прогресс". 2010. Новосибирск, 10 – 14 апреля. С. 90.
2. Пилигаев А.В. Исследование подходов к выделению микроводорослей и процессов их переработки в углеводороды топливного назначения // XLIX Международная научная студенческая конференция "Студент и научно-технический прогресс". 2011. Новосибирск, 16-20 апреля. С. 121.
3. Kukushkin R.G., Yakovlev V.A., Sorokina K.N., Piligaev A.V., Selishcheva S.A. Microalgae processing for 3G biofuels production // International conference "Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine". 2011. Russia, Saint Petersburg, June 21-24. P.110-111.
4. Пилигаев А. В., Демидов Е.А., Сорокина К.Н., Пельтек С.Е. Разработка метода быстрой видовой идентификации микроводорослей и оценка их углеводородного состава методом MALDI-TOF масс-спектрометрии // V съезд ВМСО IV Всероссийская конференция с международным участием. «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». 2011. Москва, 5-9 сентября. С-80.
5. Piligaev A.V., Demidov E.A., Sorokina K.N., Peltek S.E., Parmon V.N. Rapid method for the isolation and characterization of lipid-producing microalgae strains isolated from natural sources // 21th European Biomass Conference & Exhibition. 2013. Denmark, Copenhagen, June 3-7. P. 89.
6. Пилигаев А.В., Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н. Современное состояние и перспективы развития производства биотоплива из микроводорослей / VIII Международной научно-практической конференции "Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков". 2014. № 8. С. 21-27.

7. Пилигаев А.В. Выделение и исследование свойств липид-продуцирующих штаммов микроводорослей, как сырья для получения биотоплива // Международная молодежная научная конференция "Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии". 2014. Томск. 20-22 октября. С. 46.
8. Пилигаев А.В., Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н. Исследование характеристик роста и накопления липидов штаммом микроводоросли *Chlorella* sp. A1125 в панельном фотобиореакторе как сырья для получения биодизельного топлива // VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 2015. Москва. 17 - 20 марта. С. 307.
9. Пилигаев А.В., Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н. Исследование свойств липид-продуцирующих штаммов микроводорослей, как сырья для получения биотоплива, при культивировании на сточных водах пивоваренных производств // 19-я Международная пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». 2015. Пущино, 20-24 апреля. С.36-37.
10. Пилигаев А.В., Сорокина К.Н., Пармон В.Н. Исследование подходов к экстракции и прямой переэтерификации липидов микроводорослей с использованием ионных жидкостей для процессов получения биодизельного топлива// 20-я Международная пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века». 2016. Пущино, 18-22 апреля. стр. 236-237.
11. Piligaev A.V., Sorokina K.N., Parmon V.N. Isolation and Screening of High Lipid Strains of Microalgae for High Value Biofuel Production // 5<sup>th</sup> International conference "Sustainable Utilization of Tropical Plant Biomass: Bioproducts, Biocatalysts and Biorefinery (SutB4)" 2016. Коимбатор, Индия. 17 - 18 ноября.
12. Пилигаев А.В., Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н. Выделение и исследование свойств липид-продуцирующих штаммов с высоким содержанием насыщенных жирных кислот, предназначенных для получения биодизельного топлива// IX Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 2017. Москва. 20 - 22 февраля. С. 81.
13. Пилигаев А.В., Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Пармон В.Н. Получение высокоэнергетической биомассы микроводорослей с использованием сточных вод как сырья для производства продуктов с высокой добавленной стоимостью // Международная научная конференция «ЭкоБиотех-2017». 2017. Уфа, 9-12 октября.
14. Пилигаев А.В., Сорокина К.Н., Пармон В.Н. Получение высокоэнергетической биомассы микроводорослей с использованием сточных вод// Школа молодых ученых «Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы». 2017. Новосибирск, 13-15 ноября. С. 9-10.
15. Сорокина К.Н., Пилигаев А.В., Самойлова Ю.В., Пармон В.Н. Перспективы применения микроводорослей в биотехнологии и биоэнергетике// Школа молодых ученых «Новые каталитические процессы глубокой переработки углеводородного сырья и биомассы». 2017. Новосибирск, 13-15 ноября. С. 59-60.