На правах рукописи

Самойлова Юлия Валерьевна

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В РЕАКЦИЯХ ГИДРОЛИЗА И ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ

03.01.06 - биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

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 имени М.В. Ломоносова», заведующая лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии химического факультета

Гилева Ирина Павловна
доктор биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», ведущий научный сотрудник отдела геномных исследований и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН)

Защита диссертации состоится «9» апреля 2019 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 « » 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета  Есимбекова Елена Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Термостабильные липолитические ферменты (липазы и эстеразы) широко применяются для получения различных веществ в промышленности, поскольку по сравнению с традиционными каталитическими процессами позволяют значительно повысить экологичность и энергоэффективность производства за счет снижения образования отходов и использования более низких температур. Для повышения стабильности ферментов в процессе эксплуатации используют иммобилизацию на различных носителях, что позволяет многократно использовать полученные биокатализаторы и легко отделять их от реакционной среды. Наиболее часто в иммобилизованном виде используют липолитические ферменты, полученные из термофильных мицеллиальных грибов, бактерий и дрожжей. В состав биокатализаторов для промышленного применения в основном входят липолитические ферменты грибного происхождения, в том числе липазы *Rhizomucor miehei, Aspergillus niger, Thermomyces lanuginosus* и *Pseudozyma antarctica* (*Candida antarctica*). Применение биокатализаторов на основе этих ферментов в ряде случаев сопряжено со снижением их активности вследствие невысоких температурных оптимумов активности (37-50 °C), что делает задачу поиска в природе новых термостабильных липолитических ферментов особенно актуальной. Кроме того, необходимо исследование свойств новых бактериальных липаз и эстераз, поскольку зачастую их стабильность при высокой температуре (70-80 °C) оказывается выше, чем у ферментов, полученных из термофильных грибов.

Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является разработка эффективных подходов к очистке муниципальных сточных вод. Биологическая очистка сточных вод с использованием микроорганизмов не всегда позволяет быстро и эффективно удалять загрязняющие вещества. В связи с этим актуальна разработка новых биокаталитических подходов к очистке сточных вод от различных веществ, а именно, инсектицидов. Применение биокатализаторов для этих целей позволит увеличить скорость и эффективность очистки сточных вод.

Другой актуальной задачей современной биотехнологии является разработка подходов к получению метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), являющимися компонентами биодизельного топлива. Поскольку применение традиционных каталитических подходов для этой цели сопряжено с образованием отходов (сточных вод, мыла), применение иммобилизованных липаз для метанолиза растительных масел является более экологичным и энергоэффективным подходом. Несмотря на то, что ферментативный метанолиз масел пока еще остается дорогостоящим процессом, применение с этой целью биокатализаторов на основе новых бактериальных термостабильных липаз является одним из перспективных подходов для решения задачи получения биодизельного топлива. С этой точки зрения в составе биокатализаторов целесообразно использовать ферменты, продуцируемые бактериями р. *Geobacillus*, так как они обладают высокой термостабильностью.

Помимо получения биодизельного топлива, иммобилизованные липазы применяются в процессах переэтерификации (ПЭ) масел для получения модифицированных пищевых жиров. В отличие от аналогичных химических процессов, применение иммобилизованных липаз позволяет получать масложировые продукты без транс-изомеров жирных кислот. В настоящее время с этой целью преимущественно применяют биокатализатор Lipozyme TL IM (иммобилизованная на силикагеле липаза гриба *T. lanuginosus*). С целью разработки альтернативного биокатализатора необходимо использование липазы с большей операционной стабильностью при температурах процесса до 70 °C. Как и в случае получения МЭЖК, для этого целесообразно применять биокатализаторы на основе термостабильных липаз, продуцируемых бактериями р. *Geobacillus.*

Цель работы - поиск и исследование свойств новых термостабильных бактериальных липолитических ферментов, а также разработка биокатализаторов для применения в биотехнологических процессах, основанных на реакциях гидролиза фосфорорганических

инсектицидов (малатиона) и переэтерификации растительных масел (получение биодизельного топлива и пищевых жиров).

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

1. Выделить и оценить липолитическую активность термофильных бактериальных штаммов при температурах до 65 °C;
2. Клонировать и экспрессировать в *E. coli* термостабильные липолитические ферменты, а также исследовать их свойства;
3. Оценить влияние коэкспрессии с шаперонами на продукцию рекомбинантных липолитических ферментов в *E. coli*;
4. Разработать и исследовать свойства биокатализаторов на основе термостабильных рекомбинантных липолитических ферментов (полученных в работе и липазы штамма *Geobacillus stearothermophilus* G3) и изучить возможность их применения в реакциях гидролиза малатиона (для очистки муниципальных сточных вод) и переэтерификации растительных масел (для получения метиловых эфиров жирных кислот и модифицированных пищевых жиров).

Научная новизна. В работе было проведено выделение и оценка липолитической активности 15 термофильных штаммов бактерий, относящихся к *Bacillus licheniformis, Geobacillus thermodenitrificans, Bacillus* sp., *Geobacillus* sp., *Ureibacillus suwonensis* и *Ureibacillus thermosphaericus*, полученных из образцов компоста, отобранных в Республике Тыва и Новосибирской области. Проведено клонирование и изучены свойства новой термостабильной эстеразы estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* UT1. Выявлено, что estUT1 обладает высокой стабильностью при температурах 50-70 °C и pH 5,0-9,0, а также в присутствии различных химических веществ. Установлено, что estUT1 относится к новому семейству бактериальных липолитических ферментов (семейство XVIII). Коэкспрессия estUT1 с комбинацией шаперонов *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) привела к увеличению ее активности в растворимой фракции клеточного белка, что позволило на ее основе методом поперечной сшивки ферментных агрегатов (ПСФА) получить биокатализатор без использования стадии ренатурации белка из телец включения. Впервые показано успешное применение ПСФА для очистки стерилизованных муниципальных сточных от инсектицида малатиона путем его биокаталитического гидролиза. В работе также впервые показана возможность применения термостабильной рекомбинантной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3, ковалентно иммобилизованной на мезопористом силикагеле, в реакциях переэтерификации для получения МЭЖК (как компонента биодизельного топлива) и модифицированных пищевых жиров.

Теоретическая и практическая значимость. Полученная в работе новая рекомбинантная эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* UT1, относится к новому XVIII семейству бактериальных липолитических ферментов, что расширяет современные знания о свойствах липолитических ферментов и их классификацию. Высокая стабильность этого фермента позволит в дальнейшем применять его для гидролиза различных соединений со сложноэфирными группами с алифатическими радикалами длиной менее восьми атомов углерода. Примененный в работе подход к гидролизу инсектицида малатиона с использованием ПСФА эстеразы estUT1 имеет потенциал для очистки сточных вод за счет высокой эффективности и стабильности биокатализатора.

Полученные результаты о возможности применения иммобилизованной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 в реакциях переэтерификации и метанолиза масел расширяют данные о бактериальных липазах и полученных на их основе биокатализаторов для получения биотоплива и модифицированных пищевых жиров.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Рекомбинантная термостабильная эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* UT1 обладает стабильностью в присутствии органических растворителей и относится к новому семейству липолитических ферментов XVIII.
2. Биокатализатор CLEA-estUT1, полученный методом поперечной сшивки агрегатов белка из очищенной растворимой фракции после коэкспрессии шаперонов и термостабильной эстеразы estUT1 в *E. coli*, обладает высокой эффективностью и стабильностью

в процессе очистки стерилизованных муниципальных сточных вод от фосфорорганического инсектицида малатиона путем его биокаталитического гидролиза.

3. Биокатализатор БКЛ, полученный путем ковалентной иммобилизации термостабильной рекомбинантной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3, обладает стабильностью, но средней эффективностью в процессах получения биодизельного топлива и модифицированных пищевых жиров.

Личный вклад автора. Автор участвовала в постановке цели и задач, решаемых в рамках диссертационной работы, проводила анализ литературы по теме исследования, выполняла основные эксперименты с последующей интерпретацией и обобщением результатов в виде докладов и публикаций по теме диссертационной работы.

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

Апробация диссертационной работы. Основные результаты работы докладывались на российских и международных конференциях, в числе которых: XVII Международная экологическая студенческая конференция «Экология России и сопредельных территорий» (Россия, г. Новосибирск, 2012), II Всероссийская научно-техническая конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике» (Россия, г. Томск, 2013), 51-я Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Россия, г. Новосибирск, 2013), Международная молодежная научная конференция «Современные проблемы генетики, школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Россия, г. Пущино, 2015, 2016), V Международная научно-техническая конференция «Альтернативные источники сырья и топлива» (Беларусь, г. Минск, 2015), Международная научно-практическая конференция «Биотехнология в комплексном развитии регионов» (Россия, г. Москва, 2016), Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Россия, г. Москва, 2017), Международная научная конференция «ЭкоБиотех-2017» (Россия, г. Уфа, 2017).

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-38-00425, № 18-38-00386), Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.512.11.0065) и гранта Президента РФ для ведущих научных школ НШ-6902.2016.3.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 16 печатных работ, из них 5 статей в российских и международных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, 1 монография, а также 10 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 130 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 24 таблицы и 37 рисунков. Список литературы включает 254 источника, из них 220 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования. Для выделения штаммов-продуцентов липолитических ферментов использовали образцы компоста, отобранные в Новосибирской области и Республике Тыва. Ген эстеразы estUT1 был выделен из бактерии *U. thermosphaericus* UT1. Штамм *E. coli* B-1298, продуцирующий липазу G3 бактерии *G. stearothermophilus* G3 предоставлен ФИЦ ИЦИГ СО РАН [патент РФ 2540873, 10.02.2015]. Плазмиды pBB540, несущая гены ClpB и GrpE; pBB542, несущая гены DnaK, DnaJ, GroEL и GroES, предоставлены Берндом Букау [de Marco A., 2007]. Биокатализатор CLEA-estUT1 получен на основе эстеразы estUT1, биокатализатор БКЛ - на основе липазы G3.

Методы исследования. Чистые культуры термофильных бактерий выделяли методом последовательного разведения. Оценку липолитической активности культур проводили по размеру зоны гидролиза на трибутириновом агаре при температуре до 65 °С. Идентификацию выделенных штаммов проводили путем ПЦР по последовательности гена 16S рРНК.

Ген эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* UT1 клонировали в составе вектора pAL-TA (Evrogen) и секвенировали, затем встраивали в экспрессионный вектор pET32b(+) (Novagen) с использованием эндонуклеаз рестрикции BamHI и Sfr274I. Филогенетический анализ проводили с использованием метода ближайших соседей в программе MEGA 6.0. Моделирование структуры фермента проводили с использованием сервера SWISS-MODEL. Каталитическую триаду подтверждали путем сайт-направленного мутагенеза. Экспрессию рекомбинантной эстеразы estUT1 проводили путем индукции ИПТГ клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1. Эстеразу выделяли в виде телец включения (нерастворимая фракция белка) с последующим растворением в мочевине и рефолдингом постадийным диализом. Фермент очищали с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе и затем на Sephadex G25. Полученный белок использовали для исследования свойств рекомбинантной эстеразы. Коэкспрессию рекомбинантной эстеразы estUT1 с комбинацией шаперонов бактерии *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3), несущем плазмиды pET32b-UT1, pBB540 и pBB542, путем индукции ИПТГ. Эстеразу выделяли в виде растворимой фракции белка с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии. Полученный таким образом белок использовали для приготовления биокатализатора CLEA-estUT1.

Экспрессию рекомбинантной липазы G3 проводили путем индукции ИПТГ клеток *E. coli* B-1298. Липазу выделяли методом осаждения сульфатом аммония с последующим диализом. Полученную липазу G3 использовали для приготовления биокатализатора БКЛ.

Оптимизацию приготовления биокатализатора CLEA-estUT1 методом ПСФА проводили с помощью гранецентрированного центрально-композиционного планирования (FCCCD) по методу поверхности отклика (RSM) в программе Design-Expert 10 (Stat-Ease Inc.). Активность estUT1 и CLEA-estUT1 определяли спектрофотометрией при длине волны 405 нм с использованием *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот в качестве субстратов [Eom G.T., 2005]. Операционная стабильность биокатализатора CLEA-estUT1 была исследована в реакции гидролиза малатиона при его начальной концентрации 27,5 мг×л$^{-1}$ в течение 25 циклов (1 цикл - 24 ч) при 37 °С в следующих средах: 50 мМ Tris-HCl pH 7,0, стерилизованная синтетическая среда OECD, имитирующая бытовые сточные воды [OECD Technical Report., 1996] и стерилизованная сточная вода с очистных сооружений г. Новосибирска, Кудряшовские очистные сооружения канализации (среда MWW [Piligaev A.V., 2018]).

Биокатализатор БКЛ готовили методом ковалентной иммобилизации липазы G3 на аминированном силикагеле, обработанным глутаровым альдегидом. Активность липазы G3 и катализатора БКЛ определяли методом алкалиметрического титрования при постоянном pH по скорости гидролиза трибутирина. Биокатализатор БКЛ был исследован в реакции метанолиза подсолнечного масла (ПМ) и в реакции ПЭ ПМ и гидрированного соевого масла (саломаса).

Концентрацию малатиона и МЭЖК определяли методом ГХ-МС на приборе Agilent 7000B. Триацилглицеридный состав масел анализировали методом ВЭЖХ-МС на приборе HPLC-MS 2020 Shimadzu, совмещенным с одинарным квадрупольным масс-спектрометром в режиме выделенных ионов. Температуру плавления масел определяли согласно методу AOCS Cc.3.25.

Все эксперименты в работе, за исключением экспериментов гранецентрированного центрально-композиционного планирования и применения катализатора БКЛ в реакции метанолиза подсолнечного масла, были выполнены в трёх повторениях, результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из образцов компоста, собранных в Новосибирской области и Республике Тыва, были выделены 46 культур термофильных микроорганизмов, растущих при температурах до 65 °С. Видовая идентификация пятнадцати микроорганизмов с наибольшей гидролитической активностью на трибутириновом агаре показала, что выделенные бактериальные штаммы относятся к *B. licheniformis* (7 шт.), *Geobacillus* sp. (1 шт.), *U. suwonensis* (1 шт.), *U. thermosphaericus* (1 шт.), *G. thermodenitrificans* (3 шт.) и *Bacillus* sp. (2 шт.) с идентичностью не менее 99%. Для дальнейших исследований был выбран штамм *U. thermosphaericus* UT1, поскольку он обладал наибольшей липолитической активностью при 60 °С в диапазоне pH 7,0-9,0, а также являлся неизученным в отношении свойств продуцируемых им ферментов.

Клонирование и исследование свойств термостабильной эстеразы estUT1 из бактерии *U. thermosphaericus* UT1

Для исследований была использована эстераза (estUT1), идентичная последовательности WP_016838941.1. Филогенетический анализ (Рисунок 1) аминокислотной последовательности

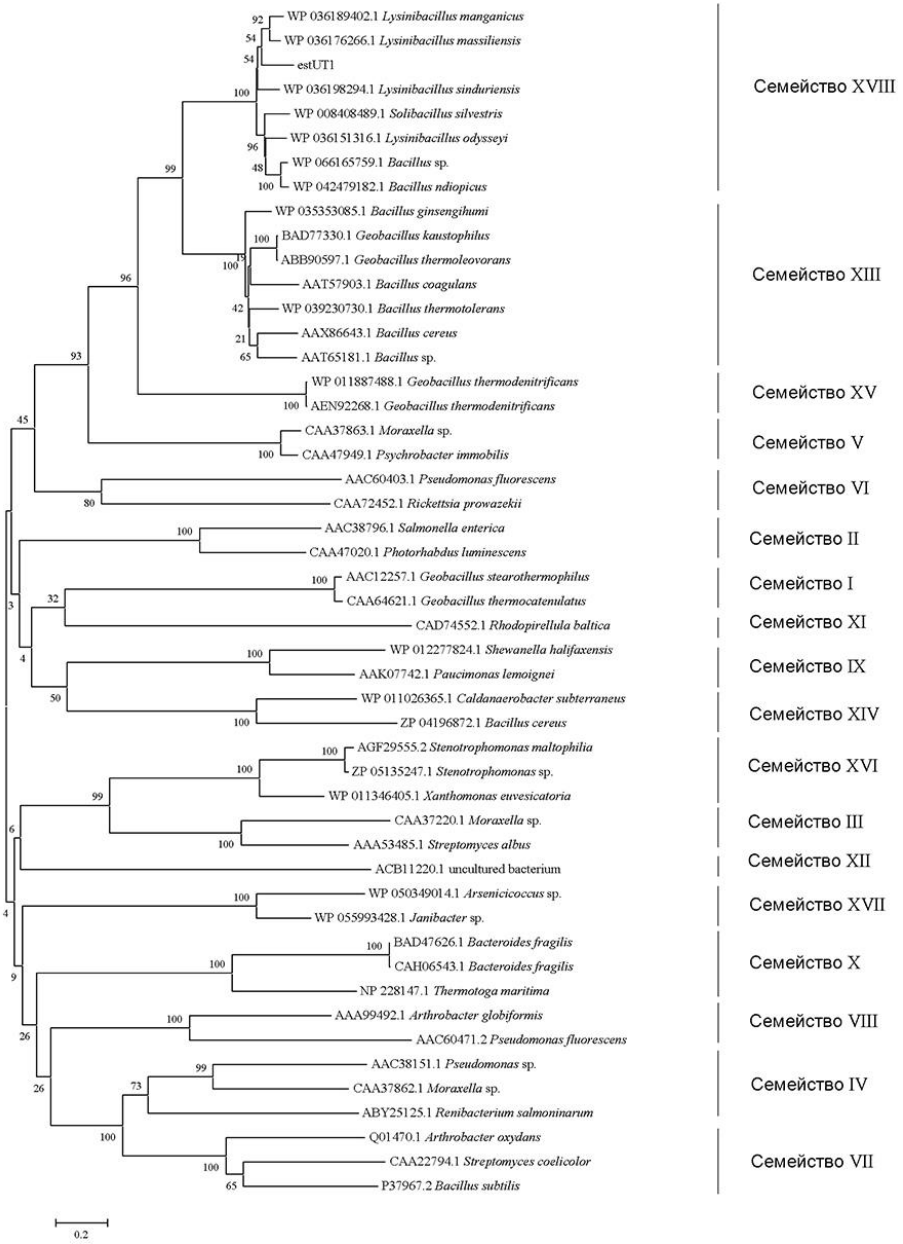

Рисунок 1 – Филогенетический анализ эстеразы estUT1. В точках ветвления указаны результаты для 1000 бутстреповских повторов

estUT1 и представителей известных семейств липолитических ферментов показал, что estUT1 с гомологами образует отдельную группу ферментов. Выявлено, что estUT1 содержит консервативный пентапептид GVSLG, не встречающийся в других семействах (Рисунок 2), что позволяет классифицировать эту эстеразу как представителя нового семейства липолитических ферментов, которому был присвоен номер XVIII. Для уточнения этого предположения дополнительно было проведено исследование биохимических свойств этого фермента.

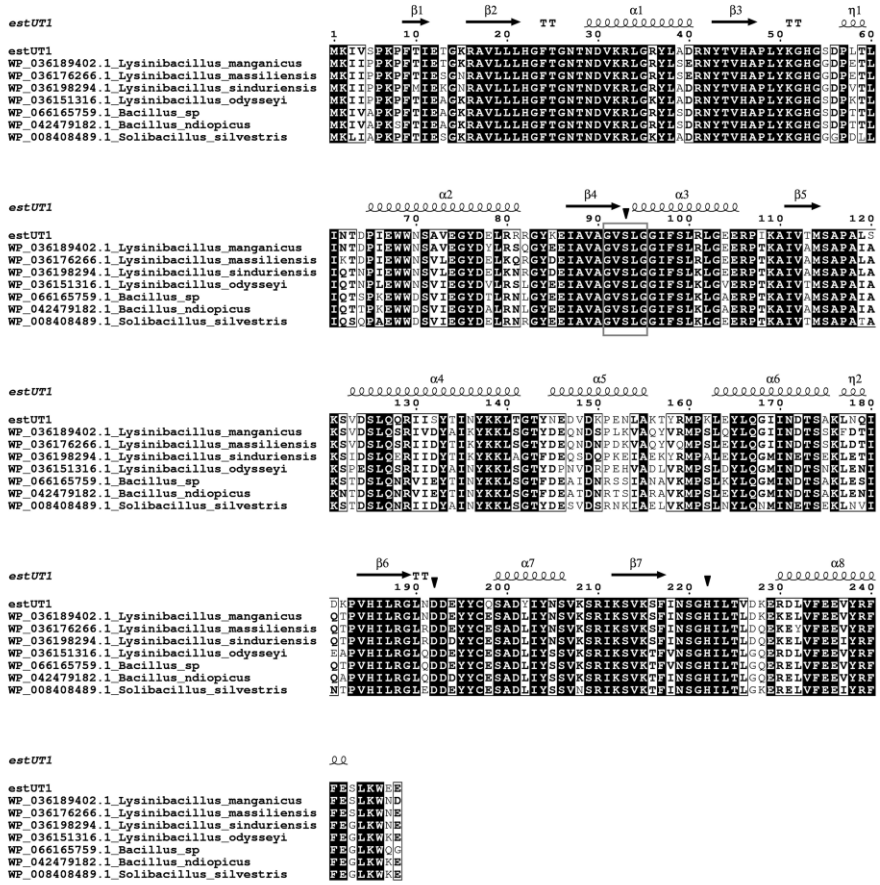

Рисунок 2 – Множественное выравнивание аминокислотной последовательности белка estUT1 с гомологичными последовательностями. Аминокислотные остатки, относящиеся к предполагаемой каталитической триаде, отмечены треугольниками, пентапептид GXSXG заключен в прямоугольник

Для изучения свойств фермента, ген эстеразы estUT1 был клонирован в вектор pET32b(+) и экспрессирован в *E. coli* BL21(DE3). В результате выделения была достигнута десятикратная степень очистки фермента, удельная активность которого составила 1,2 ЕА×мг$^{-1}$ белка, а молекулярная масса ~ 48 кДа (Рисунок 3).

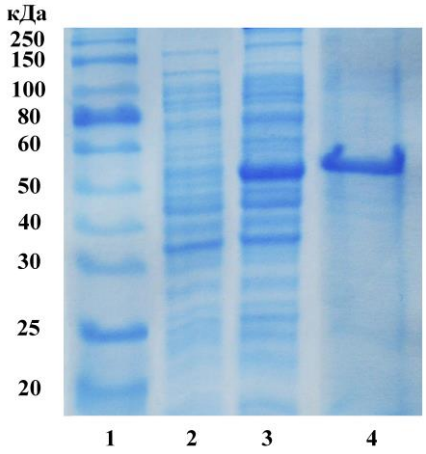

Рисунок 3 – Экспрессия эстеразы estUT1 в E. coli BL21(DE3): 1 – маркер молекулярного веса белков; 2 – растворимая фракция белка в контроле (pET32b(+)); 3 – растворимая фракция белка estUT1; 4 – очищенная нерастворимая фракция белка estUT1 после растворения и рефолдинга телец включения

Моделирование трехмерной структуры estUT1 (Рисунок 4) проводили на основании модели карбоксилэстеразы *Bacillus stearothermophilus* (PDB 2R1D, идентичность 46%).

Проверка качества полученной модели с использованием программы PROCHECK показала, что 93,9% аминокислотных остатков находятся в наиболее благоприятных областях значений карты Рамачандрана. Фермент относится к суперсемейству α/β-гидролаз, состоит из семи β-складчатых листов, окруженных восемью α-спиралями. Аминокислотные остатки Ser93, Asp192 и His222 образуют предполагаемый активный центр фермента. Их функция была подтверждена сайт-направленным мутагенезом с получением каталитически неактивных мутантных ферментов estUT1-Ser93Ala-Mut, estUT1-Asp192Asn-Mut и estUT1-His222Leu-Mut.

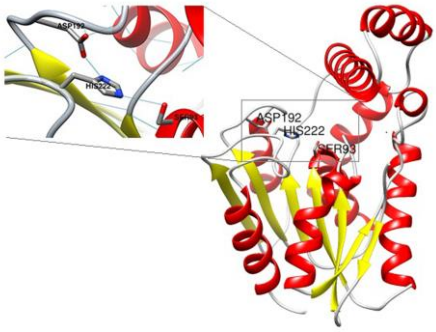

Рисунок 4 – Трехмерная модель эстеразы estUT1. Каталитическая триада фермента образована остатками Ser93, Asp192 и His222

Исследование субстратной специфичности эстеразы estUT1 при 50 °C показало, что фермент предпочтительно гидролизует субстраты с короткоцепочечными остатками жирных кислот (C_2-C_8) с максимальной активностью при использовании *p*NPC2 (принятой за 100,0 ± 3,4%) и невысокой специфичностью по отношению к субстратам со средней длиной жирнокислотных остатков (для *p*NPC8 она составила 9,9 ± 0,5% от контрольного значения), при этом активность практически отсутствовала для *p*NPC12, *p*NPC16 и *p*NPC18. Эстераза estUT1 имеет pH оптимум активности при pH 8,0 (Рисунок 5), а также обладает высокой pH-стабильностью, сохраняя свыше 95% от начальной активности после инкубации при pH 5,0-9,0.

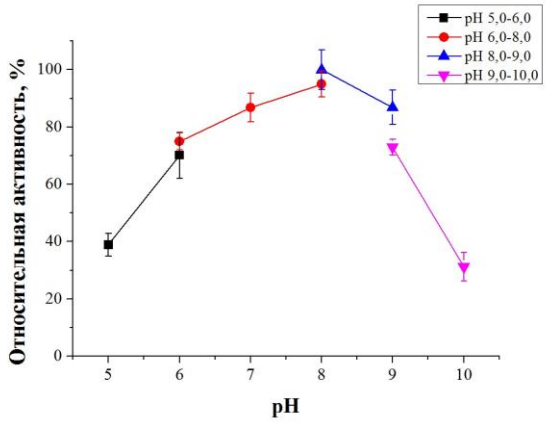

Рисунок 5 – Влияние pH на активность эстеразы estUT1. Активность фермента в буферах с различным pH измеряли с pNPC4 в качестве субстрата при 50 °C. Активность в Tris-HCl pH 8,0 была принята как контрольное значение

Температурный оптимум активности исследуемой эстеразы находится при 70-80 °C (Рисунок 6А). Исследование термостабильности показало, что фермент сохраняет свыше 69% от первоначальной активности при 50-70 °C, а при 80 °C активность фермента снижается до 42,2 ± 6,5% (Рисунок 6Б). Время полуинактивации эстеразы estUT1 при температуре 60 °C составляет около 15 ч, что позволяет считать этот фермент высокотермостабильным.

В Таблице 1 показано, что активность фермента estUT1 сохранялась в присутствии 1 мМ $CaCl_2$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ и $Al_2(SO_4)_3$, 1 мМ 2-меркаптоэтанола и ДТТ. Сильное ингибирующее влияние на фермент оказывали следующие вещества (в концентрации до 10 мМ): $CuSO_4$ и $MgSO_4$ (30-45% от контрольного значения), а также 10 мМ ФМСФ (11,9 ± 1,1% от контрольного значения), последнее говорит о том, что в состав активного центра estUT1 входит сериновый остаток. Присутствие 10 мМ $FeSO_4$, напротив, увеличивало активность фермента до 152,5 ± 2,4% от контрольного значения. Эстераза оставалась активной в присутствии 10 мМ NaCl, KCl, а также ЭДТА, что говорит о том, что estUT1 не является металлоферментом.

Поверхностно-активные вещества (10 мМ Твин 20, Твин 80 и Тритон X-100) оказывали значительное ингибирующее влияние на фермент, в частности Тритон X-100 снижал активность эстеразы до 21,7 ± 3,4% от контрольного значения. При использовании 10% SDS активность estUT1 также снижалась.

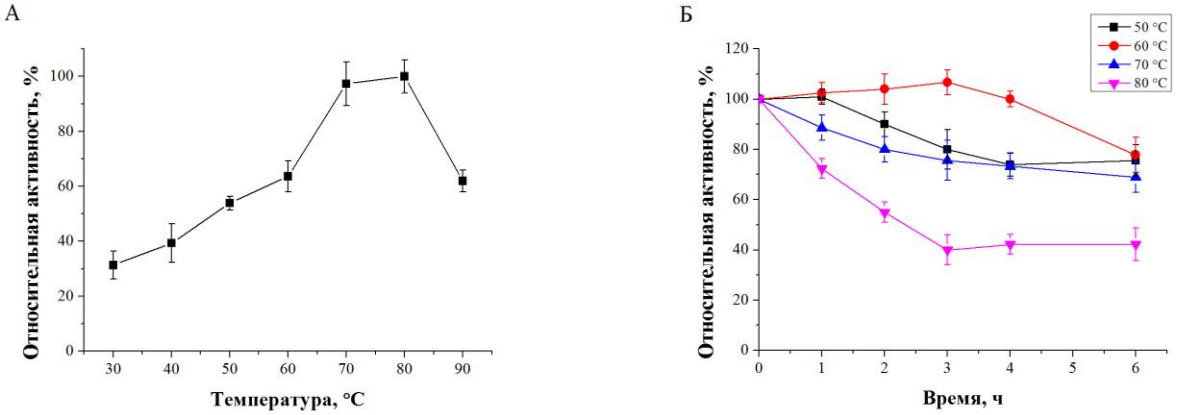

Рисунок 6 – Влияние температуры на активность (А) и стабильность (Б) эстеразы estUT1. (А) Активность фермента в диапазоне температур 30-90 °С измеряли с использованием pNPC4 в качестве субстрата. Активность при 80 °С была принята как контрольное значение (Б) Термостабильность эстеразы определяли при 50-80 °С в течение 6 ч. Остаточную активность измеряли с pNPC4 в качестве субстрата. Исходная активность фермента была принята за 100%

Таблица 1 – Влияние различных химических веществ на активность estUT1. Фермент инкубировали в присутствии добавок в концентрациях 1 и 10 мМ в течение 1 ч. Остаточную активность измеряли с *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность эстеразы без добавления химических веществ была принята как контрольное значение

Добавка	Относительная активность, %		Добавка	Относительная активность, %	
	1 мМ	10 мМ		1 мМ	10 мМ
NaCl	101,1 ± 2,7	95,8 ± 1,7	$Al_2(SO_4)_3$	78,6 ± 0,8	54,2 ± 2,4
KCl	98,0 ± 1,8	100,3 ± 1,7	ЭДТА	109,6 ± 1,4	96,7 ± 1,8
$CaCl_2$	90,3 ± 3,2	87,3 ± 6,0	ДТТ	94,7 ± 2,0	71,7 ± 0,8
$CoCl_2$	81,4 ± 1,6	41,5 ± 1,2	ФМСФ	68,9 ± 2,9	11,9 ± 1,1
$CuSO_4$	29,5 ± 2,4	37,3 ± 4,8	2-меркаптоэтанол	97,2 ± 1,3	79,6 ± 0,9
$MgSO_4$	45,1 ± 2,4	38,1 ± 1,2	SDS	104,2 ± 1,7	85,8 ± 2,2
$MnSO_4$	73,6 ± 1,6	51,7 ± 3,6	Твин 20	71,1 ± 1,7	54,1 ± 0,9
$ZnSO_4$	76,4 ± 2,4	97,4 ± 3,6	Твин 80	76,4 ± 1,8	49,4 ± 1,7
$FeSO_4$	90,3 ± 0,0	152,5 ± 2,4	Тритон X-100	30,6 ± 1,8	21,7 ± 3,4

При исследовании стабильности estUT1 в присутствии органических растворителей было выявлено, что 10 и 30% метанол, этанол, *н*-гексан, ацетон и ДМФА не оказывают влияние на активность фермента (Рисунок 7). Применение 30% изопропанола, ацетонитрила и *н*-бутанола привело к снижению ферментативной активности до 79-90% от контрольного значения. Наибольшее отрицательное влияние на активность оказали 30% растворы ДМСО и хлороформа, в которых фермент сохранил 42-65% активности от контрольного значения.

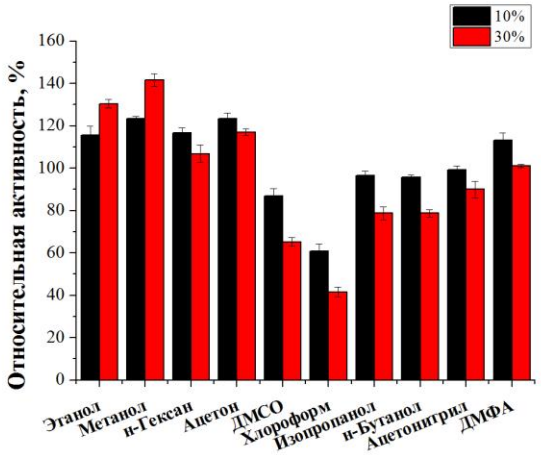

Рисунок 7 – Влияние органических растворителей на активность эстеразы estUT1. Фермент инкубировали 1 ч при 50 °C в присутствии различных растворителей в концентрациях 10 и 30% (об.%). Остаточную активность измеряли с pNPC4 в качестве субстрата. Активность фермента без добавления растворителей была принята за 100%

В работе было показано, что estUT1 стабильна в 10 и 30% метаноле и этаноле – после инкубации при 50 °C в течение 6 ч фермент сохранял свыше 66% от первоначальной активности (Рисунок 8).

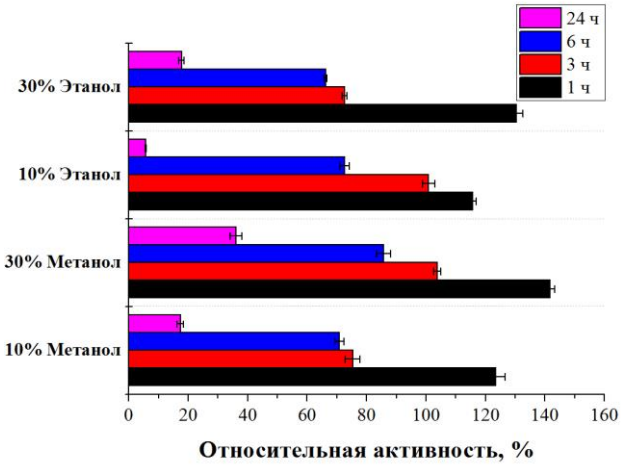

Рисунок 8 – Влияние метанола и этанола на активность estUT1. Фермент инкубировали в течение 24 ч в присутствии метанола и этанола в концентрациях 10 и 30% (об.%). Остаточную активность измеряли с pNPC4 в качестве субстрата. Активность без добавления растворителей была принята за 100%

Исследование кинетических параметров (Таблица 2) estUT1 показало, что этот фермент, как и большинство эстераз, предпочтительно и с высокой эффективностью гидролизует субстраты с короткими ацильными группами, а наибольная каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) наблюдалась для *p*NPC2 и составила 265,62 ± 24,16 $с^{-1}×мМ^{-1}$.

Таблица 2 – Кинетические параметры эстеразы estUT1. Активность фермента измеряли с использованием различных субстратов в концентрациях 0,05-10 мМ

Субстрат	K_M, мМ	k_{cat}, $с^{-1}$	k_{cat}/K_M, $с^{-1}×мМ^{-1}$
*p*NPC2	0,098 ± 0,013	26,03 ± 0,57	265,62 ± 24,16
*p*NPC4	0,581 ± 0,069	44,51 ± 3,22	76,74 ± 4,59
*p*NPC8	2,136 ± 0,393	62,02 ± 6,80	29,04 ± 0,63

Для увеличения продукции эстеразы estUT1 в растворимой форме была проведена ее коэкспрессия с одной из наиболее эффективных систем фолдинга *E. coli*, состоящей из бишаперонной системы KJE, ClpB и системы ELS, которая привела к увеличению удельной активности эстеразы в растворимой фракции клеточного лизата с 22,6 ± 1,7 до 200,7 ± 15,5 ЕА×$мг^{-1}$ белка (Рисунок 9).

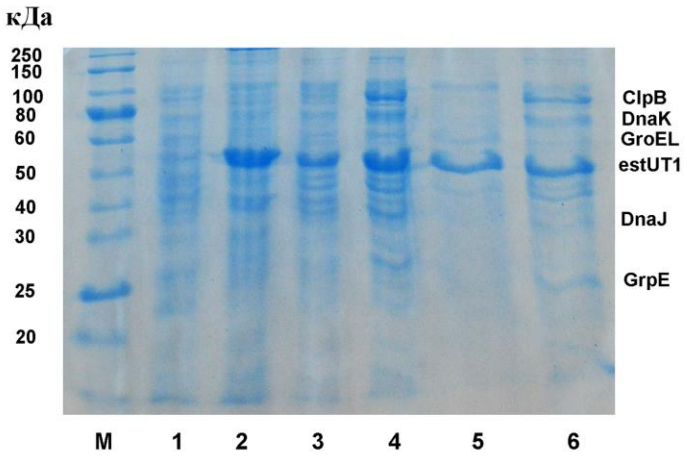

Рисунок 9 – Коэкспрессия эстеразы estUT1 с шаперонами E coli. М – маркер молекулярного веса белков; 1 – растворимая фракция белка в контроле (pET32b(+)); 2 – нерастворимая фракция белка estUT1; 3 – растворимая фракция белка estUT1; 4 – растворимая фракция белка estUT1, полученная коэкспрессией с шаперонами; 5 – очищенная estUT1; 6 – очищенная estUT1, полученная коэкспрессией с шаперонами

Сравнительная характеристика ферментов, использованных в работе и обоснование их применения в составе биокатализаторов для различных биотехнологических процессов

В работе использовали следующие рекомбинантные ферменты, продуцируемые в *E. coli*: эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* UT1 и липаза бактерии *G. stearothermophilus* G3. Оба фермента обладают высокой термостабильностью (свыше 50 °С), но липаза G3 по некоторым своим известным свойствам [патент РФ 2540873] (стабильности при инкубации при 50 °С, устойчивостью к метанолу и этанолу) уступает estUT1. Время полуинактивации эстеразы estUT1 при 50 и 60 °С составляет 12 и 15 ч, соответственно, в то время как для липазы G3 этот показатель составляет 145 и 33 мин, соответственно. Эстераза сохраняет 85,8 ± 2,4 и 66,2 ± 0,5% своей первоначальной активности после инкубации в течение 6 ч при 50 °С в присутствии 30% растворов метанола и этанола, соответственно. Липаза G3 менее стабильна в органических растворителях – после инкубации в течение 3 ч при 45 °С с 30% растворами метанола и этанола фермент сохранял 58 и 29% своей активности, соответственно [патент РФ 2540873].

Липаза G3 обладает способностью к гидролизу сложных эфиров длинноцепочечных жирных кислот (*p*NPC16) [патент РФ 2540873] в отличие от эстеразы estUT1, которая гидролизует сложные эфиры с длиной ацильного остатка менее восьми атомов углерода. Таким образом, эстеразу estUT1 предложено использовать в реакции гидролиза инсектицида малатиона для применения в очистке стерилизованных муниципальных сточных вод. Для приготовления биокатализатора на основе эстеразы целесообразно использовать метод ПСФА, так как он позволяет получать высокоактивный биокатализатор без использования твердого носителя. Липазу G3 предложено применить в составе биокатализаторов для переработки растительных липидов, содержащих длинноцепочечные жирные кислоты: в реакции метанолиза (для получения МЭЖК) и переэтерификации растительных масел (для получения масложировых смесей). Для иммобилизации G3 был использован метод ковалентной иммобилизации на мезопористом силикагеле, так как он позволяет получать стабильные биокатализаторы, применимые в процессах с высокой вязкостью среды. Оба исследуемых в работе фермента являются неизученными с точки зрения предложенных способов иммобилизации.

Применение рекомбинантной иммобилизованной эстеразы estUT1 для очистки муниципальных сточных вод

Для приготовления биокатализатора CLEA-estUT1 на основе эстеразы estUT1 использовали белок с удельной активностью 200,7 ± 15,5 ЕА×мг$^{-1}$, полученный путем коэкспрессии estUT1 с шаперонами *E. coli* и очищенный с использованием аффинной хроматографии. Применение этой фракции белка с высокой активностью для иммобилизации позволяет избежать необходимости ренатурации фермента из телец включения, что упрощает процесс его получения.

Для оптимизации условий иммобилизации estUT1 путем поперечной сшивки с использованием метода поверхности отклика с FCCCD была разработана полиномиальная

модель второго порядка, отражающая зависимость между прогнозируемой степенью иммобилизации и параметрами иммобилизации:

$$ImD\ (\text{CLEA-estUT1}) = 66.18 + 4.74A + 6.70B + 7.78C + 13.84D + 3.28AB + 2.12AC + 0.50AD + 0.45BC + 1.13BD - 0.47CD - 23.67A^2 - 10.69B^2 - 7.42C^2 + 7.32D^2, \quad (1)$$

где *ImD* – степень иммобилизации, A – время иммобилизации, B – концентрация сульфата аммония, C – концентрация глутарового альдегида и D – концентрация БСА.

Уравнение регрессии (1), применяемое для описания взаимодействия между переменными, представлено графиками трехмерной поверхности (Рисунок 10), отражающими зависимость степени иммобилизации от двух независимых факторов при фиксированном в центральной точке значении для остальных факторов.

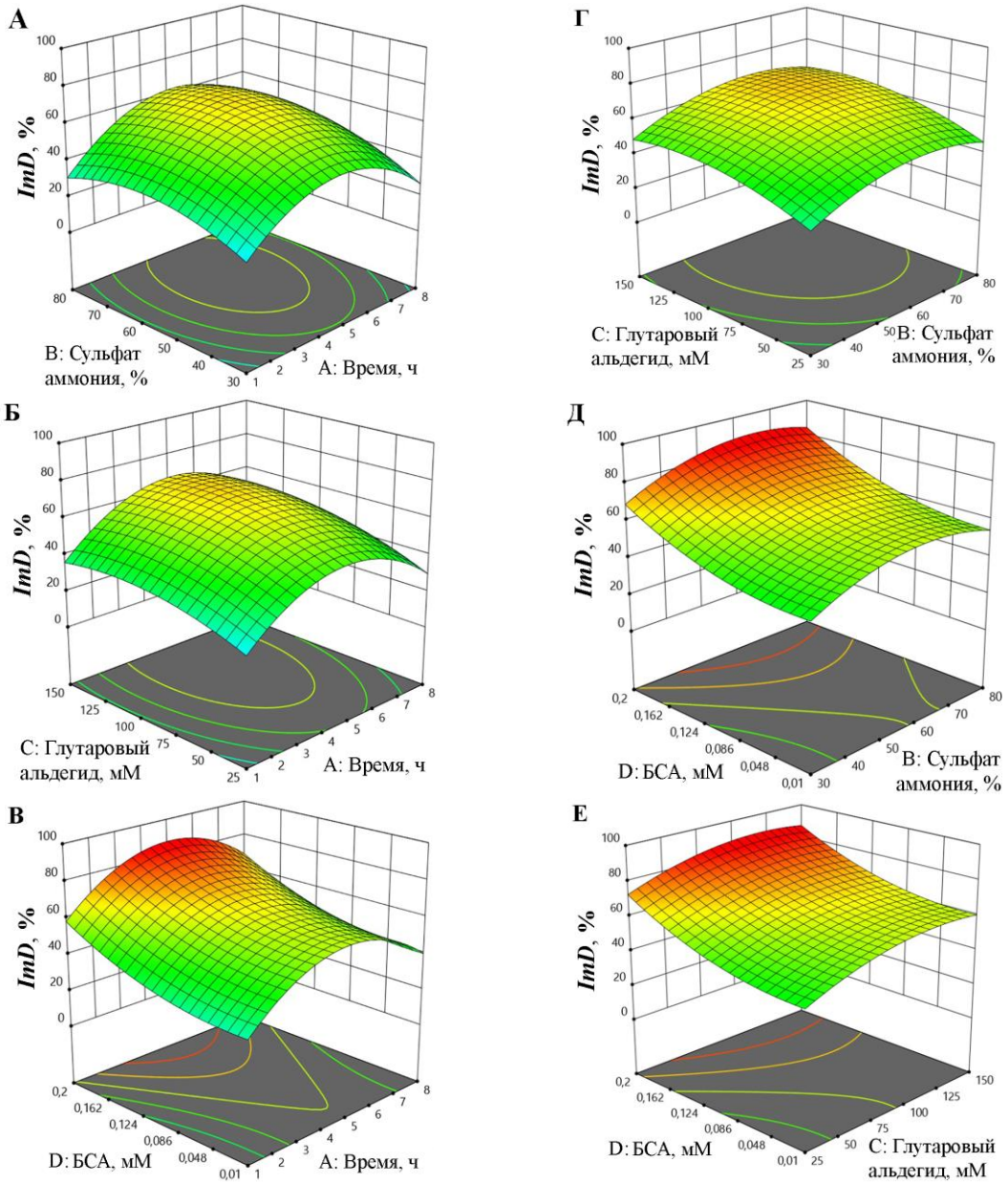

Рисунок 10 – Графики поверхностей отклика независимых переменных: (А) концентрация сульфата аммония и время иммобилизации; (Б) Концентрация глутарового альдегида и время иммобилизации; (В) концентрация БСА и время иммобилизации; (Г) концентрация глутарового альдегида и сульфата аммония; (Д) концентрация БСА и сульфата аммония; (Е) концентрация БСА и глутарового альдегида, на прогнозируемую степень иммобилизации CLEA-estUT1

Дисперсионный анализ переменных показал, что модель является статистически значимой (R^2 = 0,97, F-фактор = 33,36 и p < 0,0001). Наиболее значимыми факторами для приготовления CLEA-estUT1 являются время иммобилизации и концентрация БСА (p < 0,0001). Концентрация глутарового альдегида (p = 0,0011) и сульфата аммония (p = 0,0002) оказывают меньший эффект на степень иммобилизации CLEA-estUT1.

В соответствии с расчетами на основе полученной модели оптимальными условиями для приготовления CLEA-estUT1 являются: время иммобилизации 5,1 ч, сульфат аммония 65,1% (вес./об.), глутаровый альдегид 120,6 (вес./об.) и БСА 0,2 мМ (вес./об.). Предсказанное с помощью разработанной статистической модели значение *ImD* в оптимальных условиях равное 91,3% хорошо согласуется с полученным экспериментальным значением (90,6 ± 2,7%). Удельная активность полученного биокатализатора CLEA-estUT1 составила 29,4 ± 0,5 ЕА×мг$^{-1}$ биокатализатора.

В работе было показано, что иммобилизация эстеразы estUT1 методом ПСФА значительно повысила ее стабильность, что объясняется возникновением дополнительных ковалентных связей в структуре белка. На рисунке 11А показано, что оптимум активности фермента до и после иммобилизации наблюдался при pH 8,0, однако иммобилизация повысила активность фермента во всем исследуемом диапазоне pH. Биокатализатор CLEA-estUT1 отличался повышенной стабильностью при pH 5,0-10,0 (Рисунок 11Б).

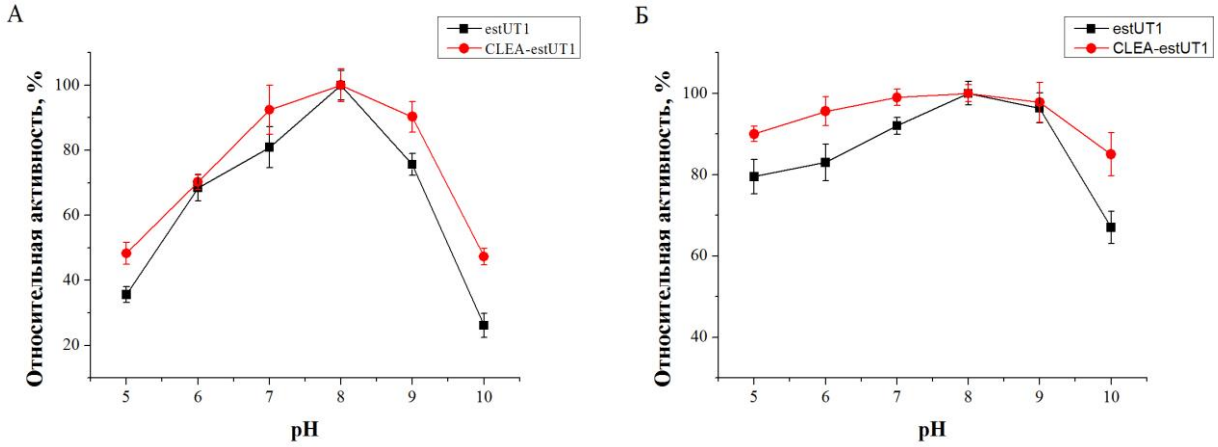

Рисунок 11 – Влияние pH на активность (А) и стабильность (Б) свободной и иммобилизованной estUT1. (А) Активность измеряли с pNPC2 в качестве субстрата в буферах с различными pH. Активность в Tris-HCl pH 8,0 была принята за 100%. (Б) pH-стабильность определяли в буферах с различным pH через 1 ч инкубации. Остаточную активность измеряли с pNPC2 в качестве субстрата. Активность фермента без инкубации была принята за 100%

Как показано на рисунке 12, иммобилизация не повлияла на температурный оптимум estUT1 (70-80 °C), однако, по сравнению с неиммобилизованной эстеразой, биокатализатор CLEA-estUT1 отличался более высокой активностью в диапазоне температур 30-90 °C. Было

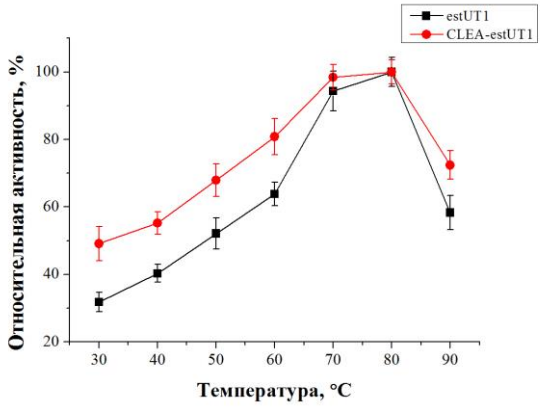

Рисунок 12 – Влияние температуры на активность свободной и иммобилизованной estUT1. Активность estUT1 и CLEA-estUT1 при 30-90 °C измеряли с использованием pNPC2 в качестве субстрата. Активность при 80 °C была принята за 100%

установлено, что после иммобилизации возросла термостабильность фермента при 50-80°C. Отмечено, что при 50 и 60 °C $t_{1/2}$ для эстеразы после иммобилизации увеличились в 1,9 и 1,5 раз и стали равны 31,3 и 22,5 ч, соответственно.

Исследование влияния различных веществ (Рисунок 13) на фермент в обеих формах выявило более высокую стабильность иммобилизованной эстеразы по сравнению со свободной. После инкубации CLEA-estUT1 с 10 мМ растворами ФМСФ, ДТТ, 2-меркаптоэтанола, а также 1% растворами SDS и Твин 20 ее активность была больше в 1,9, 1,2, 1,2, 1,5 и 1,6 раз, соответственно.

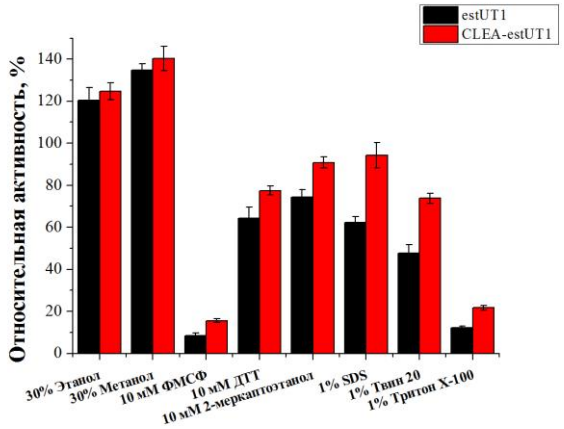

Рисунок 13 – Влияние различных добавок на активность свободной и иммобилизованной estUT1. EstUT1 и CLEA-estUT1 инкубировали в присутствии различных добавок в течение 1 ч. Остаточную активность измеряли с pNPC2 в качестве субстрата. Активность фермента без добавления химических веществ была принята за 100%

При исследовании кинетических параметров (Таблица 3) свободной и иммобилизованной эстеразы было выявлено, что после иммобилизации значение K_M для CLEA-estUT1 увеличилось для всех исследуемых субстратов, а значение k_{cat}/K_M для CLEA-estUT1 было меньше, чем для свободного фермента. Отмечена высокая каталитическая эффективность иммобилизованного фермента в отношении малатиона: k_{cat}/K_M (CLEA-estUT1) 515,4 ± 22,8 $с^{-1}\times мМ^{-1}$.

Таблица 3 – Сравнение кинетических параметров свободной и иммобилизованной estUT1. Активность оценивали при 50 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 (для эфиров *n*-нитрофенола) и при 37 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 (для малатиона) с использованием субстратов в концентрациях 0,003-10 мМ

Субстрат	K_M, мкМ		k_{cat}, $с^{-1}$		k_{cat}/K_M, $с^{-1}\times мМ^{-1}$	
	estUT1	CLEA-estUT1	estUT1	CLEA-estUT1	estUT1	CLEA-estUT1
*p*NPC2	96,0 ± 5,3	176,7 ± 8,5	27,0 ± 0,7	31,1 ± 1,2	281,3 ± 8,7	176,1 ± 2,2
*p*NPC4	550,0 ± 78,1	710,7 ± 64,7	39,2 ± 1,2	41,8 ± 0,4	72,1 ± 8,8	59,1 ± 5,6
*p*NPC8	2113,3 ± 180,4	2490,0 ± 141,8	54,1 ± 2,0	56,9 ± 1,2	25,2 ± 1,3	22,9 ± 1,1
Малатион	19,5 ± 1,1	29,6 ± 3,3	16,3 ± 0,3	15,2 ± 1,0	835,5 ± 58,7	515,4 ± 22,8

CLEA-estUT1 обеспечил высокую степень гидролиза малатиона (*MHD*) свыше 99% во всех исследуемых средах при 37 °C после 14 ч реакции (Рисунок 14); *MHD* в среде MWW составила 99,5 ±1,4%. Исследование операционной стабильности биокатализатора CLEA-estUT1 в среде MWW показало, что степень гидролиза малатиона составила 55,2 ± 1,1% после 25 циклов реакции (350 ч), $t_{1/2}$ составило 462 ч. Использование синтетической среды OECD выявило сходную эффективность гидролиза малатиона (54,8 ± 2,4% после 25 циклов), хотя и несколько меньшую, чем при использовании 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 (78,1 ± 3,1% после 25 циклов).

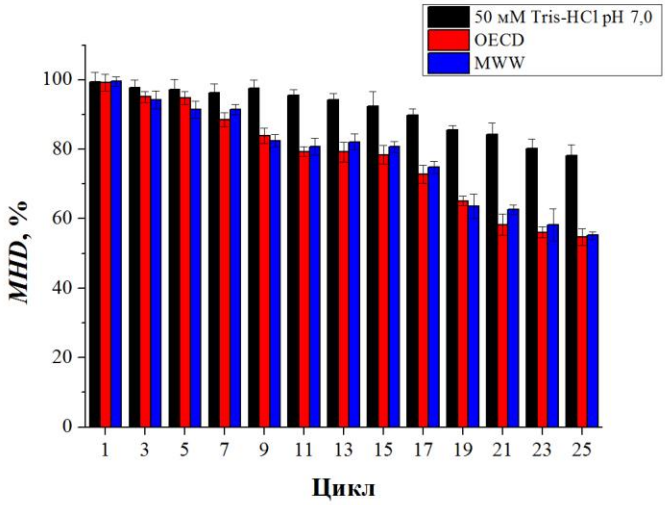

Рисунок 14 – Операционная стабильность CLEA-estUT1 в реакции гидролиза малатиона в различных средах (1 цикл = 14 ч)

Применение рекомбинантной иммобилизованной липазы G3 для получения МЭЖК и переэтерифицированных масложировых смесей

Для приготовления биокатализатора БКЛ была использована рекомбинантная липаза бактерии *G. stearothermophilus* G3 с активностью 483,2 ЕА×г$^{-1}$ белка, полученная из клеток продуцента *E. coli* B-1298. Степень иммобилизации биокатализатора БКЛ составила 8,7%, а удельная активность – 23,6 ЕА×г$^{-1}$ биокатализатора.

Применение биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом для получения МЭЖК

Для применения биокатализатора БКЛ в реакции метанолиза ПМ была проведена предварительная оптимизация следующих параметров: тип растворителя и его количество (2-10 мл); температуры (30-60 °С); количества биокатализатора (0,25-20%, вес./вес.), метанола (соотношение метанол:ПМ от 1:1 до 9:1) и воды (1-10%, об./вес.). Для улучшения разделения фаз в процессе ПЭ и снижения ингибирующего влияния образующегося глицерина на фермент в работе были использованы ацетон, *н*-гексан и *трет*-бутанол. Показано, что использование *трет*-бутанола является предпочтительным для получения наибольшего выхода МЭЖК ($Y_{МЭЖК}$). При оптимизации концентрации БКЛ в реакционной смеси было показано, что наибольший $Y_{МЭЖК}$ = 36,9% наблюдался с использованием биокатализатора в концентрации 20% (вес./вес.). Установлено, что активность БКЛ снижается при повышенных температурах в реакции ПЭ (при 60 °С $Y_{МЭЖК}$ составил 2,4%), поэтому для дальнейшего исследования была выбрана температура процесса 40 °С ($Y_{МЭЖК}$ = 10,7%). Выявлено, что наибольший $Y_{МЭЖК}$ (13,7%) достигался в присутствии 4 мл *трет*-бутанола в качестве растворителя. Исследование влияния мольного соотношения метанол:масло на выход реакции показало, что при соотношении метанол:масло от 3:1 до 6:1 $Y_{МЭЖК}$ остается постоянным и составляет 11,3 и 11,7%, соответственно, поэтому для дальнейших исследований было выбрано соотношение 3:1. Исследование влияния воды на реакцию метанолиза выявило, что для эффективного функционирования биокатализатора БКЛ оптимальным количеством является 4% воды (об./вес.), при этом $Y_{МЭЖК}$ составляет 16,4%.

Для определения операционной стабильности биокатализатора БКЛ оценивали его активность в течение 20 циклов реакции метанолиза в оптимальных условиях: содержание биокатализатора 20% (вес./вес.), температура реакции 40 °С, мольное соотношение метанол:масло 3:1, содержание *трет*-бутанола 4 мл, содержание воды 4% (вес./об.) (Рисунок 15). При исследовании операционной стабильности БКЛ в реакции метанолиза получен $Y_{МЭЖК}$ = 22,9% после 20 циклов (480 ч), $t_{1/2}$ биокатализатора составило 477 ч. Максимально достигнутый выход МЭЖК составил 44%.

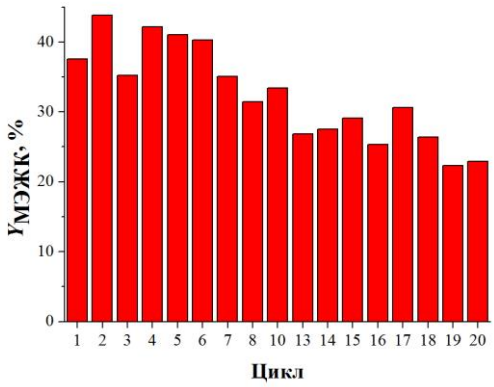

Рисунок 15 – Операционная стабильность БКЛ в реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом (1 цикл = 24 ч)

Применение биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации смеси подсолнечного и гидрированного соевого масла для получения модифицированных жиров

Для оптимизации процесса ПЭ смеси подсолнечного масла и саломаса с применением БКЛ было исследовано влияние на степень переэтерификации (*ID*) следующих параметров: температуры (70-80 °С) и времени (1-5 ч) реакции; количества биокатализатора (10-30%, вес./вес.); молярного соотношения саломас:ПМ (1:9-2:3). Было установлено, что достаточным количеством биокатализатора является 10% (вес./вес.), при котором достигается *ID* = 57% после 2 ч реакции. Максимальная степень переэтерификации (*ID* = 57%) достигалась при проведении процесса при температуре 70 °С, при повышении температуры наблюдалась термическая инактивация биокатализатора – при 80°С *ID* составила 38,6%. Оптимальным соотношением саломас:ПМ оказалось 1:3 (*ID* = 48%).

В работе также исследована операционная стабильность биокатализатора БКЛ в течение 5 циклов в реакции ПЭ смеси ПМ и саломаса в оптимальных условиях: количество биокатализатора 10% (вес./вес.), температура 70 °С, молярное соотношение саломас:ПМ 1:3. На рисунке 16 показано, что после первого цикла реакции наблюдалась максимальная степень переэтерификации (*ID* = 51%), а после пятого (120 ч) биокатализатор сохранил 56,4% от первоначальной активности (*ID* = 29,8%), $t_{1/2}$ биокатализатора БКЛ составило 121 ч.

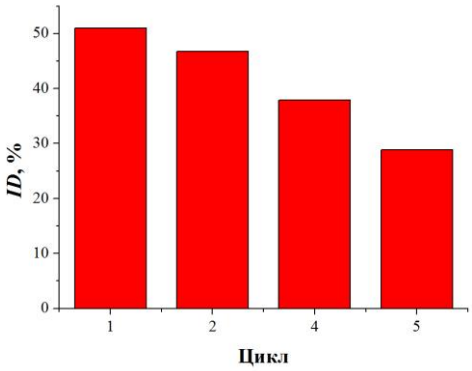

Рисунок 16 – Операционная стабильность БКЛ в реакции переэтерификации смеси саломаса и ПМ (1 цикл = 24 ч)

Анализ продуктов реакции с использованием метода ВЭЖХ-МС выявил изменение триацилглицеридного состава масел через 2 ч реакции ПЭ: в смеси продуктов был выявлен триацилглицерид SOS, а также увеличилось содержание переэтерифицированных триацилглицеридов, таких как OLO, SLL, SOL, SOO. В продукте произошло уменьшение концентрации триацилглицеридов с высоким содержанием ненасыщенных остатков жирных кислот (LLL, LLP и LOL), что способствует стабильности продуктов реакции переэтерификации к окислению на воздухе. Установлено, что при ПЭ смеси масел в оптимальных условиях в течение 2 ч произошло снижение температуры плавления полученной переэтерифицированной масложировой смеси с 60 до 56 °С, что связано с увеличением

концентрации триацилглециридов с более низкой температурой плавления, что коррелирует с данными ВЭЖХ-МС анализа.

Характеристика полученных в работе биокатализаторов

В работе были получены два биокатализатора (CLEA-estUT1 и БКЛ), различающиеся по своим свойствам, что позволило применить их в различных процессах, связанных с реакциями гидролиза (гидролиз малатиона в сточных водах) и ПЭ соединений со сложноэфирными связями для получения биодизельного топлива и модифицированных жиров.

Было показано, что применение метода ПСФА для приготовления биокатализатора на основе рекомбинантной эстеразы estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* позволило получить высокоактивный биокатализатор CLEA-estUT1 с удельной активностью 29,4 ± 0,5 ЕА×мг$^{-1}$ биокатализатора. Оптимизация условий приготовления биокатализатора позволила получить высокую степень иммобилизации белка (90,6 ± 2,7%). Полученный биокатализатор CLEA-estUT1 отличался высокой стабильностью в денатурирующих условиях, в том числе при высокой температуре (50-80 °С), различных pH (5,0-9,0), и в присутствии ряда химических веществ, а также обладал высокой операционной стабильностью в реакции гидролиза малатиона в стерилизованных муниципальных сточных водах (*MHD* = 99,5 ±1,4% после 14 ч), но и превзошел по активности известные биокатализаторы, например, на основе штамма *Bacillus* sp. S14 (*MHD* составила 64,4% после 8 ч [Adhikari S., 2010]). Таким образом, иммобилизованная эстераза estUT1 является эффективным биокатализатором для применения в процессах гидролиза инсектицидов, в том числе для очистки от них стерилизованных муниципальных сточных вод.

Биокатализатор БКЛ (с удельной активностью 23,6 ЕА×г$^{-1}$ биокатализатора) был получен методом ковалентной иммобилизации рекомбинантной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 на силикагеле. В работе впервые продемонстрирована возможность применения биокатализатора на основе липазы бактерии *G. stearothermophilus* в реакции ПЭ масел для получения биодизельного топлива и модифицированных жиров. Биокатализатор БКЛ оказался стабилен при эксплуатации как в реакции метанолиза ПМ ($t_{1/2}$ 477 ч), так и в реакции ПЭ смеси подсолнечного и гидрированного соевого масел ($t_{1/2}$ 121 ч). Однако в обоих процессах он показал среднюю эффективность (максимально достигнутые выходы за 24 ч: в процессе метанолиза $Y_{МЭЖК}$ = 44% и переэтерификации *ID* = 51%), в то время, как для аналогичных биокатализаторов эти показатели несколько выше. Например, ковалентно иммобилизованная на силикагеле бактериальная липаза *Bacillus aerius* в реакции метанолиза касторового масла обеспечивала максимальный выход МЭЖК 78,13% за 96 ч [Narwal S.K., 2015]. В реакции ПЭ смеси масел, биокатализатор Lipozyme TL-IM на основе грибной липазы *T. lanuginosus*, обеспечивает 100% степень ПЭ за 6 ч [Zhang H., 2001]. Полученные в данной работе результаты будут являться основой для улучшения свойств биокатализаторов на основе липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 для их применения в реакциях переэтерификации сложных эфиров длинноцепочечных жирных кислот.

ВЫВОДЫ

1. Проведено выделение пятнадцати термофильных бактериальных штаммов с липолитической активностью, относящихся к *B. licheniformis, G. thermodenitrificans, Bacillus* sp., *Geobacillus* sp., *U. suwonensis* и *U. thermosphaericus*. Штамм *U. thermosphaericus* UT1 обладает наибольшей липолитической активностью при температуре 60 °С и pH 7,0-9,0.
2. Проведено клонирование гена эстеразы estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* UT1, ее экспрессия в *E. coli* BL21(DE3) и исследование ее свойств. Показано, что estUT1 обладает оптимумом активности при 70-80 °С и pH 8,0, специфично гидролизует сложные эфиры короткоцепочечных жирных кислот (C_2-C_8) и стабильна в присутствии органических растворителей (30% метанол и этанол). Установлено, что estUT1 относится к новому семейству липолитических ферментов XVIII.

3. Показано, что коэкспрессия шаперонов *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) и эстеразы estUT1 обеспечивает увеличение ее удельной активности в растворимой фракции белка клеточного лизата *E. coli* BL21(DE3) с 22,6 ± 1,7 до 200,7 ± 15,5 ЕА×мг$^{-1}$ белка.

4. С использованием метода поперечной сшивки ферментных агрегатов на основе рекомбинантной эстеразы estUT1 в оптимальных условиях, определенных с помощью метода поверхности отклика, получен биокатализатор CLEA-estUT1 с удельной активностью 29,4 ± 0,5 ЕА×мг$^{-1}$ биокатализатора. Выявлено, что иммобилизация повысила стабильность estUT1 при 50-80 °C, pH 5,0-9,0 и в присутствии химических веществ. CLEA-estUT1 обладает высокой операционной стабильностью (время полуинактивации составляет 462 ч) и эффективностью (степень гидролиза малатиона 99,5 ±1,4%) в реакции гидролиза инсектицида малатиона в стерилизованных муниципальных сточных водах.

5. Методом ковалентной иммобилизации термостабильной рекомбинантной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 на мезопористом силикагеле получен биокатализатор БКЛ с удельной активностью 23,6 ЕА×г$^{-1}$ биокатализатора. Выявлено, что БКЛ обладает стабильностью, но средней эффективностью в реакциях метанолиза и переэтерификации растительных масел. В реакции метанолиза подсолнечного масла БКЛ обеспечивает максимально достигнутый выход МЭЖК 44%, время полуинактивации биокатализатора - 477 ч. Применение БКЛ в реакции переэтерификации смеси гидрированного соевого и подсолнечного масла позволяет получить смесь модифицированных пищевых жиров с максимально достигнутой степенью переэтерификации 51%, время полуинактивации биокатализатора составляет 121 ч.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

Статьи в журналах

1. **Samoylova Y.V.** Cloning, expression and characterization of the esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* which belongs to a new lipase family XVIII / Y.V. Samoylova, K.N. Sorokina, M.V. Romanenko, V.N. Parmon // Extremophiles. – 2018. – V. 22. – № 2. – P. 271-285.

2. **Samoylova Y.V.** Preparation of stable cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of a *Ureibacillus thermosphaericus* esterase for application in malathion removal from wastewater / Y.V. Samoylova, K.N. Sorokina, A.V. Piligaev, V.N. Parmon // Catalysts. – 2018. – V. 8. – № 4. – P. 154.

3. **Самойлова Ю.В.** Перспективы применения ферментативной переэтерификации масел для получения модифицированных жиров / Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, В.Н. Пармон // Катализ в промышленности. – 2016. – Т. 16. - № 3. – С. 57-63.

4. **Самойлова Ю.В.** Применение иммобилизованной рекомбинантной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 в реакции переэтерификации подсолнечного и гидрированного соевого масла / Ю.В. Самойлова, А.В. Пилигаев, К.Н. Сорокина, В.Н. Пармон // Катализ в промышленности. – 2016. – Т. 16. - № 5. – С. 66-74.

5. **Самойлова Ю.В.** Применение иммобилизованной рекомбинантной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 для получения метиловых эфиров жирных кислот / Ю.В. Самойлова, А.В. Пилигаев, К.Н. Сорокина, А.С. Розанов, С.Е. Пельтек, А.А. Новиков, Н.Р. Альмяшева, В.Н. Пармон // Катализ в промышленности. – 2015. – Т. 15. - № 6. – С. 90-96.

Монографии

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

Тезисы в материалах конференций

7. **Самойлова Ю.В.** Разработка биокатализатора для переэтерификации жиров на основе ферментов липаз / Ю.В. Самойлова, М.А. Нуриддинов, А.С. Розанов // XVII Международная

экологическая студенческая конференция «Экология России и сопредельных территорий» (МЭСК-2012). Новосибирск. – 2012. – С. 96.

8. **Самойлова Ю.В.** Разработка биокатализатора для переэтерификации пищевых жиров с использованием иммобилизованных ферментов липаз / Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, М.А. Нуриддинов, А.С. Розанов // II Всероссийская научно-техническая конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Высокие технологии в современной науке и технике», ВТСНТ. Томск. – 2013. – Т. 2. – С. 119-123.

9. **Самойлова Ю.В.** Разработка биокатализатора для переэтерификации пищевых с использованием иммобилизованных ферментов липаз / Ю.В. Самойлова, М.А. Нуриддинов, А.С. Розанов // 51-я Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс», МНСК-2013. – Новосибирск. – 2013. – С. 24.

10. **Самойлова Ю.В.** Разработка биокатализатора для применения в процессах получения метиловых эфиров жирных кислот из растительных масел // Международная молодежная научная конференция «Современные проблемы генетики, клеточной биологии и биотехнологии». – Томск. – 2014. – С. 49-50.

11. **Самойлова Ю.В.** Разработка биокатализатора для переэтерификации пищевых жиров / Ю.В. Самойлова, А.В. Пилигаев, К.Н. Сорокина // 19-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века». – Пущино. – 2015. – С. 42.

12. **Самойлова Ю.В.** Применение биокатализатора на основе иммобилизованной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* в реакции метанолиза подсолнечного масла / Ю.В. Самойлова, А.В. Пилигаев, К.Н. Сорокина // V Международная научно-техническая конференция «Альтернативные источники сырья и топлива, АИСТ-2015». – Минск, Беларусь. – 2015. – С. 52.

13. **Самойлова Ю.В.** Термостабильная эстераза бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* с высокой устойчивостью к метанолу / Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, В.Н. Пармон // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология в комплексном развитии регионов». – Москва. – 2016. – С. 33.

14. **Самойлова Ю.В.** Изучение свойств рекомбинантной эстеразы бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* / Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, В.Н. Пармон // 20-я Международная пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века». – Пущино. – 2016. – С. 240

15. **Самойлова Ю.В.** Исследование свойств термостабильной эстеразы бактерии *Ureibacillus thermosphaericus,* устойчивой к органическим растворителям / Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, В.Н. Пармон // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва. – 2017. – С. 77-78.

16. **Самойлова Ю.В.** Приготовление биокатализатора для переэтерификации жиров на основе иммобилизованной эстеразы бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* методом CLEA / Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, В.Н. Пармон // Международная научная конференция «ЭкоБиотех-2017». – Уфа – 2017.