ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ КАТАЛИЗА ИМ. Г.К. БОРЕСКОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Самойлова Юлия Валерьевна

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

Специальность 03.01.06 - биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук
Сорокина Ксения Николаевна

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ферменты нашли применение в разнообразных биотехнологических процессах, используемых в пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной и фармацевтической промышленностях, в производстве моющих средств, получении и разложении химических веществ [1-3]. Наиболее часто в промышленности применяются термостабильные ферменты, которые обладают оптимумом активности при температурах 40-70 °С, что значительно увеличивает срок их эксплуатации.

Ферменты класса гидролаз, к которым относятся липазы и эстеразы, широко применяются в процессах, сопряженных с гидролизом сложноэфирных связей, образованных спиртами и ацильными остатками карбоксикислот (и других соединений). Наиболее часто для этих целей используются ферменты, которые были получены из микроорганизмов, относящихся к мицелиальным грибам *Rhizomucor miehei, Aspergillus niger, Thermomyces lanuginosus* (продуцируют липазы) и к бактериям *Bacillus subtilis* и *Bacillus stearothermophilus* (продуцируют эстеразы). Бактериальные липолитические ферменты, в сравнении с грибными, пока не нашли столь широкого применения в промышленности, хотя было показано, что они обладают более высокой термостабильностью [4, 5]. В связи с этим актуален поиск новых бактериальных липолитических ферментов в природе и изучение их свойств для применения в различных биотехнологических процессах.

Оптимальной температурой для культивирования термофильных грибов является 40-50 °С, а оптимум активности их ферментов находится в диапазоне 37-50 °С [6]. Термофильные бактерии, напротив, растут при более высокой температуре (50-65 °С), что позволяет получать на их основе более термостабильные ферменты. Показано, что оптимум активности у некоторых бактериальных ферментов составляет 70-80 °С, что значительно превышает показатели грибных ферментов. Выделение бактериальных штаммов, продуцирующих термостабильные липолитические ферменты, целесообразно проводить из мест обитания, характеризующихся высокой температурой окружающей среды, например, из термальных источников или компоста. Поиск новых вариантов ферментов в природе позволяет обнаруживать белки с уникальными свойствами, которые не всегда удается получить при улучшении свойств существующих ферментов методами биоинженерии.

Применение термостабильных ферментов в современных промышленных процессах не только позволяет значительно улучшить экологичность таких процессов за счет снижения образования отходов, но и повысить их энергоэффективность, поскольку ферментативные

реакции протекают при значительно меньшей температуре по сравнению с химическими. Для улучшения свойств ферментов применяют иммобилизацию, которая повышает их стабильность, облегчает отделение иммобилизованных ферментов от реакционной среды, а также позволяет многократно использовать их в реакционном процессе [7]. Выбор способа иммобилизации для применения в отдельных биотехнологических процессах определяется свойствами самого процесса. В основном все современные исследования в области иммобилизации белков направлены на получение более стабильных и активных биокатализаторов, также характеризующихся низкой стоимостью. К таким биокатализаторам относятся поперечно сшитые ферментные агрегаты (ПСФА), получаемые непосредственно из белка без использования твердого носителя, что позволяет сократить число стадий при получении биокатализатора и снизить его стоимость [8].

Совершенствование способов переработки отходов, образующихся в результате жизнедеятельности человека, является актуальной задачей биотехнологии. Одним из таких видов отходов являются муниципальные сточные воды, в больших объемах образующиеся в населенных пунктах. Как правило, такие воды содержат большое количество токсичных веществ, в том числе тяжелых металлов, поверхностно-активных веществ (ПАВ), пестицидов и других соединений [9]. Применение биологической очистки сточных вод не всегда позволяет решить проблему удаления подобных соединений. В связи с этим актуальна разработка новых биокаталитических технологий, направленных на очистку сточных вод путем высокоэффективного гидролиза различных токсичных веществ, в том числе пестицидов (включая фосфорорганические инсектициды), для обеспечения высокого качества воды. Ранее с этой целью был применен ряд микроорганизмов, включая *Bacillus licheniformis* [10], *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp. [11], *Rhodoccocus rhodochrous* [12], но скорость протекания такого процесса оказалась небольшой, что осложняет его применение. Использование биокатализаторов (на основе клеток и ферментов) для этих целей позволит увеличить как скорость, так и эффективность гидролиза таких соединений. Такие биокатализаторы, обеспечивающие высокую степень гидролиза пестицида (>80%), уже разработаны для биоразложения некоторых пестицидов, например, для пендиметалина (*N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидина) [13] и профенофоса (*O*-(4-бромо-2-хлорфенил)*O*-этил-*S*-пропил-фосфоротиоата) [14]. Но для ряда других соединений, например, малатиона (*O,O*-диметил-*S*-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфат), применяемые биокатализаторы не обеспечивают высокую степень разложения инсектицида. Также остается актуальным исследование возможности непосредственного применения биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов в процессе очистки сточных вод от малатиона, так как ранее этот вопрос не изучался.

Одним из перспективных направлений применения термостабильных липаз является получение метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), являющимися компонентами биодизельного топлива. В настоящее время для этого проводят реакцию переэтерификации (ПЭ) спиртов (метанола и этанола) с растительными маслами (например, ятрофы, рапсового, подсолнечного, соевого) в присутствии гомогенных щелочных или кислотных катализаторов. Показано, что применение традиционных каталитических подходов сопряжено с образованием большого количества промывных сточных вод, а также с необходимостью ограничения концентрации воды в реакции переэтерификации, что не всегда удается легко достичь на практике [15]. Альтернативой этому подходу является применение иммобилизованных липаз, поскольку большинство бактериальных липаз обладают высокой активностью при температурах до 60 °С, что позволяет проводить реакцию переэтерификации при температурах в среднем в два раза ниже, чем с использованием гомогенных катализаторов [16]. В этом случае при выборе фермента для получения МЭЖК важно учитывать его термостабильность, а также устойчивость к органическим растворителям, оказывающих денатурирующее влияние на фермент. С этой точки зрения в составе биокатализаторов целесообразно использовать липолитические ферменты, продуцируемые бактериями, относящимися к р. *Geobacillus*, так как они обладают высокой термостабильностью и широко распространены в местах обитания, характеризующихся высокой температурой окружающей среды [17].

Другим направлением применения иммобилизованных термостабильных липаз является их использование в реакции ПЭ растительных масел с различными температурами плавления для получения модифицированных жиров, характеризующихся определенными физико-химическими свойствами. Для получения таких масложировых продуктов на отечественных предприятиях в основном используют химическую ПЭ и гидрогенизацию масел, что в последнем случае приводит к образованию транс-изомеров жирных кислот в продуктах реакции. Ферментативная переэтерификация (ФП) в присутствии иммобилизованных липаз позволяет избежать этой проблемы, а также проводить процесс при более низком давлении и использовать биокатализаторы повторно. В настоящее время в промышленности преимущественно применяется биокатализатор Lipozyme TL IM, полученный методом грануляции смеси термостабильной липазы гриба *T. lanuginosus* и силикагеля. Масложировые смеси, получаемые с использованием этого биокатализатора, широко применяются в пищевой промышленности для получения маргаринов, шортенингов, спредов, заменителей масла какао и жиров специального назначения [18, 19]. С целью разработки более эффективного биокатализатора для ФП необходимо использование липазы с большей операционной стабильностью при температурах процесса до 70 °С. В качестве альтернативы целесообразно использовать липолитические ферменты, продуцируемые бактериями р. *Geobacillus*, поскольку их оптимум активности

составляет 50-70 °C [4, 5]. Для таких процессов актуально использование биокатализаторов, стойких к истиранию и потере активного компонента вследствие его десорбции с поверхности, в том числе полученных с использованием метода ковалентной иммобилизации.

Целью работы является 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 *U. 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 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 также свидетельствуют о возможности применения иммобилизованной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 в реакциях переэтерификации и метанолиза масел и 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 приложений. Работа содержит 24 таблицы и 37 рисунков. Список литературы включает 254 источника, из них 220 иностранных.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Липолитические ферменты

1.1.1 Общие сведения

Ферментативный катализ является одной из наиболее активно развивающихся областей биотехнологии [20-22]. Гидролазы, в том числе липазы и эстеразы, катализирующие гидролиз эфирных связей, нашли широкое применение в реакциях гидролиза, этерификации и переэтерификации различных соединений. Разнообразие свойств и субстратной специфичности этих ферментов позволяет широко применять их в пищевой, молочной, химической, косметической и фармацевтической промышленностях [23-25], для производства биодизельного топлива [16], моющих средств [26] и удобрений [27]. Различия в свойствах липолитических ферментов связаны как с источником их происхождения, так и с особенностями их структуры. Например, среди липолитических ферментов выделяют карбоксилэстеразы (КФ 3.1.1.1), стеролэстеразы (КФ 3.1.1.13), арилэстеразы (КФ 3.1.1.2), ацилглицерол липазы (КФ 3.1.1.23), галактолипазы (КФ 3.1.1.26), триацилглицерол липазы (КФ 3.1.1.3), фосфолипазы (КФ 3.1.1.32), что является лишь малой частью охарактеризованных этих белков.

Структура липаз

Структура большинства липаз является хорошо изученной. Они относятся к суперсемейству α/β гидролаз, активный центр которых образован остатками аминокислот Ser-His-Asp/Glu. Активный центр фермента накрыт специальной доменом, называемым «крышкой» (англ. “*lid”*). Фермент существует в двух конформациях – «открытой» и «закрытой», переход между ними связан с изменением положения «крышки» (Рисунок 1). При активации фермента в межфазной системе (в эмульсионных системах на разделе фаз масла и воды) происходит смещение «крышки», что делает доступным для связывания субстрата карман возле туннеля, ведущего к активному центру фермента [28]. Механизм гидролиза сложноэфирных связей у липаз связан с нуклеофильной атакой гидроксильной группы остатка серина на карбонильный атом углерода, входящий в эфирную связь с образованием интермедиата (стабилизированного остатками гистидина и аспарагиновой кислоты) и спирта. Вторая нуклеофильная атака происходит, когда связанный с белком интермедиат подвергается гидролизу. В качестве донора ацильной группы в реакции могут выступать разнообразные соединения, поэтому у липаз существует широкая субстратная специфичность, позволяющая использовать их в реакциях этерификации и переэтерификации [29]. Липазы также обладают позиционной специфичностью

гидролиза по отношению к ацильным остаткам, находящимся в различных положениях глицеридного остова молекулы, например, *sn*-1,3-специфичностью (к таким ферментам относится внеклеточная липаза *T. lanuginosus*). Неспецифичные липазы, к которым относится большинство липаз, гидролизуют все три ацильных остатка в молекулах триацилглицеридов [30].

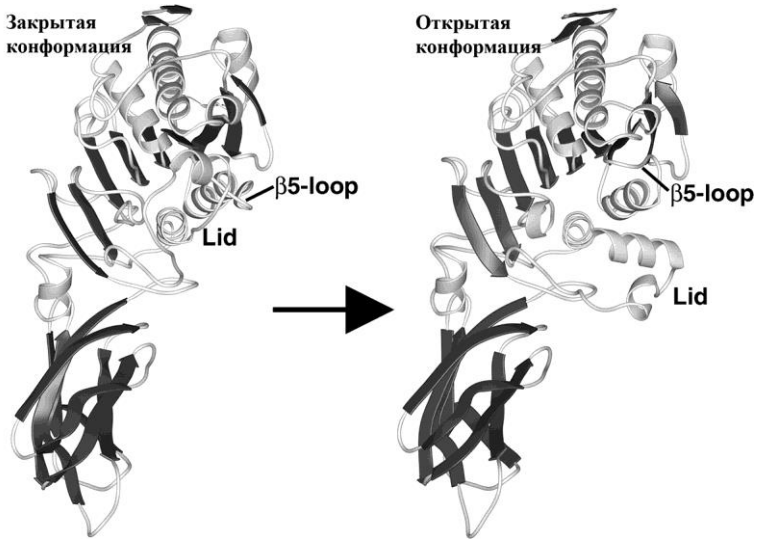

Рисунок 1 – Структура панкреатической липазы в открытой и закрытой позиции *lid* домена [31]

Отличительной особенностью эстераз, в отличие от липаз, является их иная субстратная специфичность: липазы преимущественно гидролизуют субстраты, содержащие длинноцепочечные остатки жирных кислот (свыше 12 атомов углерода), а эстеразы – остатки жирных кислот короткой и средней длины (менее 12 атомов углерода, включительно) [21]. При этом большинство липаз также способны гидролизовать короткоцепочечные субстраты, в то время как лишь некоторые эстеразы могут гидролизовать длинноцепочечные субстраты [32]. Большинство эстераз относятся к карбоксилэстеразам, также являющимся ферментами с α/β структурой. Активный центр фермента образован остатками Ser, Asp и His. Кроме того, фермент содержит консервативную структуру, называемую «нуклеофильным локтем» (англ. "*nucleophilic elbow*") с нуклеофильной группой на его вершине, а аминокислотные остатки вокруг него участвуют в образовании так называемой оксианионной полости. Существенным отличием эстераз от липаз, помимо субстратной специфичности, является отсутствие необходимости в интерфазной активации фермента для увеличения его каталитической активности [33].

Классификация липолитических ферментов

В настоящее время выделено и охарактеризовано большое количество липолитических ферментов, обладающих самыми разнообразными свойствами. Существующая классификация бактериальных липолитических ферментов (липазы и эстеразы) описана в работе [34] и основана на анализе консервативных мотивов в аминокислотных последовательностях и на биологических

свойствах этих ферментов. Изначально эта классификация включала 8 семейств, базируясь на исследовании 53 липаз и эстераз, которая в дальнейшем расширилась до семнадцати семейств и продолжает расширяться. В Таблице 1 приведены сведения о существующих в настоящее время семействах липолитических ферментов и об их представителях.

Классификация липолитических ферментов построена по принципу различий в аминокислотных последовательностях и в биохимических свойствах. Например, у липаз, относящихся к семейству I («истинные» липазы), в частности, у липазы *Bacillus stearothermophilus*, существует интерфазная активация, а в трехмерной структуре фермента присутствует «крышка». Карбоксилэстеразы преимущественно относятся к другим семействам, например, к семейству II (также называемым GDSL-семейством), семейству IV (также называемым HSL-семейством или семейством гормон-чувствительных липаз), семействам III, V, VI-VIII и другим семействам [35]. Как видно, ферменты в семействах сильно различаются по термостабильности, а также по последовательности консервативного пентапептида G-X-S-X-G. Применение такой классификации позволяет проводить идентификацию новых ферментов и предсказывать их свойства.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика представителей бактериальных липолитических семейств

Семейство	**Консервативный мотив**	**Свойства представителя семейства**	**Продуцент фермента**	**Источник литературы**
I	GHSQG	Липаза L1: 43 кДа, 60-65 °C, pH 9-10, специфичность – C_8	*B. stearothermophilus* L1	[34, 36]
II	GDSL	Липаза AlipA: 56 кДа, 40 °C, pH 8,5, специфичность – C_{12}	*Anaerovibrio lipolytica* 5ST	[34, 37]
III	GXSMG	Липаза: 28 кДа	*Streptomyces* sp. M 11	[34, 38]
IV	GDSAGG	Липаза LipP: 34 кДа, 45 °C, pH 8, специфичность – C_4 и C_6	*Pseudomonas* sp. B11-1	[34, 39]
V	GHSMGG	Липаза FCLipl: 33 кДа, 78 °C, pH 7,8, специфичность – C_{10}	*Fervidobacterium changbaicum* CBS-1	[34, 40]
VI	GFSQG	Эстераза Esterase II: 23 кДа, 45 °C, pH 6-9, специфичность – C_2	*Pseudomonas fluorescens* SIK WI	[34, 41]
VII	GESAG	Эстераза EstDL30:	Некультививируемая бактерия	[34, 42]

		59 кДа, 40 °C, pH 8, специфичность – C_4		
VIII	GGSVG	Эстераза Esterase III: 41 kDa, специфичность – C_2	*P. fluorescens*	[34, 43]
IX	AHSMG	поли[(*R*)-3-гидроксибутират] деполимераза PhaZ7:35 кДа, специфичность – C_6	*Paucimonas lemoignei*	[44]
X	GHSLG	Эстераза EstD: 44,5 кДа, 95 °C, pH 7, специфичность – C_4	*Thermotoga maritima*	[45]
XI	GHSLGG	Липаза LipG: Sp – C_{16}	Некультививируемая бактерия	[46]
XII	GHSLG	Липаза LipEH166: 42 кДа, 30 °C, pH 8, специфичность – C_{12}	Некультививируемая бактерия	[47]
XIII	GLSLG	Эстераза EstOF: 64 кДа, 50 °C, pH 8,5, специфичность – C_6	*Bacillus pseudofirmus* OF4	[48]
XIV	CHSMG	Эстераза EstA3: 50 кДа, 70 °C, pH 9,5, специфичность – C_6	*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4	[49]
XV	GHSAG	Эстераза EstDZ2: 29 кДа, 25-60 °C, pH 7-8, специфичность – C_4	Некультивируемая бактерия *Acetothermia*	[50]
XVI	GISYG	Липаза LipSM54: 53 кДа, 35 °C, pH 8	*Stenotrophomonas maltophilia* GS11	[51]
XVII	GYSQG	Эстераза LipJ2: 44 кДа, 80 °C, pH 8-9, специфичность – метилумбеллиферил (MUF)-бутират	*Janibacter* sp. R02	[52]

1.1.2 Природные продуценты липолитических ферментов

В настоящее время охарактеризованы липолитические ферменты самого разного происхождения, включая липазы и эстеразы животных, растений, грибов, бактерий и архей [21]. Липазы микробного происхождения широко применяются в биотехнологии, причем использование внеклеточных липаз является предпочтительным, поскольку их можно относительно легко выделить из культуральной жидкости. Несмотря на то, что множество микроорганизмов продуцируют липазы, только некоторые из этих ферментов используются в

промышленности. В основном в качестве продуцентов белков используют рекомбинантные штаммы, однако в ряде случаев, когда гетерологичная продукция фермента оказывается слишком низкой, используют природные продуценты, улучшенные путем селекции [53].

В настоящее время наибольшее распространение получило применение липолитических ферментов, полученных из грибов, например, широко применяется *sn*-1,3-специфичная термостабильная липаза мицелиального гриба *T. lanuginosus*, получаемая путем ее гетерологичной экспрессии в клетках гриба *Aspergillus oryzae.* Липазы бактериального происхождения получают в основном путем культивирования их естественных продуцентов, улучшенных путем селекции. Наиболее часто используются бактериальные природные продуценты, относящиеся к родам *Achromobater, Bacillus, Geobacillus, Burkholderia, Pseudomonas, Streptomyces, Chromobacterium* и *Arthobacter* [17, 25]. Среди этих штаммов особое место занимают представители *Bacillus*. Ферменты, продуцируемые этими бактериями, нашли широкое применение во многих областях биотехнологии, в частности для получения биодизельного топлива [54], в химическом синтезе [55], в производстве моющих средств [56], а также для биоразложения некоторых инсектецидов [10]. Липолитические ферменты, продуцируемые бактериями р. *Bacillus*, отличаются повышенной стабильностью в широком диапазоне условий (температура, pH, в присутствии различных химических веществ). Сведения о свойствах и областях применения некоторых липаз, выделенных из бактерий рода *Bacillus*, приведены в Таблице 2.

1.1.3 Свойства бактериальных липолитических ферментов

Активность и стабильность бактериальных липаз и эстераз при различных температурах

Зачастую в условиях промышленных процессов требуется использование высокой температуры, поскольку она повышает скорость реакции и выход продукта за счет увеличения растворимости субстратов и смещения равновесия в эндотермических реакциях. Кроме того, повышение температуры способствует снижению микробного загрязнения культуральной среды мезофильными бактериями, часто обнаруживаемыми на производствах ферментных препаратов [63]. Стоит принять во внимание тот факт, что высокие температуры могут привести к термической денатурации фермента, поэтому в промышленности используются термостабильные ферменты, продуцируемые термофильными микроорганизмами, к которым относятся некоторые бактерии и грибы. Коммерчески доступны липолитические ферменты,

полученные из термофильных грибов (*T. lanuginosus* и *R. miehei*), а также дрожжей *Pseudozyma (Candida) antarctica*. Бактериальные липолитические ферменты (*Burkholderia cepacia* и *P. fluorescens*) применяются реже, хотя они обладают значительно большей термостабильностью. Бактерии, выделенные из различных зон обитания (в том числе из горячих источников, где они адаптированы к росту при температурах от 50 до 100 °С), позволяют в лабораторных условиях

Таблица 2 – Свойства липаз, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*

Продуцент	**Свойства фермента**	**Область применения**	**Источник литературы**
B. licheniformis B42 (липаза)	pH 9-9,5, 50-60 °C	Производство моющих средств	[56]
Anoxybacillus flavithermus (рекомбинантная липаза/эстераза Est/Lip)	25 кДа, pH 6,5-8, 60-65 °C. При pH 8,0 и 60 °C $t_{1/2}$ ~ 5 ч. Активна в присутствии ДМСО, ацетонитрила, метанола. Специфичность – pNPC4. Энантиоселективность – *S*-энантиомеры (*R,S*)-1-фенилэтил ацетата и (*R,S*)1-(бензофуран-3-ил)-3-этокси-3-оксопропил деканоата	Химический синтез	[57]
Bacillus gelatini KACC 12197 (рекомбинантная липаза)	42 кДа, pH 10, 65 °C. Сохраняет более 90% от первоначальной активности при 65 °C pH 10 в течение 180 мин. Специфичность – *p*NPC2, *p*NPC4. Энантиоселективность – *S*-энантиомер этилового эфира кетопрофена	Химический синтез	[55]
Bacillus sp. (рекомбинантная липаза L2)	43,2 кДа, pH 9, 70 °C. При pH 9,0 и 60 °C $t_{1/2}$ ~ 2 ч	Производство моющих средств, пищевая промышленность	[58]
Bacillus sp. (липаза)	45 кДа, pH 7, 55 °C, активна в присутствии *н*-гексана и *трет*-бутанола.	Производство биодизельного топлива	[59].
Alicyclobacillus tengchongensis (рекомбинантная карбоксилэстераза D1CarE5)	58 кДа, pH 7, 60 °C	Биоразложение инсектецидов (малатион)	[60]
B. thuringiensis	-	Биоразложение инсектецидов (малатион)	[61]
Bacillus sp.S23 (липаза)	45 кДа	Производство биодизельного топлива	[62]

получать ферменты, активные при температурах до 110 °C [64].

В настоящее время охарактеризован ряд термостабильных липаз, выделенных из термофильных штаммов бактерий *Bacillus* и *Geobacillus*, которые активны в диапазоне температур от 50 до 75 °C [65, 66]. Ранее был обнаружен штамм *Geobacillus kaue* и четыре штамма *Geobacillus kaustophilus*, которые обладают температурным оптимумом активности при 80 °C, и остаются стабильными при 90 °C в течение 30 мин [67]. Термостабильные эстеразы LipA и LipB, выделенные из анаэробных термофильных бактерий *Thermosyntropha lipolytica*, имеют температурный оптимум при 96 °C, что является самым высоким показателем среди всех описанных липаз [68]. Также отмечена высокая функциональная термостабильность липазы бактерии *T. lipolytica*: в работе [69] показано, что при температуре 70 °C фермент сохранял 100% от первоначальной активности в течение 180 мин. При температуре 80 °C наблюдалось сохранение 53,5% активности липазы в течение 120 мин, а при 90 °C – 36% активности в течение 60 мин. Показано, что температурный оптимум бактериальных липаз обычно находится в диапазоне 30-60 °C [70]. Термостабильность липаз можно повысить за счет добавления в реакционную смесь различных стабилизаторов. Так, например, при добавлении этиленгликоля, сорбита или глицерина активность липаз некоторых бактерий рода *Bacillus* сохраняется даже после 150 мин инкубации при 70 °C [71]. Компьютерный анализ структуры термостабильных липаз бактерий рода *Geobacillus* выявил наличие согласованных аминокислотных замен у группы липаз с высокой функциональной термостабильностью (со временем полуинактивации свыше 1000 мин): V198A, Q203E, V204I, Q217E и V294I, P306A, T307A, D312S, R313H, E316G, V324I, S334N, A343T. Обнаружено, что у липаз с наибольшей функциональной термостабильностью происходит стабилизация *lid* домена в районе 198A-217E [72].

Активность и стабильность бактериальных липаз и эстераз при различных значениях pH

Ферменты, имеющие нейтральные или щелочные оптимумы активности, обычно являются более подходящими для применения в различных промышленных процессах, в частности для получения биодизельного топлива и модифицированных пищевых жиров. Как правило, бактериальные липазы имеют нейтральный [59, 73] или щелочной [74, 75] оптимум активности в диапазоне pH 6,0-11,0. Например, щелочные липазы, выделенные из бактерий *B. licheniformis* [76], *Bacillus stratosphericus* L1 [74], *Bacillus* sp. L2 [58] имеют оптимум активности при pH от 9,0 до 11,0. Липазы бактерий *B. stearothermophilus* SB-1, *Bacillus atrophaeus* SB-2 и *B. licheniformis* SB-3 активны при pH 3,0-12,0 [77]. Липазы, имеющие кислый оптимум pH, встречаются намного реже. Например, липазы бактерий *Pseudomonas gessardii* [78], *P. fluorescens* SIK W1 [79] обладают оптимумом активности в диапазоне pH 3,5-4,8. Таким образом, разнообразие свойств липолитических ферментов позволяет применять те или иные из них, в зависимости от условий протекания целевой реакции.

Стабильность бактериальных липаз и эстераз в органических растворителях

Стабильность ферментов в органических растворителях является важным свойством, поскольку их присутствие смещает равновесие реакции в сторону образования продуктов (например, эфиров жирных кислот в реакции метанолиза масел) и увеличивает растворимость субстратов (например, растительных масел), а также подавляет побочные реакции и предотвращает микробное загрязнение продукта [80].

В многочисленных исследованиях показано, что бактериальные липазы в целом стабильны в органических растворителях, и, лишь за немногими исключениями, наблюдается повышение или снижение их активности. Например, добавление метанола в концентрации 30% увеличивает активность липазы бактерии *Bacillus thermocatenulatus* на 18% [81], а добавление *н*-гексана в концентрации до 60% снижает активность другой липазы *Bacillus* sp. [82]. Показано, что активность липазы *Bacillus sphaericus* 205y в присутствии *н*-гексана и *п*-ксилола увеличивается в 3,5 и 2,9 раз, соответственно [83]. Активность липазы TSLip1 бактерии *T. lipolytica* в присутствии органических растворителей снижается: фермент сохранял более 80% активности в присутствии 10 об.% метанола, а практически полное ингибирование активности фермента наблюдалось в присутствии 30 об.% метанола или 20 об.% этанола [84].

Влияние ионов металлов на свойства бактериальных липаз и эстераз

Показано, что некоторые двухзарядные катионы, например, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}, могут увеличивать активность липаз и эстераз за счет стабилизации третичной или четвертичной структуры белка. Металл связывает функциональные группы, расположенные на разных участках полипептидной цепи фермента, а также может участвовать в каталитической реакции [85]. В частности, добавление ионов Ca^{2+} стимулировало активность липаз *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra [66], *Chromohalobacter japonicus* BK-AB18 [86], *Pseudomonas aeruginosa* [87], *Thermosyntropha lipolytica* [68]. С другой стороны, было показано, что ионы кальция также могут и снижать каталитическую активность ферментов, как, например, в случае липазы *P. aeruginosa* 10145 [4]. Кроме того, активность большинства липаз значительно снижается при добавлении в раствор ионов тяжелых металлов, таких как Co^{2+}, Hg^{2+}, Sn^{2+} [4], и, в меньшей степени, при добавлении Mg^{2+} и Zn^{2+} [88]. Однако, для липазы *A. calcoacelicus* LP009 в присутствии солей Fe^{3+} было показано увеличение ферментативной активности, которая снижается приблизительно на 20% при добавлении ионов других металлов [89].

Субстратная специфичность бактериальных липаз и эстераз

Субстратная специфичность бактериальных липаз и эстераз является одним из основных критериев, определяющих их применимость в той или иной отрасли промышленности. Липолитические ферменты подразделяются на неспецифичные, региоспецифичные и специфичные к жирнокислотным остаткам субстратов определенной длины. Неспецифичные

липолитические ферменты, в том числе продуцируемые *Cbromobacteriuin viscusum, Staphylococcus aureus, Staphylococcus hyicus* [90] и *Corynebacterium acnes* [91], гидролизуют триацилглицериды с образованием моно- и диацилглицеридов, жирных кислот и глицерина. Продуценты *sn*-1,3-специфичных липаз, гидролизующих сложноэфирные связи в положениях *sn*-1 и *sn*-3 у триацилгдицеридов, были выявлены среди бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, например, *Bacillus megaterium, P. aruginosa, Pseudomonas fiuorescens* и *Pseudomonas myxogenes* [92].

Липолитические ферменты также подразделяются в соответствии со способностью гидролизовать триацилглицериды с определенной длиной алкильной цепи. Например, липаза С-4 *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 обладает субстратной специфичностью в отношении длинноцепочечных субстратов (C_{16}) [93], в то время как липаза LipBST *Bacillus stratosphericus* L1 преимущественно гидролизует субстраты со средней длиной алкильной цепи (C_8) [74]. Липолитические ферменты также могут отличаться по стереоспецифичности. Например, эстераза бактерии *B. megaterium* селективно гидролизует 4-хлор-3-гидроксибутират до (*S*)-3-гидрокси-γ-бутиролактона [94].

1.1.4 Экспрессия рекомбинантных бактериальных липолитических ферментов

Гетерологичная экспрессия белков

Для получения промышленных ферментов часто используют их гетерологичную экспрессию в клетках других штаммов-продуцентов с целью улучшения и удешевления технологии получения их препаратов. Зачастую генетическая инженерия позволяет создавать микроорганизмы, продуцирующие ферменты, которые не удается получить в достаточном количестве с использованием их естественных продуцентов. Это особенно актуально для ферментов, клонированных из метагеномных библиотек, содержащих ДНК некультивируемых микроорганизмов. Также гетерологичная экспрессия позволяет получать не только природные, но и модифицированные рекомбинантные ферменты, созданные с использованием методов биоинженерии [95, 96]. Таким образом, использование гетерологичных систем экспрессии для получения рекомбинантных липолитических ферментов является альтернативой их выделению из природных продуцентов.

В качестве клеток-реципиентов для проведения гетерологичной экспрессии используют как прокариотические (бактерии), так и эукариотические (дрожжи, мицелиальные грибы) системы [97]. В промышленном масштабе для производства липаз в основном используют

эукариотические системы экспрессии, например, *A. oryzae* и *A. niger* [98], применение которых позволяет достигнуть высокого уровня экспрессии ферментов. Прокариотические системы экспрессии имеют ряд недостатков, поэтому их наиболее часто применяют для исследовательских целей. В том числе, бактериальные рекомбинантные продуценты не могут обеспечить корректный фолдинг, гликозилирование, образование дисульфидных связей и другие модификации, необходимые для надлежащего функционирования некоторых рекомбинантных белков [95, 99]. Несмотря на это из прокариотических систем часто используют клетки *E. coli*, так как они обладают рядом преимуществ по сравнению с аналогами, включая простоту культивирования, высокую скорость продукции целевого рекомбинантного белка (до 30% от всего белка в клетке) и клеточной биомассы на недорогих средах и известный генотип [74]. Существенным недостатком *E. coli* также является ее неспособность продуцировать рекомбинантные белки, снабженные соответствующим сигнальным пептидом, во внеклеточную среду. Секреция рекомбинантного белка в таком случае происходит в периплазматическое пространство, поэтому для его экстракции необходимо разрушение клеток с использованием ультразвука или избыточного давления [95]. Показано, что гиперэкспрессия рекомбинантного белка в клетках *E. coli* часто приводит к его агрегации и накоплению в организме в виде телец включения [100], что затрудняет выделение белков и снижает их выход. В настоящее время с использованием *E. coli* удалось получить ряд рекомбинантных термостабильных бактериальных липаз (*P. fluorescens* [100], *B. licheniformis* [76], *G. stearothermophilus* [75] и др.).

Коэкспрессия белков с шаперонами

Одним из подходов для увеличения продукции растворимых рекомбинантных белков в цитоплазме *E. coli* является их совместная экспрессия с шаперонами. Шапероны – это белки, основной функцией которых является эффективное формирование третичной структуры полипептидных цепей у других белков. Существуют различные системы шаперонов и шаперонинов (например, GroES, GroEL, ClpB), которые подразделяются в соответствии с их размером, структурой и выполняемыми функциями. Шапероны и шаперонины не только обеспечивают правильную укладку третичной структуры полипептидов, но и необходимы для сборки сложных белковых структур [101]; кроме того, они участвуют в рефолдинге неправильно свернувшихся или агрегированных белков [102], в подготовке таких агрегатов для их протеолиза, а также в индукции апоптоза в случае существенного повреждения клетки [103]. Было показано, что совместная экспрессия рекомбинантных белков с отдельными шаперонами или их системами, позволяет повысить растворимость и уменьшить их агрегацию в *E. coli*. Для этого могут использоваться шапероны, полученные из природных продуцентов ферментов, как, например, в случае липазы бактерии *Pseudomonas cepacia* ее коэкспрессия с шаперонами в *E. coli* привела к получению высокоактивного фермента с удельной активностью до 4850 ЕА×мг$^{-1}$ и

выходом 314 000 мг×г$^{-1}$ биомассы *E. coli* [104]. Также часто применяется коэкспрессия рекомбинантных ферментов с белками системы фолдинга *E. coli*. Например, коэкспрессия липазы Lip-948 бактерии *Psychrobacter* sp. с системами шаперонов DnaK-DnaJ-GrpE/GroES-GroEL в клетках *E. coli* BL21(DE3) привела к увеличению выхода растворимой фракции белка с экспрессируемым ферментом на 18,8% [105].

1.2 Биокатализаторы на основе бактериальных липолитических ферментов

1.2.1 Методы, применяемые для иммобилизации липолитических ферментов

Иммобилизованные ферменты (от лат. "*immobilis*" – неподвижный) широко применяются в современной промышленности. Они представляют собой ферменты, молекулы которых связаны с носителем, сохраняя при этом полностью или частично свои каталитические свойства. Иммобилизация позволяет получать биокатализаторы, которые можно легко отделять от продуктов реакции и использовать повторно. При их использовании не возникает необходимость в очистке продуктов реакции от ферментативных катализаторов. Часто иммобилизация приводит к увеличению стабильности фермента при воздействии температур, pH и различных химических веществ, тем самым расширяя возможности его применения [106].

Методы иммобилизации ферментов подразделяются на физические и химические (Рисунок 2). Физические методы характеризуются образованием слабых взаимодействий между ферментом и носителем (водородных, гидрофобных, Ван-дер-Ваальсовых), аффинного и ионного связывания, а также механическим удержанием фермента в носителе [107]. При иммобилизации химическими методами происходит образование ковалентных связей между

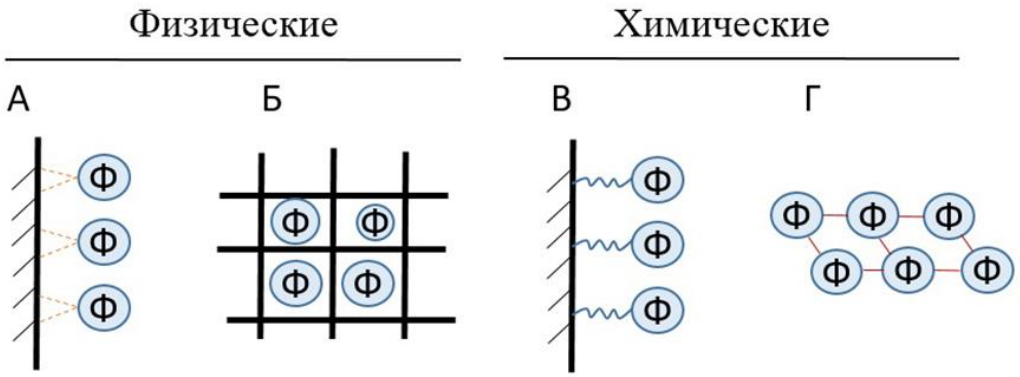

Рисунок 2 – Методы иммобилизации ферментов: (А) адсорбция на носителе; (Б) включение в структуру носителя; (В) ковалентное связывание с носителем; (Г) поперечная сшивка белковых агрегатов. Ф – фермент

ферментом и материалом носителя. Существуют четыре основных способа иммобилизации ферментов: адсорбция, включение, ковалентное связывание и поперечная сшивка (Рисунок 2) [108]. Выбор метода и материала носителя являются важными факторами для получения эффективного и стабильного биокатализатора, и для каждого фермента эти параметры являются индивидуальными.

Физические методы иммобилизации

Адсорбционная иммобилизация

Иммобилизация методом адсорбции осуществляется пропиткой носителя водным раствором фермента с последующей отмывкой неадсорбированного белка. В качестве носителей используют разнообразные сорбенты (силикагель, активированный уголь, смолы, оксиды алюминия), природные материалы (волокна скорлупы кокосовых орехов, микрокристаллическая целлюлоза, каолин), а также другие микро- и мезопористые материалы, имеющие большую площадь поверхности [109, 110]. Для увеличения эффективности адсорбции молекул фермента носитель подвергают различным модификациям. Например, в работе [111] проводили иммобилизацию липазы *Yarrowia lipolytica* путем ее адсорбции на модифицированных носителях, включающих гидрофобную октил-агарозу и октадецил-сефарозу, а также на агарозе, содержащей амино-глиоксильные группы (MANA-агароза), причем эффективность иммобилизации фермента на этих носителях составила 71, 90 и 97%, соответственно. Иммобилизация липазы *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2) на носителе, модифицированном октадецильными остатками (октадецил-сефароза), позволила не только увеличить активность фермента в три раза по сравнению со свободным, но и увеличила температурный оптимум липазы на 10 °C [112].

Иммобилизация ферментов методом адсорбции хоть и является недорогим и простым способом приготовления биокатализаторов, но имеет ряд существенных недостатков. В частности, при такой иммобилизации наблюдается вымывание фермента с поверхности носителя вследствие слабых взаимодействий, обеспечивающих иммобилизацию. Также для такого типа иммобилизации необходимо точно соблюдать условия иммобилизации: pH, температуру и ионную силу раствора, от которых зависит прочность связывания носителя с ферментом [113].

Иммобилизация методом включения фермента в структуру носителя

Метод включения представляет собой физическое заключение фермента в структуру носителя (полимера, волокна, мембраны) [114, 115], что обеспечивает его механическую стабильность и снижает его вымывание из биокатализатора. Кроме того, при таком типе иммобилизации отсутствует химическое взаимодействие между носителем и ферментом, что позволяет избежать инактивации белка. В качестве носителей для иммобилизации методом

включения используют различные материалы, в том числе полимеры, золь-гели, композиты типа полимер/золь-гель и другие неорганические материалы [106].

Недавно был разработан новый метод иммобилизации, заключающийся во включении ферментов в наноструктурные носители, такие как нановолокна, полученные методом электростатического формования, которые нашли широкое применение в области органической химии, биомедицины и получения биотоплива [116, 117]. Широкое применение также нашли природные материалы. Например, включение липазы *Candida rugosa* в структуру хитозана обеспечивает высокую эффективность иммобилизации и позволяет увеличить активность фермента [118]. При этом несомненными преимуществами такого носителя является отсутствие токисичности и его высокое сродство к белкам за счет его гидрофильной природы.

Несмотря на множество преимуществ, практическое использование иммобилизации путем включения белков в структуру носителя довольно ограничено, поскольку размер пор матрицы материала носителя накладывает ограничения на массоперенос субстрата к активному центру фермента [107]. Кроме того, если используется носитель с довольно большими порами матрицы, в ходе реакции может произойти вымывание фермента из биокатализатора, а также истирание биокатализатора в процессе эксплуатации [113].

Химические методы иммобилизации

Ковалентная иммобилизация

Ковалентное связывание является одним из наиболее широко применяемых методов иммобилизации ферментов, который представляет собой образование химических связей между модифицированной поверхностью носителя и аминокислотными (лизин), тиольными (цистеин), карбоксильными (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) остатками на поверхности фермента [113]. Расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает стерические затруднения в реакции, поэтому фермент отделяют от носителя с помощью линкерной группы, в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, гидразин, сульфурилхлорид, глутаровый альдегид) [119-121].

В качестве носителей для ковалентного связывания используют различные материалы, включая природные (хитозан, агарозу, целлюлозу, хитин), синтетические полимеры и наночастицы (оксиды железа). Поверхность носителя предварительно модифицируют путем добавления реакционноспособных групп. Например, активация поверхности силикагеля с помощью аминоорганосиланов, в частности 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTS), обеспечивает получение носителя с функциональными аминогруппами на поверхности. Биокатализатор, полученный ковалентной иммобилизацией липазы *C. rugosa* на аминированном силикагеле, обработанном глутаровым альдегидом, показал высокую активность в реакциях

гидролиза оливкового масла (153,2 ЕА×мг$^{-1}$) и этерификации *н*-бутанола и бутановой кислоты (337,6 ммоль×г$^{-1}$×мин$^{-1}$) [120]. В работе [121] был использован другой биокатализатор на основе той же липазы, иммобилизованной на обработанных глутаровым альдегидом стеклянных шариках, показал высокую термостабильность, сохраняя около 62% от первоначальной активности при инкубации в течение 2 ч при 60 °С, в то время как свободный фермент почти полностью инактивировался после 100 мин инкубации в этих условиях.

Иммобилизация путем ковалентного присоединения фермента к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи, что определяет высокую операционную стабильность таких биокатализаторов, обеспечивая их повторное использование в течение многих циклов реакции в вязких средах. Поскольку процесс ковалентного присоединения является необратимым, в процессе реакции предотвращается выделение фермента в реакционную среду и отсутствует загрязнение продуктов реакции [122]. Несмотря на это, методы ковалентной иммобилизации ферментов все еще малодоступны для промышленного использования в связи со сложностью и высокой стоимостью их применения. Они широко применяются в лабораторных исследованиях и остаются незаменимыми инструментами для приготовления биокатализаторов с контролируемыми свойствами.

Иммобилизация методом поперечной сшивки фермента

В последнее время часто применяется новый способ иммобилизации белков, основанный на их поперечной сшивке. Он представляет собой необратимую иммобилизацию белка, где сам фермент выступает в качестве носителя. Несомненным преимуществом применения данного метода является отсутствие снижения активности фермента вследствие введения в структуру биокатализатора некаталитического материала (носителя), что, в свою очередь, снижает затраты на приготовление биокатализатора [123, 124].

Существует несколько подходов к иммобилизации ферментов методом поперечной сшивки, а именно: сшивка растворенного фермента, кристаллического фермента, высушенного фермента и агрегатов фермента, что приводит к образованию поперечно сшитых ферментов (CLE, англ. “*cross-linked enzymes*”), поперечно сшитых кристаллов фермента (CLEC, англ. “*cross-linked enzyme crystals*”), поперечно сшитых высушенных препаратов фермента (CSDE, англ. “*cross-linked spray-dried enzymes*”) и поперечно сшитых ферментных агрегатов или ПСФА (CLEA, англ. “*cross-linked enzyme enzymes*”), соответственно [125].

Среди этих методов сшивки наиболее простым является метод ПСФА. Процедура иммобилизации при этом заключается в ковалентном сшивании осажденных агрегатов белка. В качестве осаждающих агентов фермента выступают как неорганические соли (сульфат аммония), так и органические растворители (ацетон, этанол, *трет*-бутанол), которые не должны приводить к инактивации фермента. Так как в основе метода ПСФА лежит агрегация белка, то исключается

необходимость в получении высокоочищенных ферментов для приготовления биокатализатора. Еще одним преимуществом данного подхода является возможность контроля размеров получаемых агрегатов (1-100 мкм). В работе [126] было показано, что тип и концентрация осаждающего агента, концентрация фермента и сшивающего агента (глутаровый альдегид), а также pH реакционной среды оказывали влияние на размер образующихся поперечно сшитых агрегатов липазы *C. rugosa*, наибольшей активностью при этом обладал биокатализатор с размером частиц 40-50 мкм.

1.2.2 Применение биокатализаторов на основе бактериальных липолитических ферментов в биотехнологии

В данном разделе приведены данные о сравнительной эффективности применения иммобилизованных бактериальных липолитических ферментов в реакциях переэтерификации растительных масел для получения биодизельного топлива и модифицированных пищевых жиров, а также в процессах очистки сточных вод от фосфорорганических инсектицидов.

1.2.2.1 Биоразложение пестицидов в сточных водах

Существует несколько подходов к разложению пестицидов в сточных водах, включая химическое окисление [127], ультрафиолетовое облучение [128], нанофильтрацию [127] и биологическую обработку (с использованием бактерий [12], грибов [129] и водорослей [130]). В последнее время биологическая очистка является предпочтительным методом удаления пестицидов из водных растворов, так как этот способ является недорогим, менее трудоемким и в ряде случаев обеспечивает достаточный уровень гидролиза пестицидов в растворе [131].

Биоразложение пестицидов в водных растворах обычно осуществляется с помощью штаммов бактерий, относящихся в родам *Bacillus, Pseudomonas, Acinetobacter* и *Serratia* [132-134] и продуцирующие гидролитические ферменты. Например, в работе [135] штамм бактерии *Bacillus aryabhattai* sp. SanPS1 обеспечивал разложение ~ 56% паратиона (*O,O*-диэтил-*O*-(4-нитрофенил)тиофосфата) в жидкой культуре в течение 24 ч при 37 °C. Биоразложение малатиона в водных растворах проводят в основном с использованием клеток бактерий рода *Bacillus,* обычно этот процесс занимает от нескольких часов до нескольких суток. Например, штамм *B. licheniformis* ML-1 обеспечивает удаление малатиона на 78% из водного раствора в течение 5

суток при 32 °С и pH 7,5 при начальной концентрации малатиона 25 мг×л$^{-1}$ [10]. Штамм *Bacillus thuringiensis* за 3 суток при температуре 30 °С обеспечивает гидролиз 50% малатиона при его начальной концентрации в растворе 250 мг×л$^{-1}$ [61]. Штамм бактерии *Bacillus cereus* PU обеспечивает удаление 49,31% малатиона из раствора при 30 °С, pH 7,0 и начальной концентрации малатиона 72,5 мг×л$^{-1}$ в течение 7 суток [136]. Также гидролиз малатиона в водных растворах проводили с использованием представителями бактерий рода *Pseudomonas.* Применение штамма *P. putida* для гидролиза малатиона при его начальной концентрации 125 мг×л$^{-1}$ при температуре 30 °С и pH 7,0 позволило удалить 72% инсектицида в течение 7 суток [12].

Помимо бактериальных штаммов в разложении пестицидов используют бактериальные ферменты, осуществляющие их гидролиз. Карбоксилэстераза D1CarE5, полученная из *A. tengchongensis* клонированием в вектор pET28(+) и экспрессированная в клетках *E. coli* BL21(DE3), эффективно гидролизовала малатион (на 89%) за короткое время (100 мин) (Рисунок 3) [60]. Однако такая высокая активность карбоксилэстеразы D1CarE5 в реакции гидролиза малатиона может быть обусловлена использованной в работе низкой начальной концентрацией малатиона в растворе (5 мг×л$^{-1}$).

Рисунок 3 – Схема ферментативного гидролиза малатиона

Использование суспензионной культуры микроорганизмов для разложения различных токсичных соединений в промышленных условиях имеет ряд ограничений, включая чувствительность культуры к механическому повреждению, необходимость поддержания высокой плотности клеток и сложность в отделении биомассы от реакционной среды [137]. Иммобилизация клеток позволила отчасти решить эти проблемы, кроме того стала возможным реализация процесса разложения пестицидов в реакторах с высокими скоростями потока и более высокими концентрациями пестицидов, чем с неиммобилизованными культурами клеток [138]. Так, например, в работе [13] было показано, что разложение пендиметалина при его начальной концентрации в растворе 0,2% иммобилизованными в полиуретановой пене клетками бактерии *Bacillus lehensis* XJU происходило полностью после 96 ч инкубации при 30 °С. В этих же условиях разложение пендиметалина с использованием суспензионной культуры составило около 10-15%. Кроме того, степень разложения пендиметалина с использованием иммобилизованных клеток оставалась постоянной (~ 100%) в течение 35 циклов реакции, где

каждый цикл составлял 96 ч. Клетки штамма бактерии *Pseudoxanthomonas suwonensis* sp. HNM, иммобилизованные в матрице, состоящей из альгината натрия и бентонитовой глины, обеспечивали степень удаления профенофоса >80% при температуре 20-40 °C, pH 5.0-10.0, после 96 ч реакции [14].

На данный момент, в отличие от других инсектицидов, для малатиона не удалось достигнуть высокой степени гидролиза с использованием иммобилизованных клеток и ферментов. Биокатализатор на основе клеток бактерии *Bacillus* sp. S14, иммобилизованных в 3% альгинате кальция, исследован в реакции гидролиза малатиона в водных растворах (степень удаления малатиона составила 64,4% после 8 ч реакции при 25 °C и pH 7,0 при начальной концентрации малатиона 50 мг×л$^{-1}$), однако операционная стабильность этого катализатора не изучалась [139]. Карбоксилэстераза, выделенная из насекомого *Spodoptera litura* и адсорбированная на мезопористом силикатном носителе MCM-41, также не обеспечивала высокой степени гидролиза малатиона (степень удаления малатиона 60% после 120 мин реакции в фосфатном буфере pH 7,0 при начальной концентрации малатиона 10 мг×л$^{-1}$) [140]. Поэтому остается актуальной разработка эффективных и стабильных биокатализаторов гидролиза малатиона, а также исследование биокаталитического гидролиза малатиона в процессах водоочистки, так как ранее этот вопрос не изучался.

1.2.2.2 Получение биодизельного топлива

Получение биодизельного топлива из растительных масел традиционно проводится с использованием химической ПЭ под действием гомогенных (NaOH, KOH, H_2SO_4) или гетерогенных (Na/γ-Al_2O_3, Al_2O_3, $BaAl_{12}O_{19}$) катализаторов [141], в которой 1 моль триацилглицерида реагирует с 3 молями спирта (как правило, метанола) с образованием 1 моля глицерина и 3 молей метиловых эфиров (Рисунок 4). Несмотря на то, что химическая переэтерификация протекает достаточно быстро и обеспечивает высокие выходы МЭЖК, этот процесс имеет ряд недостатков. К ним относятся высокое энергопотребление процесса, так как реакция химической переэтерификации протекает при высоких температурах (50-90 °C), сложность отделения катализатора от продуктов реакции и необходимость удаления глицерина, являющегося побочным продуктом реакции [142, 143]. Кроме того, данный процесс протекает с образованием большого количества сточных вод, что приводит к загрязнению окружающей среды. Поэтому применение ферментативной ПЭ в мягких условиях является альтернативой традиционному процессу получения биодизельного топлива [54].В качестве сырья для получения

биодизельного топлива используют разнообразные масла, в том числе: соевое, ятрофы, пальмовое, рапсовое, подсолнечное, хлопковое, отработанное фритюрное масло [143, 144], а также липиды микроводорослей [145, 146]. Одним из основных факторов, влияющих на реакцию переэтерификации масел со спиртами, является инактивация липолитических ферментов из-за влияния последних, сопровождающаяся денатурацией третичной структуры белка.

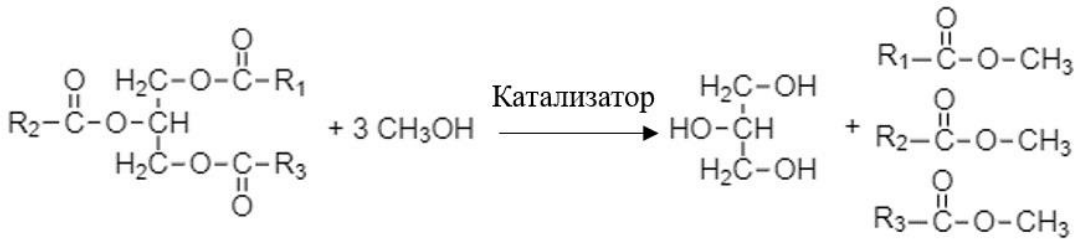

Рисунок 4 – Схема реакции метанолиза триацилглицеридов

Обычно в реакции метанолиза используют смесь масла и спирта в соотношении 1:3, что отражает стехиометрию реакции переэтерификации, где на одну молекулу триацилглицерида приходится три молекулы спирта. Изменение этого соотношения в большую или меньшую сторону, как правило, приводит к снижению выхода МЭЖК. Ранее было показано, что липолитические ферменты часто являются неустойчивыми к влиянию высокой концентрации спиртов. Так, например, липаза, выделенная из *P. antarctica* (*C. antarctica*), инактивировалась при добавлении более 1,5 мольных эквивалентов метанола по отношению к маслу [147]. Для предотвращения денатурации фермента в таких случаях предложено использовать альтернативные акцепторы ацильных групп, а именно, метилацетат и этилацетат. В работе [148] показано, что в реакции переэтерификации сурепного масла с этилацетатом (молярное соотношение 1:12) в присутствии 15 вес.% Novozym 435 выход эфиров жирных кислот составил 90% в течение 15 циклов реакции.

Другим важным фактором, влияющим на выход МЭЖК, является количество воды в реакции. Наличие воды является необходимым для поддержания активности и стабильности липолитических ферментов, особенно, в присутствии органических растворителей. Однако избыток воды в смеси сдвигает равновесие реакции переэтерификации в сторону гидролиза. Для сохранения правильной конформации белка необходимо определенное количество воды, причем для каждой липазы это значение определяется экспериментально [149]. Например, для липазы *Candida* sp. 99-125 при содержании воды 10-20% в реакции наблюдался максимальный выход МЭЖК при переэтерификации пальмового масла с метанолом [150], а для липазы бактерии *P. cepacia* при переэтерификации масла мадуки это значение составило только 6% [151]. В

литературе также описаны случаи использования низкой концентрации воды в реакции переэтерификации масел (до 0,5%) [152] вплоть до ее полного отсутствия [153].

На активность фермента также оказывает влияние температура реакции. Ферментативный метанолиз масел проводят при температурах до 40 °С, в отличие от каталитического, который, как правило, протекает при температурах до 60 °С [154]. Применение такой температуры позволяет сохранить каталитическую активность фермента на достаточном уровне вследствие понижения температурной денатурации. В целом, оптимальной температурой для проведения ферментативной переэтерификации растительных масел с метанолом является 30-45 °С [155].

Глицерин, как основной побочный продукт реакции метанолиза, оказывает негативное влияние на липазу вследствие снижения диффузии субстрата и продукта в реакционной среде, а также его низкой растворимости. При накоплении глицерина, образующего отдельный слой при расслаивании смеси продуктов реакции переэтерификации, наблюдается его смешение с непрореагировавшим метанолом, что оказывает ингибирующее влияние на фермент вследствие многократного локального повышения концентрации спирта [156]. В связи с этим в реакцию добавляют адсорбенты или осуществляют непрерывный отвод образующегося глицерина из реактора [157]. Кроме того, для облегчения разделения фаз, в смесь добавляют различные растворители, например, *н*-гексан или *трет*-бутанол [158].

В настоящее время для получения биодизельного топлива методом ферментативной переэтерификации часто применяют термостабильную липазу дрожжей *P. antarctica* (*C. antarctica*) B, иммобилизованную на полиакриловой смоле Lewatit VP OC 1600 (Novozyme 435). Этот биокатализатор отличается неспецифичностью переэтерификации и высокой эффективностью. Сам фермент не обладает высокой активностью в присутствии высокой концентрации метанола и воды, поэтому в работе [147] метанол добавляли постепенно, что позволило достигнуть высокого выхода МЭЖК равного 95% через 50 циклов реакции (100 дней). Другими часто применяемыми биокатализаторами для получения МЭЖК являются: Lipozyme TL IM (*sn*-1,3-специфичная липаза *T. lanuginosus*, иммобилизованная на гранулированном макропористом силикагеле) и Lipozyme RM IM (липаза *R. miehei*, иммобилизованная на макропористой анионообменной смоле). Применение таких бикатализаторов также позволяет достичь высокой степени конверсии реакции, даже при низком содержании воды. Например, в работе [159] при концентрации воды 0,42% начальная скорость реакции переэтерификации с использованием биокатализатора Lipozyme TL IM составила 3,317 г×л$^{-1}$×мин$^{-1}$, а выход МЭЖК – 98%. Преимущественное применение этих трех биокатализаторов на основе грибных ферментов в исследованиях объясняется их коммерческой доступностью. Напротив, биокатализаторы на основе бактериальных ферментов применяются редко из-за необходимости наработки большого

количества фермента для их приготовления, что, тем не менее, не делает их менее перспективными.

Иммобилизованные бактериальные липазы также применяются в реакции переэтерификации растительных масел и обеспечивают высокие выходы МЭЖК. В работе [149] для получения МЭЖК использовали иммобилизованную методом включения поликонденсацией в гидрофобном золь-геле липазу бактерии *P. cepacia*. Оптимальными условиями реакциии являлись: 10 г соевого масла, 475 мг биокатализатора, соотношение масло : метанол 1:7,5, 35 °С, 0,5 г воды. Через 1 ч реакции выход МЭЖК составил 67%. В исследовании [160] использовали рекомбинантную липазу *Staphylococcus haemolyticus* L62, экспрессированную в *E. coli*, и иммобилизованную на сополимере метакрилата с дивинилбензолом путем гидрофобной адсорбции/включения (H-L62) и гидрофобной адсорбции/включения с ковалентной сшивкой глутаровым альдегидом (HC-L62). Оба биокатализатора оказались стабильными при высокой температуре и в широком диапазоне pH, однако биокатализатор HC-L62 был более эффективен в режиме многократного использования. 100% выход МЭЖК достигался в реакции переэтерификации оливкового масла с метанолом в соотношении 1:3 при 35 °С в течение 18 ч с использованием иммобилизованной на альгинате натрия рекомбинантной липазы LipBA из *B. amyloliquefaciens*, экспрессированной в *E. coli* BL21(DE3) с использованием вектора pET-28a [161].

Большое значение для процесса получения биодизельного топлива имеет использование липазы, устойчивой не только к высокой темепратуре, но и к высокой концентрации растворителя. В работе [162] использовали стабильную липазу бактерии *Acinetobacter baylyi* (ABL), иммобилизованную на носителе Sepabeads EC-OD. Иммобилизация привела к увеличению pH стабильности фермента и сроку его хранения. Оптимальными условиями реакции переэтерификации пальмового масла с метанолом в течение 24 ч при 40 °С являлись: мольное соотношение масло : метанол 1:4, 20% биокатализатора и 4% воды. При этих условиях выход МЭЖК составил 93%. При использовании другой иммобилизонной на силикагеле липазы бактерии *Bacillus aerius* была показана ее высокоя стабильность при высокой температуре в реакции переэтерификации. При использовании касторового масла и метанола в соотношении 1:4 при 55 °С в течение 96 ч выход МЭЖК составил 78,13% [163].

Помимо высоких выходов продуктов реакции, использование иммобилизованных ферментов для переэтерификации позволяет легко отделять биокатализатор от продуктов реакции и многократно его использовать. В работе [153] биокатализатор на основе липазы *B. cepacia*, приготовленный путем иммобилизации в *н*-бутилзамещенном гидрофобном моноксиде кремния, сохранял около 80% от первоначальной активности в течение 49 суток непрерывной эксплуатации в реакции переэтерификации масла ятрофы с метанолом в соотношении 1:3 с

добавлением 0,6% воды при 40 °C. В другой работе эта же липаза была иммобилизована путем сшивки глутаровым альдегидом с последующим включением в гибридную матрицу, состоящую из смеси альгината и к-каррагинана. Биокатализатор был использован для переэтерификации масла ятрофы в следующих условиях: 10 г масла, мольное соотношение масло : метанол 1:10, 1 г воды, 5,25 г иммобилизованной липазы. Выход МЭЖК в данных условиях был близок к 100%, а после шести циклов использования биокатализатор сохранял 73% активности [164]. Высокая операционная стабильность липазы *B. cepacia* также была показана при ее иммобилизации на аминированных магнитных наночастицах. При оптимальных условиях рекции в течение 12 ч выход составил 96,8%, а биокатализатор сохранял свыше 60% активности после 15 циклов реакции [165].

Помимо липазы бактерии *B. cepacia*, в ряде работ также были изучены свойства иммобилизованных термостабильных липаз, продуцируемых бактериями, относящихся к р. *Geobacillus*. В работе [166] было показано, что иммобилизация рекомбинантной липазы *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2) на глиоксил-агарозном носителе с использованием ДТТ в качестве добавки позволила достигнуть степени иммобилизации 62–76%. Полученный биокатализатор оказался активен при высокой температуре (70 °C) со время полуинактивации 54,5 ч, и был применен в реакции гидролиза рыбьего жира. При использовании липазы BTL2, полученной путем гетерологичной экспресси в *Pichia pastoris*, в работе [167] была показана высокая эффективность метанолиза с неиммобилизованным ферментом: при 45 °C, в присутствии 20% воды и 10000 ЕА фермента с постепенным добавлением метанола через 4 ч реакции выход МЭЖК составил 87%. Таким образом, применение иммобилизованных липаз, продуцируемых бактериями р. *Geobacillus,* остается пока еще плохо изученым.

1.2.2.3 Получение модифицированных пищевых жиров

Помимо биодизельного топлива из растительных масел в результате реакции ПЭ (Рисунок 5) можно получать продукты пищевого назначения – спреды, основы маргаринов и жиры специального назначения. В качестве катализатора химической ПЭ масел используется метилат натрия. Однако, данный процесс, как и в случае химического получения биодизельного топлива, является энергозатратным, протекает с образованием натриевых солей жирных кислот (мыло) и загрязнением продуктов реакции остатками катализатора. Ферментативная ПЭ масел протекает при сравнительно невысоких температурах (50-80 °C), является энергоэффективным и экологически чистым процессом, не требующем использования химических реагентов в

процессе реакции и в последующих процессах очистки продукта и утилизации отходов [168]. Кроме того, использование *sn*-1,3-специфичных липаз в качестве активных компонентов биокатализаторов позволяет получать модифицированные жиры с определенными физико-химическими показателями [169]. Получаемые путем ферментативной переэтерификации жиры не содержат транс-изомеров жирных кислот, что делает их безопасными для использования в получении продуктов питания [170].

Рисунок 5 – Схема реакции переэтерификации триацилглицеридов с участием *sn*-1,3-специфичных липаз

Широкое применение в промышленном производстве пищевых жиров с использованием технологии ферментативной переэтерификации нашли биокатализаторы на основе липаз, выделенных из грибов и дрожжей. К таким катализаторам относится Novozyme 435, Lipozyme TL IM и Lipozyme RM IM. Все вышеперечисленные катализаторы отличаются высокой активностью и стабильностью в реакции переэтерификации различных растительных масел. Например, биокатализатор Lipozyme TL IM был использован в реакции переэтерификации кукурузного масла и тристеарина при 45 °C, где с использованием ВЭЖХ было показано снижение концентрации тристеарина с 6 до 0,5% в течение 30 мин реакции [171]. Применение Lipozyme TL IM для переэтерификации смеси пальмового и кокосового масел (75:25, об./об.) в объеме 300 кг выявило, что температура практически не оказывала влияния на степень переэтерификации смеси при 55–80 °C в течение 6 ч, но оказывала влияние на количество свободных жирных кислот. Биокатализатор был стабилен при реакции в реакторе (загрузка 1 кг) в течение 11 циклов, и в течение 9 циклов в реакторе периодического действия с загрузкой 300 кг масла. Из-за наличия *sn*-1,3-специфичности у липазы продукты, полученные с использованием ферментативной переэтерификации, имели другое распределение жирных кислот в *sn*-2 позиции триацилглицеридов, нежели при химической переэтерификации, что дает возможность производить на основе таких продуктов маргарины с иными свойствами [19]. Применение биокатализатора Lipozyme IM в концентрации 6% для переэтерификации смеси пальмового стеарина и кокосового масла (75:25, об./об.) при 60 °C в течение 6 ч в другой работе [172] было проведено с использованием реактора с загрузкой 1 кг. В ходе реакции было показано снижение содержания продуктов с эквивалентными углеродными числами (ECN) 34, 36, 48, 50 и увеличение ECN 38, 40, 42, 44, 46 в продуктах реакции. Добавление воды пропорционально

повышало образование диацилглицеридов и свободных жирных кислот. Тем не менее, вода не оказывала влияния на степень переэтерификации при повторном использовании биокатализатора.

Применение бактериальных липолитических ферментов для приготовления биокатализаторов получения модифицированных пищевых жиров пока что носит ограниченный характер. Однако, известны случаи, когда бактериальные иммобилизованные липазы превосходили по характеристикам ферменты, полученные из грибов. В работе [173] липаза бактерии *Pseudomonas* sp., иммобилизованная на цеолите, в реакции переэтерификации пальмового стеарина и подсолнечного масла в соотношении 40:60 при 60 °С и 8 ч реакции обеспечила степень переэтерификации 77,3%, в то время как иммобилизованная липаза *R. miehei* в тех же условиях – только 32,7%.

Несмотря на все преимущества применения иммобилизованных ферментов в реакциях переэтерификации растительных масел, как для получения пищевых жиров, так и при производстве биодизельного топлива, существенным недостатком этого метода является высокая стоимость производства ферментных препаратов. Поэтому в данном направлении продолжаются работы, как по поиску новых активных ферментов, так и по разработке новых подходов к их иммобилизации для получения высокостабильных биокатализаторов переэтерификации растительных масел.

Подытоживая обзор литературы, можно сделать вывод, что исследование гидролитических ферментов является актуальной и важной задачей. Благодаря своим разнообразным свойствам липазы и эстеразы могут быть успешно применены в различных биотехнологических процессах. Поэтому многими исследователями активно ведутся работы по выделению и изучению новых липолитических ферментов, а также разрабатываются подходы к их иммобилизации с целью получения более активных и стабильных биокатализаторов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы и реактивы

В работе были использованы следующие материалы:

Ферменты: Phusion Hot Start Flex ДНК-полимераза (NEB, Англия), Taq SE ДНК полимераза, дезоксинуклеотидтрифосфаты (dNTPs), эндонуклеазы рестрикции BamHI, Sfr 274I, MalI (СибЭнзим, Россия), Т4 ДНК лигаза (Thermo Fisher Scientific, США).

Штаммы E.coli: DH10B, BL21(DE3) фирмы Thermo Fisher Scientific (США); В-1298, продуцент липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3, депонированный в коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) [174].

Векторы для клонирования: pAL-TA фирмы Evrogen (Россия), pET32b(+) фирмы Novagen (США).

Плазмиды: pBB540 (#27393), pBB542 (#27395) предоставлены Берндом Букау [102].

Наборы для выделения и очистки ДНК: «GeneJET Genomic DNA Purification Kit», «GeneJET PCR Purification Kit», «GeneJET Gel Extraction Kit», «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» все фирмы Thermo Fisher Scientific (США).

Реактивы: Маркер молекулярного веса ДНК: 2500-10000 п.о. (200 мкг×мл$^{-1}$), маркер молекулярного веса белков: 10-250 кДа, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), бычий сывороточный альбумин (БСА) – все фирмы СибЭнзим (Россия); агароза, краситель кумасси бриллиантовый синий G250, 2-меркаптоэтанол, N,N,N’,N’-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), акриламид, трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), додецилсульфат натрия (SDS), персульфат аммония (ПСА), Тритон X-100, бромфеноловый синий, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) – все фирмы Helicon (Россия); агар, бис-акриламид, Твин 20, Твин 80, глицерин, *н*-гексан, диметилсульфоксид (ДМСО), ацетонитрил, N,N-диметилформамид (ДМФ) – все фирмы PanReac AppliChem (Испания); имидазол фирмы Daejung chemicals & metals Co. (Корея); дрожжевой экстракт, триптон, сульфат аммония (х.ч.), мочевина (х.ч.), трибутирин – все фирмы ДИА-М (Россия); дитиотреитол (ДТТ) фирмы Thermo Fisher Scientific (США); *п*-нитрофенил ацетат (*p*NPC2), *п*-нитрофенил бутират (*p*NPC4), *п*-нитрофенил октаноат (*p*NPC8), *п*-нитрофенил додеканоат (*p*NPC12), *п*-нитрофенил пальмитат (*p*NPC16), *п*-нитрофенил стеарат (*p*NPC18), малатион, спектиномицин – все фирмы Sigma-Aldrich (США); триолеин фирмы Supelco (США); глутаровый альдегид фирмы Acros organic (США); 3-аминопропилтриэтоксисилан фирмы Пента-

91 (Россия); метанол, изопропанол фирмы J.T. Baker (США); этанол, *н*-бутанол, ацетон, *трет*-бутанол – все фирмы Вектон (Россия); ампициллин фирмы «Синтез» (Россия), хлорамфеникол фирмы Gold Biotechnology (США). Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Синтол» (г. Москва, Россия).

Таблица 3 – Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

Название	**Последовательность***
27F	5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’
1492R	5’- GGTTACCTTGTTACGACTT-3’
Ys_13	5’-AAACATAGGGATCCATGAAAATCGTTTCGCCAAAACC-3’
Ys_14	5’-AAAGTCTACTCGAGTTCTTCCCATTTTAAACTTTCAAAGAAG-3’
Ser93Ala_F	5’-GAAATTGCGGTTGCTGGTGTT*GCT*TTAGGCGGCATTTTCTCAC-3'
Ser93Ala_R	5'-GTGAGAAAATGCCGCCTAAAGCAACACC*AGC*AACCGCAATTTC-3'
Asp192Asn_F	5’-CGTGGGTTAAAT*AAC*GATGAATACTACTGCCAAAGCGCAG-3’
Asp192Asn_R	5’-CTGCGCTTTGGCAGTAGTATTCATC*GTT*ATTTAACCCACG-3’
His222Leu_F	5’-GCTTTATTAATTCAGGTCA*CTC*TTTAACTGTAGATAAAGAACG-3’
His222Leu_R	5’-CGTTCTTTATCTACAGTTAAA*GAG*TGACCTGAATTAATAAAGC-3’

***** Сайты узнавания рестриктаз отмечены подчеркнутой линией, нуклеотидные замены для сайт-направленного мутагенеза отмечены курсивом.

Таблица 4 – Состав сред, использованных в работе

Среда*	**Состав**
LB	5,0 г×л$^{-1}$ дрожжевой экстракт, 10,0 г×л$^{-1}$ триптон, 10,0 г×л$^{-1}$ NaCl, pH 7,0
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
LBT	1% трибутирин (об./об.) в LB-агаре
SOC	5 г×л$^{-1}$ дрожжевой экстракт, 20 г×л$^{-1}$ триптон, 0,6 г×л$^{-1}$ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ $MgSO_4$, 20 мМ глюкозы, pH 7,0
OECD [175]	160,0 мг×л$^{-1}$ мясной экстракт, 30,0 мг×л$^{-1}$ $CO(NH_2)_2$, 28,0 мг×л$^{-1}$ KH_2PO_4, 7,0 мг×л$^{-1}$ NaCl, 4,0 мг×л$^{-1}$ CaCl2×2H2O, 2,0 мг×л$^{-1}$ $MgSO_4$, pH 7,3
MWW [176]	161,0 ± 5,0 мг×л$^{-1}$ химическое потребление кислорода (ХПК), 27,7 ± 1,3 мг×л$^{-1}$ содержание аммонойного азота (N-NH_4^+), 1,8 ± 0,1 мг×л$^{-1}$ содержание фосфора в виде ортофосфата (P-PO_4^{3-}), 0,2 ± 0,0 мг×л$^{-1}$ NO_3^-, 10,7 ± 1,0 мг×л$^{-1}$ SO_4^{2-}, 139,0 ± 5,0 мг×л$^{-1}$ Cl^-

*****Все среды перед использованием автоклавировали в течение 30 мин при 121 °C и 1 атм.

2.2 Микробиологические методы анализа

Метод Пастера

0,5 г образца (компоста) суспендировали в 10 мл 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 и отбирали 1 мл суспензии. Уменьшая концентрацию от разведения к разведению в 10 раз, разбавляли суспензию

в 5-10 пробирках, в зависимости от концентрации клеток в исходной суспензии. Последние две разведенные суспензии использовали для посева на среду LB-агар и инкубировали в течение 16 ч при температурах 37-65 °С. Выделение чистых культур из выросших колоний проводили трехкратным пересевом штрихом на эту же среду.

Определение липолитической активности бактериальных культур

Определение липолитической активности у полученных бактериальных культур проводили на среде LBT при температурах 37-65 °С в течение 16-20 ч. О наличии липолитической активности у выделенных культур судили по появлению зоны гало вокруг колонии.

Культивирование штаммов

Культивирование бактериальных штаммов проводили в среде LB в объеме 50 мл в конических колбах при 250 об./мин и температурах 37-65 °С. Культуру выращивали до достижения оптической плотности $ОП_{595}$ 0,6-0,8, которую определяли на спектрофотометре «Униплан» (Пикон, Россия).

2.3 Молекулярно-генетические методы

2.3.1 Определение таксономической принадлежности бактерий

Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК из культуральной жидкости бактерий проводили с использованием набора «GeneJET Genomic DNA Purification Kit», согласно протоколу производителя.

Полимеразная цепная реакция и секвенирование гена 16S рРНК

Амплификацию фрагмента 16S рРНК длиной около 1400 п.о. проводили в реакционной смеси общим объемом 50 мкл, содержащей: 20 нг геномной ДНК, 0,24 мкМ dNTPs, 0,24 мкМ универсальных праймеров 27F и 1492R, буфер для TaqSE ДНК полимеразы и 1,0 ЕА TaqSE ДНК-полимеразы. ПЦР проводили по следующей программе: 94 °С – 3 мин; 36 циклов (94 °С – 30 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин 30 с); 72 °С – 10 мин. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали амплификатор MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad, США). Очистку продуктов ПЦР-реакции проводили, используя набор «GeneJET PCR Purification Kit», согласно протоколу производителя.

Частичную последовательность гена 16S рРНК бактериальных штаммов определяли в компании «Синтол» (Москва, Россия) по методу Сэнгера и затем сравнивали имеющимися в базе данных GenBank для определения степени идентичности с помощью алгоритма BLAST [177].

2.3.2 Получение рекомбинантной эстеразы estUT1

Конструирование плазмиды pAL-TA-UT1

Амплификацию гена эстеразы estUT1 проводили с помощью ПЦР с использованием 50 нг геномной ДНК, 0,24 мкМ dNTPs, 0,24 мкМ праймеров Ys_13 и Ys_14, буфера для Phusion Hot Start Flex ДНК-полимеразы и 1 ЕА Phusion Hot Start Flex ДНК полимеразы. Реакцию амплификации проводили по следующей программе: 98 °С – 30 с; 32 цикла (98 °С – 10 с, 62 °С – 25 с, 72 °С – 25 с); 72 °С – 7 мин в амплификаторе MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad, США). ПЦР-продукт очищали с использованием набора «GeneJET PCR Purification Kit» и лигировали с вектором pAL-TA, используя Т4 ДНК лигазу в условиях, рекомендованных производителем, с получением плазмиды pAL-TA-UT1. Лигазную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH10B. Нуклеотидную последовательность гена эстеразы в клонах отбирали на основе бело-голубой селекции и подтверждали ПЦР-анализом и секвенированием.

Трансформация клеток E. coli

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК (1-10 нг) осуществляли методом электропорации в режиме “Ec1” (1,8 кВ) на приборе MicroPulser (Biorad, США). После этого клетки переносили в 1 мл среды SOC, инкубировали в течение 45 мин при 37 °С, сеяли на среду LB-агар, содержащей антибиотик ампициллин (100 мкг×мл$^{-1}$). Чашки с трансформантами выращивали при 37 °С в течение 15-18 ч.

Выделение плазмидной ДНК из E. coli

Бактериальную культуру выращивали в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг×мл$^{-1}$), в объеме 25 мл при 250 об./мин и температуре 37 °С в течение 12 ч. Далее биомассу клеток собирали центрифугированием при 4000 об./мин в течение 3 мин и проводили выделение плазмидной ДНК с использованием набора «GeneJET Plasmid Miniprep Kit», согласно инструкции производителя.

Определение последовательности ДНК, филогенетический и структурный анализ

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК проводили в компании «Синтол» (Москва, Россия) по методу Сэнгера.

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков проводили с помощью программ ClustalW и ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/). Филогенетическую дендрограмму строили с использованием метода ближайших соседей (“*neibour-joining*”) [178] в программе MEGA 6.0 [179]. Статистическую достоверность топологии филогенетического дерева определяли с помощью бутстреп-теста.

Моделирование структуры эстеразы estUT1 проводили с использованием сервера SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/) [180] и визуализировали в программе Chimera 1.11. Качество построенной модели проверяли с помощью программы PROCHECK [181] на сервере SWISS-MODEL.

Конструирование рекомбинантной плазмиды pET32b-UT1

Плазмиду pAL-TA-UT1 и вектор pET32b(+), обработанные рестриктазами BamHI и Sfr 274I, очищали в 0,8% агарозном геле, выделяли с использованием «GeneJET Gel Extraction Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) и лигировали, используя Т4 ДНК-лигазу, с получением плазмиды pET32b-UT1. Лигазную смесь использовали для трансформации в *E. coli* BL21(DE3), как описано выше в этом пункте.

Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили на основе полученной плазмиды pET32b-UT1. Мутации для введения аминокислотных замен Ser93Ala, Asp192Asn и His222Leu были получены с использованием праймеров Ser93Ala_F, Ser93Ala_R, Asp192Asn_F, Asp192Asn_R, His222Leu_F и His222Leu_R, в соответствии с протоколом, приведенным в работе [182] с небольшими изменениями. Амплификацию мутантных генов эстеразы estUT1 проводили с помощью ПЦР с использованием 50 нг плазмиды pET32b-UT1, 0,24 мкМ dNTPs, 0,24 мкМ соответствующей пары праймеров, буфера для Phusion Hot Start Flex ДНК-полимеразы и 1,0 ЕА Phusion Hot Start Flex ДНК полимеразы. Реакцию амплификации проводили по следующей программе: 98 °С – 30 с; 20 циклов (98 °С – 10 с, 62 °С – 25 с, 72 °С – 2 мин 20 с); 72 °С – 7 мин в амплификаторе MJ Mini Personal Thermal Cycler (Biorad, США). Полученные ПЦР-продукты после обработки эндонуклеазой рестрикции MalI и очистки с помощью набора «GeneJET PCR Purification Kit» были трансформированы в клетки *E. coli* BL21(DE3) с последующей экспрессией белка. Наличие мутаций в нуклеотидной последовательности гена подтверждали секвенированием ДНК.

2.4 Биохимические методы исследования

Экспрессия рекомбинантной эстеразы estUT1 в E. coli BL21(DE3)

Клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидой pET32b-UT1, выращивали в 15 мл среды LB, содержащей антибиотик ампициллин (100 мкг×мл$^{-1}$), при 37 °C, 250 об./мин в течение 10 ч. Инокулят (1%, об./об.) переносили в 200 мл среды LB и продолжали культивирование при температуре 32 °C и 250 об./мин на качалке KS 4000 i control (IKA, Германия). После достижения значения оптической плотности $ОП_{595}$ 0,6-0,8 экспрессию гена индуцировали добавлением 0,5 мМ ИПТГ. После инкубации при 16 °C и 250 об./мин в течение 18 ч клетки осаждали в центрифуге Sigma 3-18k (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия) в течение 10 мин при 3000 об./мин и 4 °C и отмывали дважды 50 мМ Tris-HCl pH 7,0.

Выделение рекомбинантной эстеразы estUT1

Биомассу клеток суспендировали в 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 и разрушали обработкой с использованием ультразвукового гомогенизатора Microson (Misonix, США) на льду при мощности 50 Вт (5 циклов по 40 сек с 20 сек интервалами). Полученную суспензию центрифугировали 15 мин при 5000 об./мин и температуре 4 °C. Супернатант и клеточный осадок собирали как растворимую и нерастворимую фракции белка, соответственно.

Клеточный осадок промывали дважды 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 и растворяли в 20 мМ Tris-HCl pH 8,0, содержащем 8,0 М мочевину, при комнатной температуре и 80 об./мин в течение 1 ч. Суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 10000 об./мин и 4 °C. Рефолдинг белка проводили ступенчатым диализом при 4 °C в 20 мМ Tris-HCl pH 8,0 в понижающемся градиенте концентрации мочевины (8–0 М).

Очистку рекомбинантного фермента проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе, уравновешенной буфером, содержащим 0,5 М NaCl, 50 мМ Tris-HCl pH 8,0. Белок элюировали с колонки в повышающемся градиенте концентрации имидазола (3–300 мМ) в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, содержащем 0,5М NaCl. Очищенный белок наносили на колонку с сорбентом Sephadex G25, уравновешенную 50 мМ Tris-HCl pH 7,0. Элюцию проводили тем же буфером.

Коэкспрессия рекомбинантной эстеразы estUT1 с шаперонами

Совместную экспрессию белка estUT1 с шаперонами проводили в соответствии с процедурой, описанной в работе [102]. Клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидой pBB542, сеяли на среду LB-агар, содержащую спектиномицин (50 мкг×мл$^{-1}$), и использовали для приготовления компетентных клеток. Полученные клетки трансформировали плазмидой pBB540, сеяли на LB-агар, содержащий спектиномицин (50 мкг×мл$^{-1}$) и хлорамфеникол (20 мкг/мл), и затем повторяли процедуру приготовления компетентных клеток. Полученные клетки использовали для трансформации плазмидой pET32-UT1, трансформанты сеяли на агаризованную среду LB, содержащую спектиномицин (50 мкг×мл$^{-1}$), хлорамфеникол

(20 мкг×мл$^{-1}$) и ампициллин (100 мкг×мл$^{-1}$). Экспрессию белка проводили согласно процедуре, описанной выше в этом пункте.

Экспрессия рекомбинантной липазы G3 в E. coli

Штамм *E. coli* B-1298, продуцирующий термостабильную липазу бактерии *G. stearothermophilus* G3, культивировали в 200 мл среды LB при 37 °C и 250 об./мин. После достижения значения оптической плотности $ОП_{595}$ 0,5-0,8 индуцировали экспрессию липазы добавлением 1 мМ ИПТГ. После инкубации при 37 °C 250 об./мин в течение 6 ч клетки осаждали центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин.

Выделение рекомбинантной липазы G3

Индуцированные ИПТГ клетки *E. coli* B-1298 суспендировали в 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 и разрушали обработкой с использованием ультразвукового гомогенизатора Microson (Misonix, США) на льду при мощности 60 Вт (5 циклов по 40 сек с 20 сек интервалами). Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 5000 об./мин и температуре 4 °C. Для выделения белка к полученному супернатанту добавляли сульфат аммония до 30% от насыщения, после формирования осадка при 4 °C последний отделяли центрифугированием при 14000 об./мин в течение 10 мин при 4 °C. Затем проводили повторное осаждение белка путем добавления к полученному супернатанту сульфата аммония до 80% от насыщения; осадок отделяли центрифугированием при 14000 об./мин в течение 10 мин при 4 °C. Полученный белок обессоливали диализом в 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 при 4 °C с использованием целлюлозной мембраны.

SDS-PAGE белков

Электрофорез белков в 12% полиакриламидном геле проводили по методу Лэммли [183] в камере для электрофореза «Ready Gel Cell 108BR» (40-60 мА) (BioRad, США).

Определение концентрации белка

Содержание белка в образцах определяли по методу Бредфорда [184] при длине волны 595 нм. Концентрацию белка рассчитывали исходя из данных калибровочной кривой, построенной по БСА в качестве стандарта.

Определение активности эстеразы estUT1

Активность рекомбинантой эстеразы определяли спектрофотометией с использованием эфиров карбоновых кислот *n*-нитрофенола (*p*NP) в качестве субстратов [185]. Реакционная смесь состояла из 150 мкл раствора субстрата (1 об. 0,1 М эфира *p*NP в ацетонитриле, 4 об. этанола и 95 об. 50 мМ Tris-HCl pH 8,0) и 20 мкл раствора фермента. Реакционную смесь инкубировали при температуре 50 °C в течение 15 мин, затем реакцию останавливали охлаждением на льду и измеряли $ОП_{405}$. За одну единицу активности эстеразы estUT1 (ЕА) принимали количество

фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль *n*-нитрофенола в мин в анализируемых условиях. Удельную активность эстеразы выражали в единицах ЕА×мг$^{-1}$ белка.

Определение активности липазы G3

Активность липазы G3 определяли методом алкалиметрического титрования при постоянном pH по скорости гидролиза эмульсии трибутирина. Для этого 0,01 г фермента, полученного после очистки, добавляли к 10 мл раствора субстрата и титровали 0,05 М NaOH при удержании pH 7,0 в течение 15 мин при температуре 30 °C.

Раствор субстрата готовили перемешиванием трибутирина (3 мл), дистиллированной воды (47 мл) и раствора эмульгатора (10 мл) в течение 30 с в гомогенизаторе при частоте вращения 20000 об./мин. Раствор эмульгатора готовили путем растворения гуммиарабика (6,0 г), глицерина (540 мл), NaCl (17,9 г) и KH_2PO_4 (0,41 г) в дистиллированной воде, доводя общий объем до 1 л. Одна единица активности липазы G3 определялась как количество фермента, необходимое для выделения 1 мкмоль масляной кислоты в мин в анализируемых условиях. Удельную активность липазы G3 выражали в единицах ЕА×г$^{-1}$ белка.

Исследование свойств эстеразы estUT1

Субстратную специфичность эстеразы определяли, измеряя активность фермента с использованием в качестве субстратов *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот с различной длиной углеводородного остатка (*p*NPC2, *p*NPC4, *p*NPC8, *p*NPC12, *p*NPC16 и *p*NPC18) при температуре 50 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0. Результат выражали в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата.

Для определения pH оптимума фермента измеряли его активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата при 50 °C в течение 15 мин в следующих буферах (50 мМ): цитратно-фосфатный (pH 5,0-6,0), натрий-фосфатный (pH 6,0-8,0), Tris-HCl (pH 8,0-9,0), глицин-NaOH (9,0-10,0). Результат выражали в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность эстеразы с использованием 50 мМ Tris-HCl pH 8,0.

Стабильность эстеразы определяли, выдерживая фермент в буферах с различными значениями pH при температуре 50 °C в течение 1 ч, после чего измеряли остаточную ферментативную активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата. Результат выражали в виде графика относительной активности, где активность эстеразы до прогрева была принята за 100%.

Для определения температурного оптимума фермента измеряли его активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 в течение 15 мин при 30-90 °C. Результат выражали в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность эстеразы при 80 °C.

Термостабильность фермента при температурах 50-80 °C определяли путем инкубации фермента в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 в течение 1-8 ч при указанных температурах, после чего измеряли остаточную ферментативную активность с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата. Результат выражали в виде графика относительной активности, где активность эстеразы до прогрева была принята за 100%.

Влияние на фермент различных солей металлов (NaCl, KCl, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ и $Al_2(SO_4)_3$) и других добавок (2-меркаптоэтанол, ЭДТА, ДТТ, ФМСФ, SDS, Твин 20, Твин 80, Тритон X-100) в концентрациях 1 и 10 мМ определяли по остаточной активности, измеренной с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата, после инкубации фермента при 50 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 в течение 1 ч с указанными соединениями. Влияние различных органических растворителей (метанол, этанол, *н*-гексан, ацетон, ДМСО, хлороформ, изопропанол, *н*-бутанол, ацетонитрил и ДМФ) на активность фермента определяли по остаточной активности, измеренной с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата, после инкубации фермента в течение 1-24 ч при 50 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, содержащем 10 или 30% (об./об.) указанных растворителей. Результат представляли в виде графика относительной активности, где за 100% была принята активность эстеразы без добавления химических веществ.

Измерение кинетических параметров эстеразы estUT1

Кинетические параметры (K_M, V_{max}, k_{cat}) гидролиза *p*NPC2, *p*NPC4 и *p*NPC8, катализируемого эстеразой, вычисляли при анализе зависимости начальных скоростей гидролиза от концентрации субстратов (0,05-10 мМ) в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 при 50 °C. Результаты измерений обрабатывали с использованием регрессионного анализа в прямых координатах согласно уравнению Михаэлиса-Ментен:

$$v = \frac{V_{max} \times S}{S + K_M}, \qquad (1)$$

где v – скорость ферментативной реакции, V_{max} – максимальная скорость реакции, S – концентрация субстрата, K_M – константа Михаэлиса.

2.5 Иммобилизация ферментов

2.5.1 Метод поперечной сшивки агрегатов белка

Приготовление биокатализатора CLEA-estUT1 методом поперечной сшивки агрегатов белка

Для получения поперечно сшитых агрегатов ферментов к 0,5 мл фермента (1 мг×мл$^{-1}$ в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0) добавляли осадитель, глутаровый альдегид и добавки в общем объеме 1,5

мл. Реакцию иммобилизации проводили при температуре 4 °C и скорости перемешивания 200 об./мин. После завершения иммобилизации биокатализатор отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об./мин и 4 °C, дважды отмывали 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 и хранили при 4 °C в том же буфере.

В качестве осадителей в работе использовали ацетон, *трет*-бутанол, изопропанол, этанол и сульфат аммония 50% (вес./об.) в соотношении осадитель:фермент 3:1 (об./об.). Биокатализатор готовили, как описано выше в этом пункте. Концентрация глутарового альдегида составила 75 мМ, время иммобилизации 4 ч.

В качестве добавок были протестированы БСА и SDS в количестве 10 мг. Биокатализатор готовили, как описано выше в этом пункте. Концентрация сульфата аммония и глутарового альдегида составила 60% (вес./об.) и 75 мМ, соответственно, время иммобилизации 4 ч.

Для оптимизации параметров приготовления биокатализатора была построена модель с помощью гранецентрированного центрально-композиционного планирования (FCCCD) по методу поверхности отклика (RSM) в программе Design-Expert 10 (Stat-Ease Inc.). Для этого варьировали следующие параметры приготовления биокатализатора: время иммобилизации (1, 4,5 и 8 ч), концентрация сульфата аммония (30, 55 и 80%, вес./об.), глутарового альдегида (25, 87,5 и 150 мМ) и БСА (0,010, 0,105 и 0,200 мМ). В качестве отклика была выбрана степень иммобилизации CLEA-estUT1.

Определение активности иммобилизованной эстеразы estUT1

Активность иммобилизованной эстеразы estUT1 определяли спектрофотометрически согласно методу, описанному в п. 2.4. За одну единицу активности иммобилизованной эстеразы estUT1 принимали количество катализатора, необходимое для высвобождения 1 мкмоль *п*-нитрофенола в мин в анализируемых условиях. Удельную активность выражали в единицах ЕА×мг$^{-1}$ биокатализатора.

Степень иммобилизации (*ImD*) фермента была вычислена по следующей формуле [186]:

$$ImD = \frac{E_{\text{cat}}}{E_{\text{enz}}} \times 100\%, \qquad (2)$$

где E_{cat} – активность биокатализатора, E_{enz} – активность фермента, используемого для приготовления биокатализатора.

Свойства иммобилизованной эстеразы дополнительно исследовали в реакции гидролиза малатиона. Реакцию проводили в соответствии с методикой Liang и соавт [187] с небольшими изменениями. 5 мкл раствора малатиона в этаноле (10 мМ) смешивали с 515 мкл 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 и 80 мкл раствора иммобилизованного фермента. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °C и 250 об./мин. Оставшийся малатион экстрагировали *н*-

гексаном и определяли методом ГХ-МС (п. 2.6). Результат выражали в виде степени гидролиза малатиона (*MHD*) в анализируемых условиях:

$$MHD = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\% , \qquad (3)$$

где C – концентрации малатиона в растворе после реакции гидролиза, C_0 – начальная концентрация малатиона в растворе.

Исследование свойств имобилизированной и свободной estUT1 (после ее коэкспрессии с шаперонами)

Для определения pH оптимума эстеразы estUT1, полученной путем ее коэкспрессии с шаперонами *E. coli*, в свободной и иммобилизованной форме (CLEA-estUT1), измеряли ее активность с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата при 50 °C в течение 15 мин в следующих 50 мМ буферах: цитратно-фосфатный (pH 5,0), натрий-фосфатный буфер (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8,0-9,0), глицин-NaOH (pH 10,0). Результат представляли в виде графика относительной активности, где за контрольное значение была принята активность эстеразы с использованием 50 мМ Tris-HCl pH 8,0.

Стабильность свободной и иммобилизованной эстеразы определяли, выдерживая фермент в буферах с различными значениями pH при температуре 50 °C в течение 1 ч, после чего измеряли остаточную активность с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата. Результат выражали в виде графика относительной активности в данных условиях, где активность эстеразы до прогрева была принята как контрольное значение.

Для определения температурного оптимума свободной и иммобилизованной эстеразы определяли ее активность с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 в диапазоне температур 30-90 °C в течение 15 мин. Результат выражали в виде графика относительной активности, где за контрольное значение была принята активность эстеразы при 80 °C.

Термостабильность свободной и иммобилизованной эстеразы при температурах 50-80 °C определяли, выдерживая фермент (или иммобилизовнный фермент) в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 в течение 1-8 ч при указанных температурах, после чего измеряли остаточную ферментативную активность с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата. Результат представляли в виде графика относительной активности, где активность эстеразы до прогрева была принята за 100%.

Константа скорости инактивации (k_i) определялась из следующего уравнения [188]:

$$\ln\left(\frac{E}{E_0}\right) = -k_i \times t, \qquad (4)$$

где E – это активность фермента после прогрева в течение времени t, E_0 – это начальная активность фермента до прогрева.

Время полуинактивации ($t_{1/2}$) определяли из уравнения [189]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_i}, \qquad (5)$$

Влияние различных добавок (30% растворы этанола и метанола, об./об.; 10 мМ растворы ФМСФ, 2-меркаптоэтанола и ДТТ; 1% растворы SDS, Твин 20 и Тритон X-100, вес./об.) на активность свободной и иммобилизованной эстеразы определяли по остаточной активности, измеренной с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата, после инкубации фермента (или иммобилизованного фермента) при 50 °C в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 в течение 1 ч с указанными добавками. Результат представляли в виде графика относительной активности, где за контрольное значение была принята активность фермента (иммобилизованного фермента) без добавления химических веществ.

Кинетические параметры (K_M, V_{max}, k_{cat}) гидролиза *p*NPC2, *p*NPC4, *p*NPC8 и малатиона, катализируемого свободной и иммобилизованной эстеразой определяли при анализе зависимости начальных скоростей гидролиза от концентрации субстратов (0,003-10 мМ) в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 при 50 °C. Результаты измерений обрабатывали методом регрессионного анализа в прямых координатах с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен (1).

Применение биокатализатора CLEA-estUT1 в реакции гидролиза малатиона

Операционную стабильность CLEA-estUT1 определяли в течение 25 циклов реакции гидролиза малатиона в трех разных средах: 50 мМ Tris-HCl pH 7,0, синтетическая среда, имитирующая бытовые сточные воды (среда OECD) и стерилизованная сточная вода после первичных отстойников с очистных сооружений г. Новосибирска, Кудряшовские очистные сооружения канализации (среда MWW). 0,1 г CLEA-estUT1 в 495,8 мкл среды смешивали с 4,2 мкл 10 мМ раствора малатиона в этаноле и инкубировали в течение 14 ч при 37 °C и 250 об./мин, после чего определяли степень гидролиза малатиона, как описано выше в этом пункте. После каждого цикла реакции биокатализатор отделяли центрифугированием (4 °C, 5 мин, 4000 об./мин) и отмывали трижды 50 мМ Tris-HCl pH 7,0.

2.5.2 Метод ковалентной иммобилизации белка

Приготовление биокатализатора БКЛ методом ковалентной иммобилизации белка

Для синтеза аминосиликагеля предварительно проводили активацию силикагеля АСКГ (размер частиц – 0,2-0,5 мм, насыпная плотность – не менее 0,4 г×см$^{-3}$) путем его прокаливания при температуре 170 °C в течение 6 ч. Затем к 1 г прокаленного силикагеля добавляли 95%-ый раствор APTS в безводном бензоле (из расчета 25 мл раствора на 1 г силикагеля) и инкубировали

в термостатированном шейкере 3 ч при температуре 75 °С и 150 об./мин. Полученный аминированный силикагель промывали последовательно 50 мл бензола, этанола и дистиллированной воды. Водный раствор глутарового альдегида в концентрации 1,2%, выдержанный в течение 20 мин при 60 °С, добавляли к аминированному силикагелю из расчета 2 мл на 1 г силикагеля и перемешивали полученную смесь в течение 2 ч при комнатной температуре. Обработанный силикагель промывали 0,1 М фосфатным буфером pH 6,5.

Белок (очищенную липазу *G. stearothermophilus* G3, полученную в соответствии с пунктом 2.4) растворяли в 0,1 М фосфатном буфере pH 6,5 и добавляли к обработанному глутаровым альдегидом силикагелю (из расчета 50 мг фермента на 1 г носителя) при перемешивании в течение 3 ч при 50 °С и 150 об./мин. Биокатализатор БКЛ отфильтровывали под вакуумом, двукратно промывали водой и сушили в вакуумном испарителе при комнатной температуре до насыпной плотности 0,75 г×см$^{-3}$, измеренной согласно ГОСТ 16190-70 [190].

Определение активности биокатализатора БКЛ

Активность иммобилизованной липазы *G. stearothermophilus* G3 (биокатализатор БКЛ) определяли методом удержания pH по скорости гидролиза эмульсии трибутирина согласно методу, описанному в п. 2.4. Одна единица активности биокатализатора БКЛ определялась как количество биокатализатора БКЛ, необходимое для выделения 1 мкмоль масляной кислоты в мин в анализируемых условиях. Удельную активность выражали в единицах ЕА×г$^{-1}$ биокатализатора.

Применение биокатализатора БКЛ в реакции метанолиза масел для получения МЭЖК

Метанолиз подсолнечного масла (2 г) проводили с использованием биокатализатора БКЛ в количестве 0,25-20% (вес./вес.) в течение 24 ч при температурах 30-60 °С и перемешивании 250 об./мин. Для оптимизации условий проведения процесса исследовали также влияние природы растворителя (*н*-гексан, ацетон, *трет*-бутанол) и его количества (2 – 10 мл), мольного соотношения метанол : масло (от 1:1 до 9:1) и концентрации воды (1 – 10%, об./вес.).

Операционную стабильность биокатализатора определяли в течение 20 циклов реакции метанолиза подсолнечного масла в стандартных условиях: 2 г масла, биокатализатор в концентрации 20% (вес./вес.), метанол в мольном соотношении к маслу 3:1, 4 мл *трет*-бутанола и 4% (об./вес.) воды, температура 40 °С, частота вращения мешалки 250 об./мин. После каждого цикла реакции (1 цикл = 24 ч) иммобилизованную липазу отделяли от реакционной среды, анализировали состав смеси, а биокатализатор промывали *трет*-бутанолом и добавляли к свежей смеси подсолнечного масла и матенола. Выход МЭЖК ($Y_{МЭЖК}$) определяли методом ГХ-МС согласно п. 2.6.

Время полуинактивации биокатализатора БКЛ ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из экспериментальных данных с использованием уравнения линейной регрессии в программе OriginPro 8.5.

Применение биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации растительных масел для получения модифицированных пищевых жиров

Реакцию переэтерификации смеси подсолнечного масла и саломаса в общем объеме 600 мкл проводили с использованием 10-30% биокатализатора (вес./вес.) в течение 1-5 ч при температурах 70-80 °С и скорости перемешивания 1400 об./мин. Для оптимизации условий реакции также исследовали молярное соотношение саломас : подсолнечное масло (1:9, 1:4, 1:3 и 2:3).

Операционную стабильность биокатализатора определяли в течение 5 циклов реакции переэтерификации масел в стандартных условиях: молярное соотношение саломас : подсолнечное масло 1:3, 10% биокатализатора (вес./вес.), температура 70 °С, скорость перемешивания 1400 об./мин. После каждого цикла реакции (1 цикл = 24 ч) биокатализатор отделяли от реакционной среды, анализировали состав смеси, а биокатализатор отмывали *н*-гексаном и добавляли к свежей реакционной смеси. Степень ПЭ (*ID*) определяли методом ВЭЖХ-МС согласно п. 2.6.

Время полуинактивации биокатализатора БКЛ ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из экспериментальных данных с использованием уравнения линейной регрессии в программе OriginPro 8.5.

2.6 Аналитические методы исследования

Анализ гидролиза малатиона методом ГХ-МС

Определение концентрации малатиона в растворах проводили методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent 7000B с ионизацией электронным ударом (70 эВ), на колонке HP-5ms (30 м×0,25 мм×0,25 мкм). Нагрев колонки до 200 °С проводили в течение 3 мин, затем повышали температуру до 250 °С со скоростью 5 °С×мин$^{-1}$. Скорость потока газа-носителя (гелий) составляла 1,2 мл×мин$^{-1}$. Регистрацию хроматограммы проводили в режиме выделенных положительных ионов малатиона (*m/z* 125) и дифенила (*m/z* 154) в качестве внутреннего стандарта. Количество малатиона было вычислено из соотношения пиков малатион:дифенил.

Анализ продуктов реакции метанолиза растительных масел методом ГХ-МС

Для определения состава продуктов переэтерификации 10 мкл образца растворяли в 600 мкл пиридина и добавляли внутренний стандарт (метиловый эфир лауриновой кислоты) в количестве 0,2 мг×мл$^{-1}$. Состав МЭЖК определяли методом газовой хроматомасс-спектрометрии

на приборе Agilent 7000B с ионизацией электронным ударом (70 эВ), на колонке ZB-WAX (30 м×0,25 мм×0,25 мкм). Температура испарителя составляла 250 °С. Нагрев колонки до 210 °С проводили в течение 5 мин, затем повышали температуру до 220 °С со скоростью 6 °С×мин$^{-1}$. Общее время анализа составляло 12 мин. Скорость потока газа-носителя (гелий) – 1 мл×мин$^{-1}$. Регистрацию хроматограммы проводили в режиме выделенных положительных ионов (*m/z* 214, 242, 294, 296, 298, 326). Идентификацию соединений проводили по библиотеке масс-спектров NIST'11 на основании анализа образца, записанного в тех же условиях, но в режиме сканирования в диапазоне 40-600 *m/z*. В качестве стандарта использовали смесь со 100% переэтерификацией, полученную в результате химической ПЭ с использованием H_2SO_4 в качестве катализатора, как описано в [191].

Расчет выхода метиловых эфиров жирных кислот ($Y_{\text{мэжк}}$) проводили по формуле:

$$Y_{\text{мэжк}}(\%) = \frac{S_x}{S_{100\%}} \times \frac{S_{st-x}}{S_{st-100\%}}, \qquad (6)$$

где S_x – суммарная площадь пиков анализируемой пробы; $S_{100\%}$ – суммарная площадь пиков контрольной смеси со 100% переэтерификацией; S_{st-x}– площадь пика внутреннего стандарта анализируемой пробы; $S_{st-100\%}$ – площадь пика внутреннего стандарта контрольной смеси со 100% переэтерификацией.

Анализ продуктов реакции переэтерификации растительных масел методом ВЭЖХ-МС (для получения модфицированных пищевых жиров)

Состав триацилглицеридов в образцах определяли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС) с использованием жидкостного хроматографа HPLC-MS 2020 фирмы Shimadzu (Япония), совмещенным с квадрупольным масс-спектрометром фирмы Shimadzu (Япония) с однократной фокусировкой, на колонке PerfectSil Target ODS-3 C18 (MZ-Analysentechnik) размером 250 мм×4.6 мм. В качестве метода ионизации использовали химическую ионизацию при атмосферном давлении (APCI) и электрораспыление (ESI). Разделение на колонке проводили смесью метанол:изопропанол (70:30, об.%) в изократическом режиме. Скорость потока составляла 1 мл×мин$^{-1}$, время анализа – 75 мин, температура испарителя 400 °С. Регистрацию хроматограммы проводили в режиме выделенных положительных ионов в диапазоне 100-1000 *m/z*. Идентификацию триацилглицеридов осуществляли на основе молекулярных масс соответствующих псевдо-молекулярных положительных ионов. Для регистрации и обработки хроматограмм использовали программное обеспечение Lab Solution v. 5.53.

Для оценки состава триацилглицеридов использовали определение эквивалентных углеродных чисел (ECN) в соответствии с методом AOCS Ce 5b-89 [192]. В качестве стандарта использовали триолеин. Расчет проводили по формуле:

$$\mathrm{ECN} = \mathrm{N(C)} - 2 \times \mathrm{N(d)}, \qquad (7)$$

где N(C) – общее число атомов углерода в жирнокислотных остатках, N(d) – количество двойных связей в жирнокислотных остатках.

Концентрацию триацилглицеридов (TG_{I}), площадь которых увеличилась в ходе реакции, рассчитывали по формуле:

$$TG_{\mathrm{I}} = \frac{\sum S_{TG_{\mathrm{I}}}}{\sum S_{TG}} \times 100\%, \qquad (8)$$

где S_{TGI} – площади пиков, которые увеличивались в ходе реакции, S_{TG} – общая площадь пиков в реакционной смеси.

Степень переэтерификации (*ID*) определяли по изменению в процентах площадей пиков триацилглицеридов, которые увеличивались в ходе реакции (TG_{I}), по отношению к их значению в начале реакции (TG_{I0}) (формула 8), как в работе [193]:

$$ID = \frac{TG_{\mathrm{I}}}{TG_{\mathrm{I0}}} \times 100\%, \qquad (9)$$

Анализ состава жирных кислот в продуктах реакции переэтерификации масел методом ГХ-МС (для получения модифицированных пищевых жиров)

Анализируемую пробу масла (0,04 г) растворяли в 0,8 мл *н*-гексана, добавляли 0,08 мл 2 М KOH в метаноле и перемешивали в течение 2 ч и температуре 60 °C. Затем центрифугировали (8000 об./мин) в течение 1 мин, верхний слой отбирали и сушили в токе азота [194]. Для определения состава жирных кислот 10 мг высушенного образца растворяли в 1 мл *н*-гексана. Анализ полученных метиловых эфиров жирных кислот проводили методом ГХ-МС на приборе Agilent 7000B с ионизацией электронным ударом (70 эВ) на колонке ZB-WAX (30 м×0,25 мм×0,25 мкм, Phenomenex). Температура испарителя составляла 250 °C. Поток газа-носителя (гелий) – 1 мл×мин$^{-1}$. Регистрацию хроматограммы проводили в режиме выделенных ионов (*m/z* 214, 242, 294, 296, 298, 326). Идентификацию соединений проводили по библиотеке масс-спектров NIST-11.

Определение температуры плавления масел

Температуру плавления масел определяли согласно методу AOCS Cc.3.25 [192]. Капиллярную трубку с внутренним диаметром 1 мм заполняли образцом расплавленного масла и охлаждали до затвердения масла при 4 °C в течение 1 ч. Далее капилляр с маслом погружали в водяную баню с дистиллированной водой при перемешивании и нагревании воды со скоростью 2 °C×мин$^{-1}$. Температуру плавления регистрировали по началу движения масла по капиллярной трубке.

2.7 Статистическая обработка данных

Обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и OriginPro 8.5. Дисперсионный анализ (ANOVA) проводили в программе Design-Expert v. 10 (Stat-Ease Inc.). 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.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение и изучение свойств новых термостабильных липолитических ферментов, несомненно, представляет значительный интерес для биотехнологии. Однако на практике получение таких белков представляет значительную проблему, в том числе из-за низкого уровня продукции термостабильных ферментов в существующих системах экспрессии. Как правило, для продукции таких белков в клетках требуются специфические системы фолдинга, которые могут отсутствать у гетерологичных продуцентов. Из-за этого такие ферменты, как правило, экспрессируются в виде телец включения, что требует применения дополнительной стадии рефолдинга *in vitro*, сопровождающегося значительным расходом дополнительных реагентов (мочевины) и потерями белка. Стоит также принять во внимание влияние процесса протеолитического расщепления рекомбинантных белков при их сверхсинтезе. Кроме того, высокий уровень экспрессии липолитических ферментов зачастую оказывает токсичное влияние на клетку продуцента из-за внутриклеточного нарушения синтеза липидов, в том числе входящих в состав мембран.

Наличие подобных проблем привело к тому, что лишь немногие рекомбинантные липолитические ферменты были получены в достаточном количестве для их применения в составе биокатализаторов. В частности, в настоящее время широко применяются лишь коммерчески доступные рекомбинантные липазы и эстеразы. Современные исследования в этой области направлены на получение более эффективных липолитических ферментов, в том числе обладающих большей термостабильностью, устойчивостью в широком диапазоне pH и к органическим растворителям. Разработка таких белков связана как с улучшением свойств уже известных ферментов методами биоинженерии, так и поиском новых вариантов у природных продуцентов. Поскольку выделяемые из природы термостабильные ферменты, как правило, обладают уникальными свойствами, требуется их всестороннее изучение для экспериментального обоснования необходимости их применения в тех или иных биотехнологических процессах.

В связи с этим актуально проведение исследования по следующим направлениям:

- Поиск новых термостабильных липолитических ферментов в природе, их экспрессия в составе молекулярных векторов *E. coli* и изучение свойств;
- Разработка биокатализаторов на основе новых рекомбинантных липолитических ферментов;

- Изучение возможности применения разрабатываемых биокатализаторов в различных процессах (очистка муниципальных сточных вод, получение биодизельного топлива и масложировых продуктов).

Использование такого комплексного подхода позволяет не только исследовать свойства новых ферментов в составе биокатализаторов, но и применить их в тех или иных промышленно значимых процессах в связи с их индивидуальными особенностями.

3.1 Выделение и идентификация термофильных бактерий с липолитической активностью из природных образцов

Для получения чистых культур термофильных микроорганизмов, продуцирующих липолитические ферменты, проводили сбор полевого материала в образцах компоста в разных регионах РФ, включая Новосибирскую область и Республику Тыва. Выделение чистых культур микроорганизмов проводили на агаризованной среде LB с 1% трибутирином при 37-65 °C. О наличии липолитической активности судили по появлению зоны просветления вокруг колоний. Результаты эксперимента приведены в Таблице 5. Было показано, что из 46 выделенных культур микроорганизмов липолитической активностью обладает 21 культура.

Таблица 5 – Результаты скрининга микроорганизмов, выделенных из компоста, на липолитическую активность

Образец	**Название культуры**	**Температура, °C**	**pH**	**Среда LBT**
Новосибирская область				
1 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	1-1	45-60	7-9	+*
	1-2	45-60	6-9	+++
	1-3	37	7	-
2 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	2-4	45	7	++
	2-5	45	7	++
	2-6	45	7	+
3 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	3-7	45-60	6-8	+++
	3-8	45	7	+
	3-9	45-60	6-10	+
4 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	4-10	45-60	7-9	++
	4-11	60	7-9	+
	4-12	60	7	-
С5 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	С5-1	65	7	-
	С6-1	65	7	-

С6 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	С6-2	65	7	-
С7 (Перавомайский район г. Новосибирск, компостная куча)	С7-1	65	7	-
	С7-2	65	7	-
	С7-3	65	7	-
	С7-4	65	7	-
С8 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	С8-1	37	7	-
	С8-2	65	7	-
	С8-3	60-65	7-9	+
С9 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	С9-1	60-65	7-9	+
	С9-2	60-65	7-9	+++
	С9-3	60-65	7-9	+++
С10 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	С10-1	65	7	-
	С10-2	65	7	-
С12 (Калининский район, г. Новосибирск, компостная куча)	С12-1	37	7	-
	С12-2	65	7	-
	С12-3	65	7	-
С13 (Советский район г. Новосибирск, компостная куча)	С13-1	60-65	7-9	+
	С13-2	60	7-9	+
	С13-3	37	7	-
С15 (п. Кудряши, компостная куча)	С15-1	65	7	-
	С15-2	60	7-9	+++
	С15-3	60	7	-
Республика Тыва				
Т1 (Южный район, г. Кызыл, компостная куча)	Т1-1	60-65	7-9	+
	Т1-2	65	7	-
	Т1-3	65	7	-
Т2 (Правобережный район, г. Кызыл, компостная куча)	Т2-1	65	7	-
	Т2-2	60-65	7-9	+
	Т2-3	65	7	-
Т3 (п. Каа-Хем, компостная куча)	Т3-1	65	7	-
	Т3-2	65	7	-
	Т3-3	60-65	7-9	+++
	Т3-4	60-65	7-9	+++

* Степень гидролиза определяли по размеру зоны просветления вокруг колоний.

Для микроорганизмов, обладавших наибольшей зоной просветления вокруг колоний на трибутирин-содержащем агаре, была проведена их видовая идентификация по последовательности гена 16S рРНК. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали

с известными последовательностями, содержащимися в базе данных GenBank (Таблица 6). Было установлено, что большинство штаммов, выделенных из компоста, относится к видам *B. licheniformis* (7 шт.) и *G. thermodenitrificans* (3 шт.) с идентичностью не менее 99%. Также среди выделенных штаммов были выявлены представители *Bacillus* sp. (2 шт.), *Geobacillus* sp. (1 шт.), *U. suwonensis* (1 шт.) и *U. thermosphaericus* (1 шт.).

Таблица 6 – Видовая идентификация микроорганизмов, выделенных из образцов компоста

Название культуры	**Название штамма**	**% идентичности с последовательностямииз GenBank**
1	*B. licheniformis* BL1	MG546213, 99%
2	*B. licheniformis* BL2	KC755089, 99%
5	*Bacillus* sp. Bsp5	MG430380, 99%
7	*B. licheniformis* BL7	KY886241, 99%
8	*Bacillus* sp. Bsp8	MG461674, 99%
9	*B. licheniformis* BL9	JN998754, 99%
10	*B. licheniformis* BL10	MG546213, 99%
11	*B. licheniformis* BL11	KY886241, 99%
C8-3	*U. suwonensis* US3	LT631780, 99%
C9-1	*B. licheniformis* BL9-1	KT719913, 99%
C9-2	*Geobacillus thermodenitrificans* GT2	KP842609, 100%
C9-3	*Geobacillus* sp. Gsp3	LT745876, 100%
T3-3	*G. thermodenitrificans* GT3	CP020030, 100%
T3-4	*G. thermodenitrificans* GT4	CP017694, 99%
C15-2	*U. thermosphaericus* UT1	AP018335, 99%

В целом, липолитические ферменты, выделенные из бактерий *B. licheniformis* и *G. thermodenitrificans* являются относительно изученными [66, 195-197]. Выделенный в ходе работы штамм *U. thermosphaericus* UT1 растет при относительно высокой температуре (60 °C) при pH 7,0-9,0. Он представляет наибольший интерес для изучения, поскольку показал высокую липолитическую активность по гидролизу трибутирина на агаризованной среде LBT (Рисунок 6)

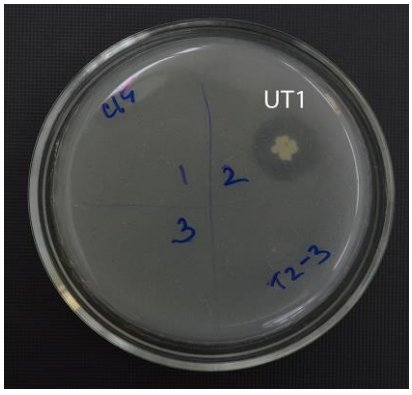

Рисунок 6 – Тестирование липолитической активности штамма *U. thermosphaericus* UT1 на среде LBT при 60 °C

при этой температуре. У этой бактерии ранее не были изучены свойства ее ферментов, в том числе липолитических, поэтому выделенный штамм *U. thermosphaericus* UT1 был использован в данной работе для получения рекомбинантного липолитического фермента и изучения его свойств.

3.2 Получение и исследование свойств рекомбинантной эстеразы бактерии *U. thermosphaericus*

3.2.1 Филогенетический анализ эстеразы estUT1

В базе данных GenBank аннотировано 5 эстераз (WP_016838941.1, WP_096550510.1, WP_096551163.1, WP_096550528.1, WP_096551852.1) и 3 α/β-гидролаз (WP_016838048.1, WP_096552466.1, WP_096551108.1), из которых удалось клонировать только одну, с аминокислотной последовательностью эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* (WP_016838941.1), состоящей из 248 аминокислотных остатков. Ген эстеразы estUT1 был амплифицирован с геномной ДНК штамма *U. thermosphaericus* UT1, субклонирован в pAL-TA вектор, после чего было проведено определение его нуклеотидной последовательности. Выявлено, что estUT1 имеет 100% идентичности с аминокислотной последовательностью WP_016838941.1 эстеразы *U. thermosphaericus*.

Множественное выравнивание аминокислотной последовательности эстеразы estUT1 с последовательностями, содержащимися в GenBank (Рисунок 7) показало высокую идентичность фермента с эстеразами бактерий *Lysinibacillus manganicus* (WP_036189402.1, 82%), *Lysinibacillus massiliensis* (WP_036176266.1, 81%), *Lysinibacillus odysseyi* (WP_036151316.1, 79%), *Lysinibacillus sinduriensis* (WP_036198294.1, 79%), *Bacillus* sp. KCTC 13219 (WP_066165759.1, 77%), *Bacillus ndiopicus* (WP_042479182.1, 77%) и *Solibacillus silvestris* (WP_008408489.1, 76%).

Для классификации эстеразы estUT1 (Рисунок 8) как представителя одного из семейств липолитических ферментов, было построено филогенетическое дерево с использованием 41 представителя известных семейств липолитических ферментов [34, 45-47, 49, 51, 52, 75, 198, 199] и 7 ближайших гомологов.

Результат филогенетического анализа позволяет заключить, что эстераза estUT1 относится к отдельной, ранее не охарактеризованной группе липолитических ферментов. Сравнение аминокислотных последовательностей estUT1 с ее ближайшими гомологами (Рисунок 7) выявило консервативный пентапептид GVSLG, который соответствует мотиву GXSXG, присутствующему в составе аминокислотных последовательностей многих липолитических

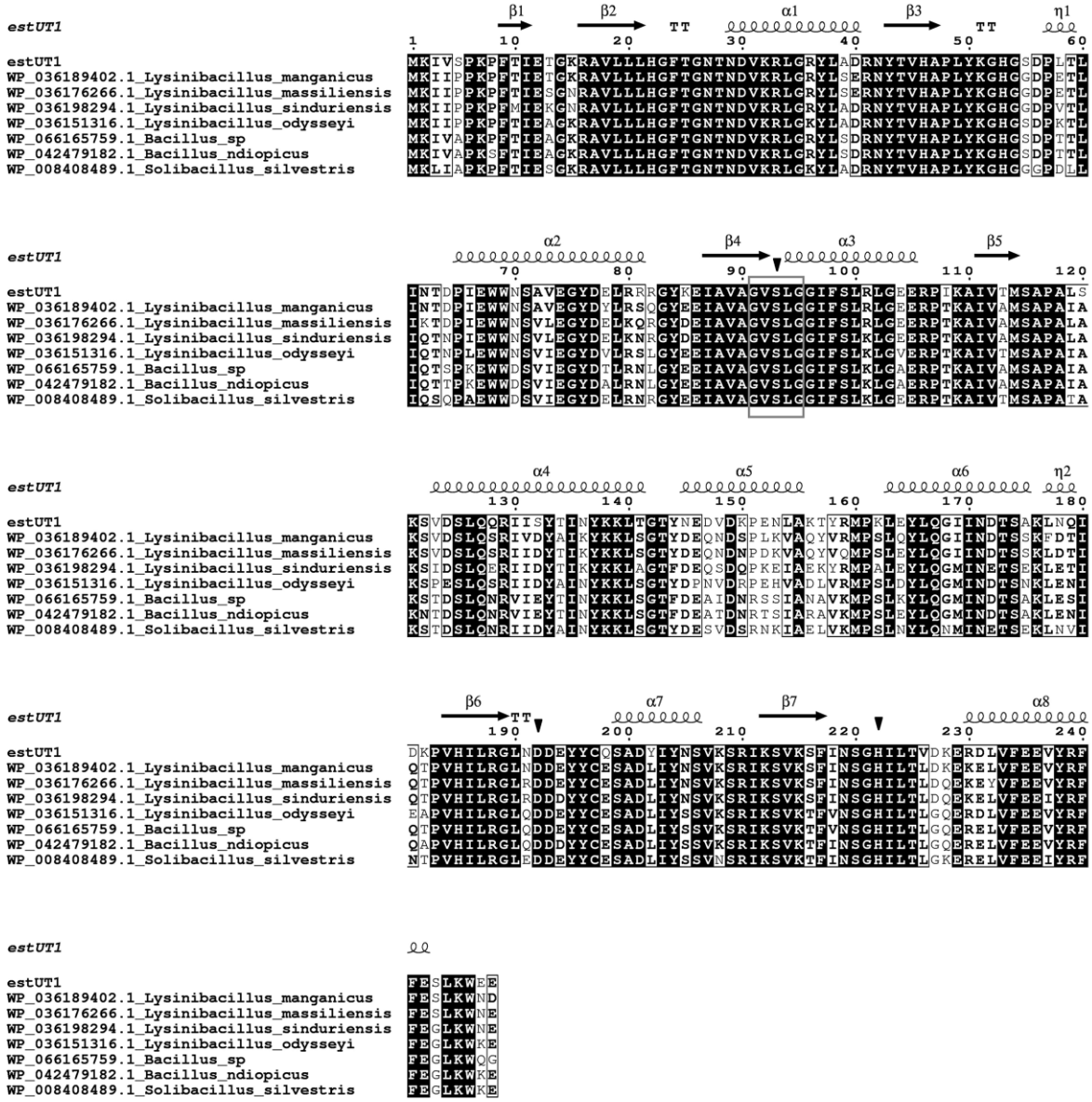

Рисунок 7 – Множественное выравнивание аминокислотной последовательности белка estUT1 с гомологичными последовательностями. Аминокислотные остатки, относящиеся к предполагаемой каталитической триаде, отмечены треугольниками, пентапептид GXSXG заключен в прямоугольник. Элементы вторичной структуры (α-спирали, β-складчатые листы, η-петли и Т-повороты) отмечены над множественным выравниванием

ферментов, однако не совпадает ни с одним из пентапептидов у известных бактериальных семейств липолитических ферментов, например, GHSQG в семейства I или GGSVG у семейства VIII (Таблица 1). Сравнение аминокислотных последовательностей эстеразы estUT1 с последовательностями представителей ближайшего семейства XIII (идентичность 41 – 47%) подтвердило отличия в структуре, а именно, присутствие уникального консервативного мотива GLSLG (Рисунок 9). Таким образом, эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* относится к

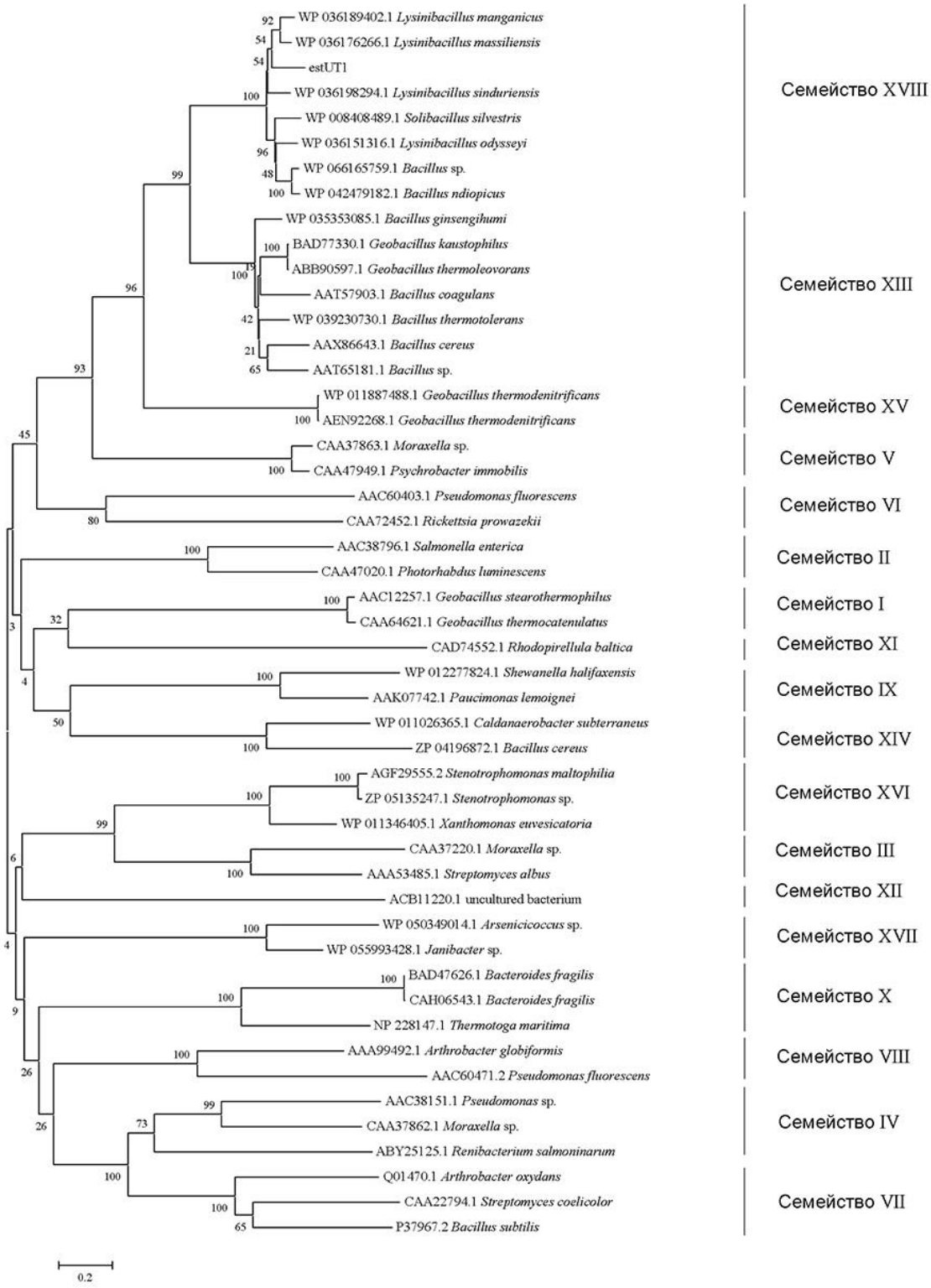

Рисунок 8 – Филогенетический анализ эстеразы estUT1 и определение ее принадлежности к семействам липолитических ферментов. В точках ветвления указаны результаты для 1000 бутстреповских повторов

новому семейству липолитических ферментов, которому был присвоен порядковый номер XVIII. Для уточнения этого предположения дополнительно было проведено исследование биохимических свойств этого фермента, которое изложено в работе [200].

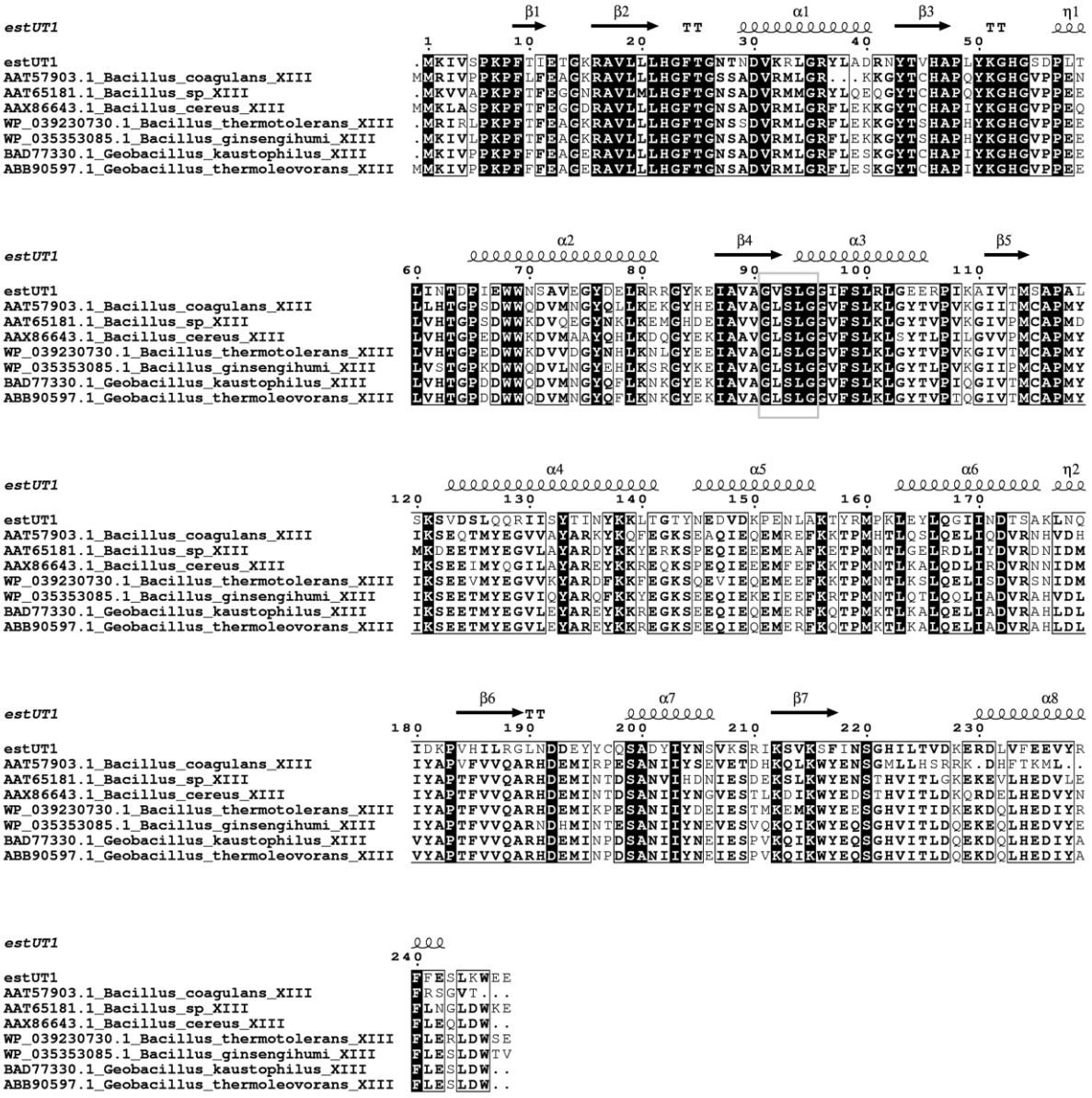

Рисунок 9 – Множественное выравнивание аминокислотной последовательности эстеразы estUT1 с представителями XIII семейства бактериальных липолитических ферментов. Консервативный пентапептид GXSXG заключен в прямоугольник

3.2.2 Получение рекомбинанатной эстеразы estUT1

Для получения рекомбинантного фермента, ген эстеразы estUT1 клонировали в плазмидный вектор pET32b(+) с использованием эндонуклеаз рестрикции BamHI и Sfr 274I для получения плазмиды pET32b-UT1 (Приложение А), которую затем трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3). Разработанная генетическая конструкция pET32b-UT1 позволяет получать

эстеразу в виде химерного белка, соединенного с тиоредоксином A (TrxA-tag), что повышает его растворимость, а также с полигистидиновой последовательностью (6His-tag), позволяющей быстро и эффективно осуществлять очистку рекомбинантного белка с помощью аффинной хроматографии.

Культивирование продуцента проводили в среде LB при температуре 32 °C. После индукции биосинтеза estUT1 в присутствии 0,5 мМ ИПТГ продолжали культивирование при пониженной температуре (16 °C), чтобы снизить скорость синтеза белка и, как следствие, минимизировать образование телец включения в результате его гиперэкспрессии [201]. После разрушения клеток под действием ультразвука и центрифугирования для исследований свойств эстеразы использовали осадок (нерастворимую фракцию белка или тельца включения).

Для растворения белков, получаемых при биосинтезе как тельца включения, обычно используют хаотропные вещества, такие как гуанидин гидрохлорид и мочевина [202]. Гуанидин гидрохлорид является более сильным агентом, однако он практически полностью разрушает вторичную структуру белка, что существенно затрудняет или делает невозможным процесс его последующего рефолдинга [203]. В связи с этим для растворения белка из телец включения в данной работе была использована мочевина, как более мягкий агент, не столь сильно влияющий на структуру белка. Для последующего рефолдинга белка был выбран метод постадийного диализа в понижающемся градиенте мочевины (8-0 М) при температуре 4 °C, поскольку ранее было показано, что благодаря поэтапному снижению концентрации денатурирующего агента обеспечивается высокая эффективность этого процесса [204]. После диализа удельная активность эстеразы составила 1,2 ЕА×мг$^{-1}$.

Дальнейшую очистку рекомбинантного белка проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Полученные при хроматографии фракции с липолитической активностью обессоливали гель-проникающей хроматографией на колонке с сорбентом Sephadex G25. После двухступенчатой очистки выход эстеразы составил 58 и 18%, соответственно (Таблица 7). Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле (Рисунок 10) после индукции ИПТГ показал появление белковой фракции с молекулярной массой, соответствующей предсказанной (~ 48 кДа).

Таблица 7 – Очистка эстеразы estUT1

Шаг очистки	**Содержание белка, мг**	**Активность, ЕА**	**Удельная активность, ЕА×мг$^{-1}$**	**Выход, %**	**Степень очистки**
Диализ	296	355	1,2	100	1
Аффинная хроматография	31	205	6,6	58	6
Гель-фильтрация	5	63	12,5	18	10

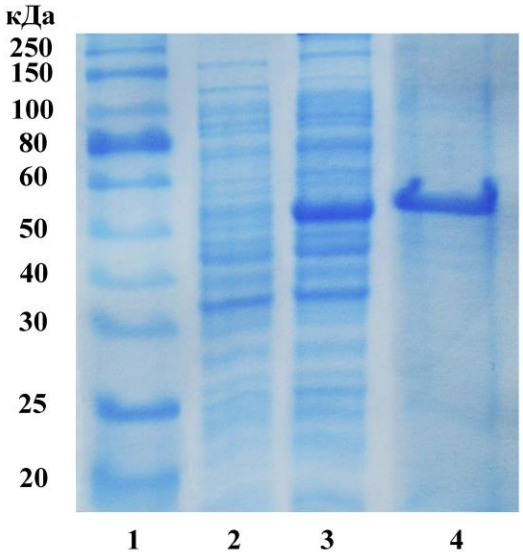

Рисунок 10 – Экспрессия эстеразы estUT1 в *E. coli* BL21(DE3): 1 – маркер молекулярного веса белков; 2 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b(+); 3 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1; 4 – очищенная с помощью аффинной хроматографии нерастворимая фракция белка (estUT1) после растворения и рефолдинга телец включения

3.2.3 Моделирование трехмерной структуры estUT1

Для моделирования трехмерной структуры эстеразы estUT1 (остатки 1-246) был использован сервер SWISS-MODEL (п. 2.3.2) и трехмерная модель карбоксилэстеразы *B. stearothermophilus* (PDB 2R1D, идентичность 46%) в качестве шаблона. Качество полученной модели было подтверждено программой PROCHECK (Приложение Б), которая показала, что 93,9% аминокислотных остатков находятся в оптимальных областях значений карты Рамачандрана. Моделирование структуры estUT1 показало, что фермент относится к суперсемейству α/β-гидролаз, характерному для липолитических ферментов [205]. Структура эстеразы состоит из семи β-складчатых листов, окруженных восемью α-спиралями. Аминокислотные остатки Ser93, Asp192 и His222 расположены в непосредственной близости, образуя предполагаемый активный центр фермента (Рисунок 11). Чтобы подтвердить наличие этих аминокислотных остатков в каталитической триаде, они были заменены сайт-направленным мутагенезом (п. 2.3.2) с получением мутантных ферментов (Таблица 8) estUT1-Ser93Ala-Mut, estUT1-Asp192Asn-Mut и estUT1-His222Leu-Mut. Для всех мутантных ферментов не было

выявлено эстеразной активности, что подтверждает, что эти остатки входят в активный сайт эстеразы estUT1.

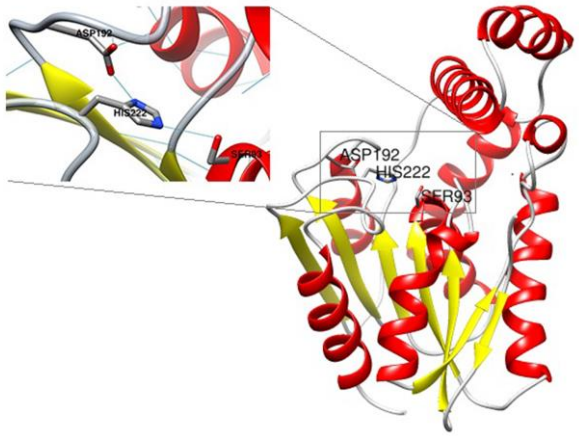

Рисунок 11 – Трехмерная модель эстеразы estUT1. Каталитическая триада фермента образована остатками Ser93, Asp192 и His222

Таблица 8 – Сравнение активности эстеразы estUT1 и ее мутантных форм

Фермент	**estUT1**	**estUT1-Ser93Ala-Mut**	**estUT1-Asp192Asn-Mut**	**estUT1-His222Leu-Mut**
Относительная активность, %	100,0 ± 2,8	2,2 ± 0,8	0,9 ± 0,2	1,7 ± 0,3

3.2.4 Исследование свойств эстеразы estUT1

Субстратная специфичность estUT1

Субстратную специфичность очищенной рекомбинантной эстеразы estUT1 определяли с использованием *n*-нитрофениловых эфиров карбоновых кислот различной длины (Рисунок 12). Выявлено, что эстераза estUT1 обладает высокой специфичностью по отношению к короткоцепочечным остаткам жирных кислот (*p*NPC2, *p*NPC4) с максимальной активностью при использовании *p*NPC2, которая была принята как контрольное значение (100,0 ± 3,4%). При использовании субстратов со средней длиной жирнокислотных остатков активность эстеразы была значительно снижена, например, при использовании *p*NPC8 она составила 9,9 ± 0,5% от относительной активности. При использовании эфиров с большей длиной жирнокислотной цепи, таких как *p*NPC12, *p*NPC16 и *p*NPC18, в исследуемых условиях у эстеразы практически не наблюдалось активности, что является типичным для многих эстераз, которые обладают специфичностью к короткоцепочечным жирнокислотным субстратам. Например, эстераза бактерии *Lactobacillus plantarum,* клонированная в плазмидный вектор pET14b и

синтезированная в клетках *E. coli* BL21(DE3), обладает наибольшей активностью при использовании *p*NPC2 (129 ЕА×мг$^{-1}$) и *p*NPC4 (16 ЕА×мг$^{-1}$) в качестве субстратов, при этом активности по отношению к другим эфирам *n*-нитрофенола не было выявлено [206]. Эстераза бактерии *Geobacillus* sp. JM6, ген которой экпрессировали в *E. coli* BL21(DE3), также обладала наибольшей активностью по отношению к короткоцепоченым эфирам жирных кислот – *p*NPC4 и *p*NPC2 (100 и 82,5% относительной активности, соответственно), которая практически отсутствовала для *p*NPC10, *p*NPC12, *p*NPC14, и *p*NPC16 [207].

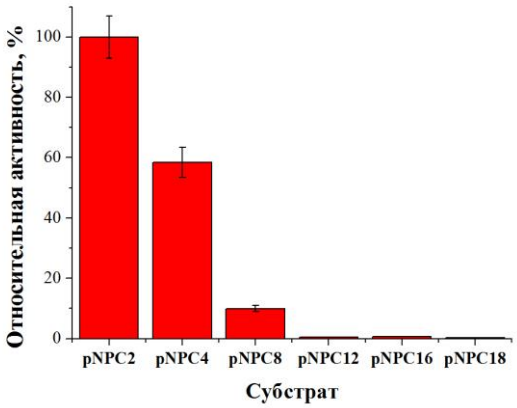

Рисунок 12 – Субстратная специфичность эстеразы estUT1. Активность с *p*NPC2 в качестве субстрата была принята как контрольное значение

Влияние pH на активность и стабильность estUT1

Активность estUT1 была оценена в буферах с различными значениями pH (Рисунок 13А).

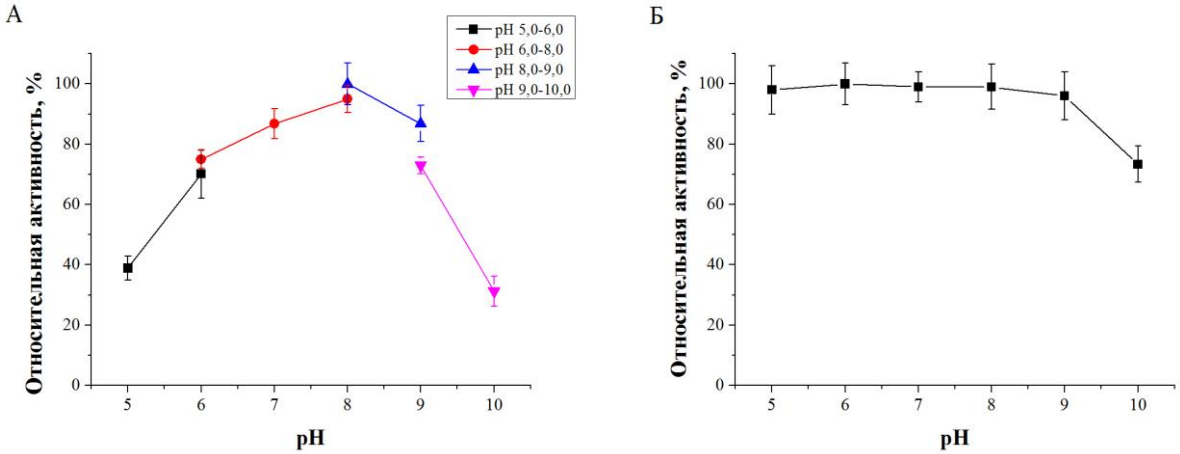

Рисунок 13 – Влияние pH на активность (А) и стабильность (Б) эстеразы estUT1. (А) Активность фермента в буферах с различным pH измеряли с *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность в Tris-HCl pH 8,0 была принята как контрольное значение. (Б) pH-стабильность эстеразы определяли в буферах с различным pH через 1 ч инкубации с последующим измерением остаточной активности с *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность до прогрева была принята как контрольное значение

Установлено, что максимальная активность фермента наблюдалась в Tris-HCl pH 8,0. При pH ниже 6,0 и выше 9,0 наблюдалась значительное падение активности фермента. Известно, что термостабильные бактериальные эстеразы часто обладают оптимумом активности при pH 5,5-9,5. Например, эстераза *Geobacillus* sp. JM6 имеет оптимум pH 7,5 [207], а эстераза *Bacillus coagulans* 81-11 – 8,0 [208]. Инкубация эстеразы estUT1 в течение 1 ч при 50 °C в исследуемых буферах (Рисунок 13Б) показала, что фермент является стабильным в диапазоне pH 5,0-9,0, сохраняя свыше 95% от начальной активности.

Влияние температуры на активность и стабильность estUT1

Температурный оптимум эстеразы определяли, варьируя температуру реакции от 30 до 90 °C. Как видно из представленных данных (Рисунок 14А) температурный оптимум эстеразы находится при 70-80 °C, хотя бактериальные эстеразы в основном обладают максимальной активностью при 40-60 °C [206, 207].

Исследование стабильности estUT1 при температурах 50-80 °C (Рисунок 14Б) показало, что фермент сохранял свыше 69% от первоначальной активности при 50-70 °C, в то время как при 80 °C активность фермента снизилась до 42,2 ± 6,5 %. Время полуинактивации эстеразы estUT1 при температуре 60 °C составило около 15 ч (Таблица 9), что сравнимо с другими термостабильными эстеразами рода *Bacillus*, например с эстеразой бактерии *Bacillus* sp. 4 [209] или эстеразой EstL5, выделенной из *G. thermodenitrificans* T2 [197]. Однако estUT1 оказалась менее стабильной, чем эстераза бактерии *Geobacillus* sp. JM6 [207], которая после инкубации в течение 4 ч при 90 °C имеет 84% относительной активности.

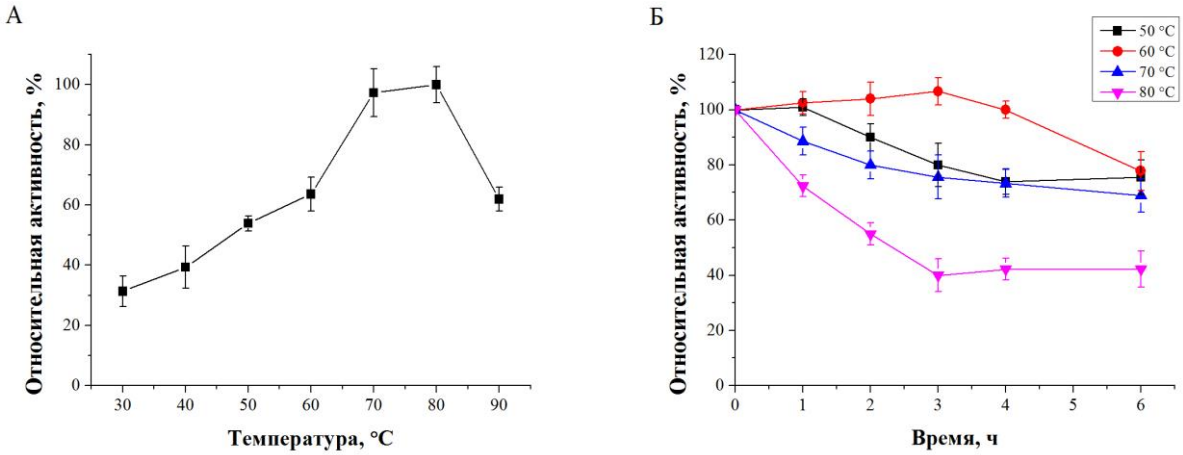

Рисунок 14 – Влияние температуры на активность (А) и стабильность (Б) эстеразы estUT1. (А) Активность фермента в диапазоне температур 30-90 °C измеряли с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность при 80 °C была принята как контрольное значение (Б) Термостабильность эстеразы определяли при 50-80 °C в течение 6 ч. Остаточную активность измеряли с *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность до прогрева была принята как контрольное значение

Таблица 9 – Сравнение термостабильности estUT1 с другими бактериальными эстеразами

Название штамма (название фермента)	**Термостабильность**	**Субстрат, используемый для определения активности**	**Источник литературы**
U. thermosphaericus UT1 (EstUT1)	$t_{1/2}$ (60 °C) ~ 15 ч	*p*NPC4	Эта работа
Geobacillus sp. JM6 (JM6)	4 ч: 80 °C – 90% 90 °C – 84% 100 °C – 81%	*p*NPC4	[207]
Anoxybacillus flavithermus T1 (Est/Lip)	$t_{1/2}$ (60 °C) ~ 5 ч	*p*NPC2	[57]
Geobacillus thermodenitrificans T2 (EstL5)	$t_{1/2}$ (60 °C) ~ 12 ч $t_{1/2}$ (70 °C) ~ 12 мин	*p*NPC4	[197]
B. licheniformis	$t_{1/2}$ (64 °C) ~ 1 ч	*p*NPC6	[210]
Bacillus sp. 4	$t_{1/2}$ (65 °C) ~ 10 ч	*p*NPC4	[209]

Таким образом, поскольку свойства estUT1 (молекулярная масса, pH и температурный оптимумы) и ее консервативный пентапептид отличаются от характеристик представителей I-XVII семейств бактериальных липолитических ферментов (Таблица 1), можно сделать вывод о том, что эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus* относится к новому семейству липолитических ферментов (XVIII).

Влияние солей металлов, ПАВ и различных добавок на активность estUT1

В данной работе было исследовано влияние различных добавок в концентрациях 1 и 10 мМ на активность estUT1 (Таблица 10, Таблица 11). Активность эстеразы незначительно снижалась при наличии в реакционной среде 1 мМ $CaCl_2$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ и $Al_2(SO_4)_3$, при этом активность после 1 ч инкубации составляла 76-90% относительно контроля. Сильное ингибирующее влияние на фермент оказывали соли $CuSO_4$ и $MgSO_4$ в обеих концентрациях, снижая активность фермента до 30-45 и 37-38% от контрольного значения при концентрации солей 1 и 10 мМ, соответственно. $FeSO_4$ в концентрации 10 мМ, наоборот, оказывал положительное влияние на активность эстеразы estUT1, которая повысилась до 152,5 ± 2,4%. Соли NaCl и KCl в обеих протестированных концентрациях почти не оказывали влияния на активность фермента.

Значительное ингибирование фермента наблюдалось в присутствии 10 мМ ФМСФ: при этом его активность снизилась до 11,9 ± 1,1%, что указывает на то, что сериновый остаток входит в каталитический сайт эстеразы (триада Ser-Asp-His). Добавление 10 мМ 2-меркаптоэтанола и ДТТ оказывало незначительное влияние, и активность эстеразы составила 79,6 ± 0,9 и 71,7 ± 0,8%, соответственно, в то время как в присутствии 1 и 10 мМ ЭДТА ферментантивная активность

Таблица 10 – Влияние солей металлов на активность estUT1. Фермент инкубировали в присутствии солей металлов 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 выступала как контрольное значение

Соль металла	**Относительная активность, %**	
	1 мМ	**10 мМ**
Контроль	100,0 ± 2,7	100,0 ± 2,7
NaCl	101,1 ± 2,7	95,8 ± 1,7
KCl	98,0 ± 1,8	100,3 ± 1,7
$CaCl_2$	90,3 ± 3,2	87,3 ± 6,0
$CoCl_2$	81,4 ± 1,6	41,5 ± 1,2
$CuSO_4$	29,5 ± 2,4	37,3 ± 4,8
$MgSO_4$	45,1 ± 2,4	38,1 ± 1,2
$MnSO_4$	73,6 ± 1,6	51,7 ± 3,6
$ZnSO_4$	76,4 ± 2,4	97,4 ± 3,6
$FeSO_4$	90,3 ± 0,0	152,5 ± 2,4
$Al_2(SO_4)_3$	78,6 ± 0,8	54,2 ± 2,4

Таблица 11 – Влияние ингибиторов и ПАВ на активность estUT1. Фермент инкубировали в присутствии химических веществ в концентрациях 1 и 10 мМ в течение 1 ч. Остаточную активность измеряли с использованием *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность эстеразы без добавления химических веществ выступала как контрольное значение

Добавка	**Относительная активность, %**	
	1 мМ	**10 мМ**
Контроль	100,0 ± 1,6	100,0 ± 1,6
ЭДТА	109,6 ± 1,4	96,7 ± 1,8
ДТТ	94,7 ± 2,0	71,7 ± 0,8
ФМСФ	68,9 ± 2,9	11,9 ± 1,1
2-меркаптоэтанол	97,2 ± 1,3	79,6 ± 0,9
SDS	104,2 ± 1,7	85,8 ± 2,2
Твин 20	71,1 ± 1,7	54,1 ± 0,9
Твин 80	76,4 ± 1,8	49,4 ± 1,7
Тритон X-100	30,6 ± 1,8	21,7 ± 3,4

оставалась на начальном уровне (109,6 ± 1,4 и 96,7 ± 1,8%, соответственно). Тот факт, что на активность эстеразы не влиял ЭДТА, говорит о том, что estUT1 не является металлоферментом. В обеих протестированных концентрациях поверхностно-активные вещества (ПАВ) Твин 20, Твин 80 и Тритон X-100 оказывали значительное ингибирующее влияние на активность фермента, в частности Тритон X-100 снижал активность эстеразы до 21,7 ± 3,4%. 1 мМ SDS не повлиял на активность estUT1, однако увеличение концентрации до 10 мМ повлекло за собой небольшое снижение активности фермента до 85,8 ± 2,2%.

Влияние органических растворителей на активность estUT1

В работе была исследована стабильность рекомбинантной эстеразы estUT1 в присутствии различных органических растворителей в концентрациях 10 и 30% (об.%): этанола, метанола, *н*-гексана, ацетона, ДМСО, хлороформа, изопропанола, *н*-бутанола, ацетонитрила и ДМФА (Рисунок 15). Метанол, этанол, *н*-гексан, ацетон и ДМФА в обеих протестированных концентрациях не оказали влияния на активность фермента. В 10% изопропаноле, *н*-бутаноле и ацетонитриле фермент estUT1 также оставался стабилен (активность 96-99%), однако увеличение концентрации этих органических растворителей до 30% привело к снижению активности фермента до 79-90%. Наибольшее негативное влияние на активность оказали 30% растворы ДМСО и хлороформа, в которых фермент сохранил 65,2 ± 1,9 и 41,6 ± 2,3% активности, соответственно.

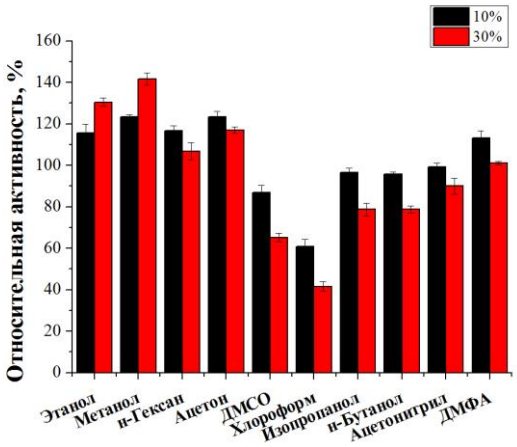

Рисунок 15 – Влияние органических растворителей на активность эстеразы estUT1. Фермент инкубировали в течение 1 ч в присутствии различных растворителей в концентрациях 10 и 30% (об.%). Остаточную активность измеряли с *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность эстеразы без добавления растворителей была принята как контрольное значение

В работе была изучена стабильность estUT1 в растворах метанола и этанола в концентрациях 10 и 30% (об.%) при температуре 50 °C в течение 1-24 ч (Рисунок 16). Показано, что эстераза является устойчивой к влиянию этих растворителей, поскольку при инкубации в этих растворах она сохраняла свою активность в течение 24 ч. EstUT1 по сравнению с другими бактериальными эстеразами обладает высокой активностью в 30% метаноле - в течение 6 и 24 ч ее активность снизилась до 85,8 ± 2,4 и 36,0 ± 2,0% от первоначальной, соответственно. Напротив, термостабильная эстераза бактерии *Geobacillus* sp. JM6 сохраняла 79,6% остаточной активностипосле инкубации в течение 30 мин при 37 °C в 30% метаноле [207], что говорит о высокой устойчивости исследуемой в работе estUT1 к влиянию органичеких растворителей.

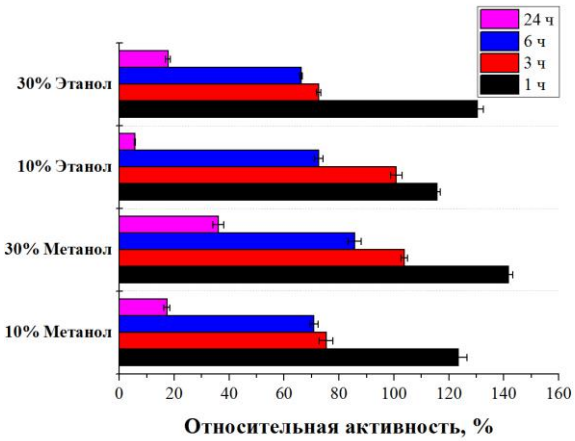

Рисунок 16 – Влияние метанола и этанола на активность estUT1. Фермент инкубировали в течение 24 ч в присутствии метанола и этанола в концентрациях 10 и 30% (об.%). Остаточную активность измеряли с *p*NPC4 в качестве субстрата. Активность эстеразы без добавления растворителей была принята как контрольное значение

Кинетические параметры estUT1

Кинетические параметры (Таблица 12) estUT1 измеряли с использованием *p*NPC2, *p*NPC4 и *p*NPC8 в качестве субстратов (Рисунок 17). Для всех исследуемых субстратов зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата подчиняется классическим закономерностям и соотвествует уравнению (1). Как можно заметить, насыщение реакции эстеразы короткоцепочечными субстратами (C_2>C_4>C_8) достигается при меньших концентрациях, что позволяет сделать вывод о том, что сродство фермента estUT1 к таким субстратам выше, чем к субстратам со средним и длиным жирнокислотным остатком. Это также подтверждается полученными данными о кинетических харакетристиках эстеразы: estUT1 наиболее эффективно гидролизует *p*NPC2 и при этом имеет наименьшее значение K_M 0,098 ± 0,013 мМ. Каталитическая эффективность фермента также была наибольшей при использовании *p*NPC2, k_{cat}/K_M составила 265,62 ± 24,16 $с^{-1}×мМ^{-1}$. Таким образом, estUT1, как и большинство эстераз [57, 211], предпочтительно гидролизует субстраты с коротким ацильным остатком (C_2).

Таблица 12 – 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

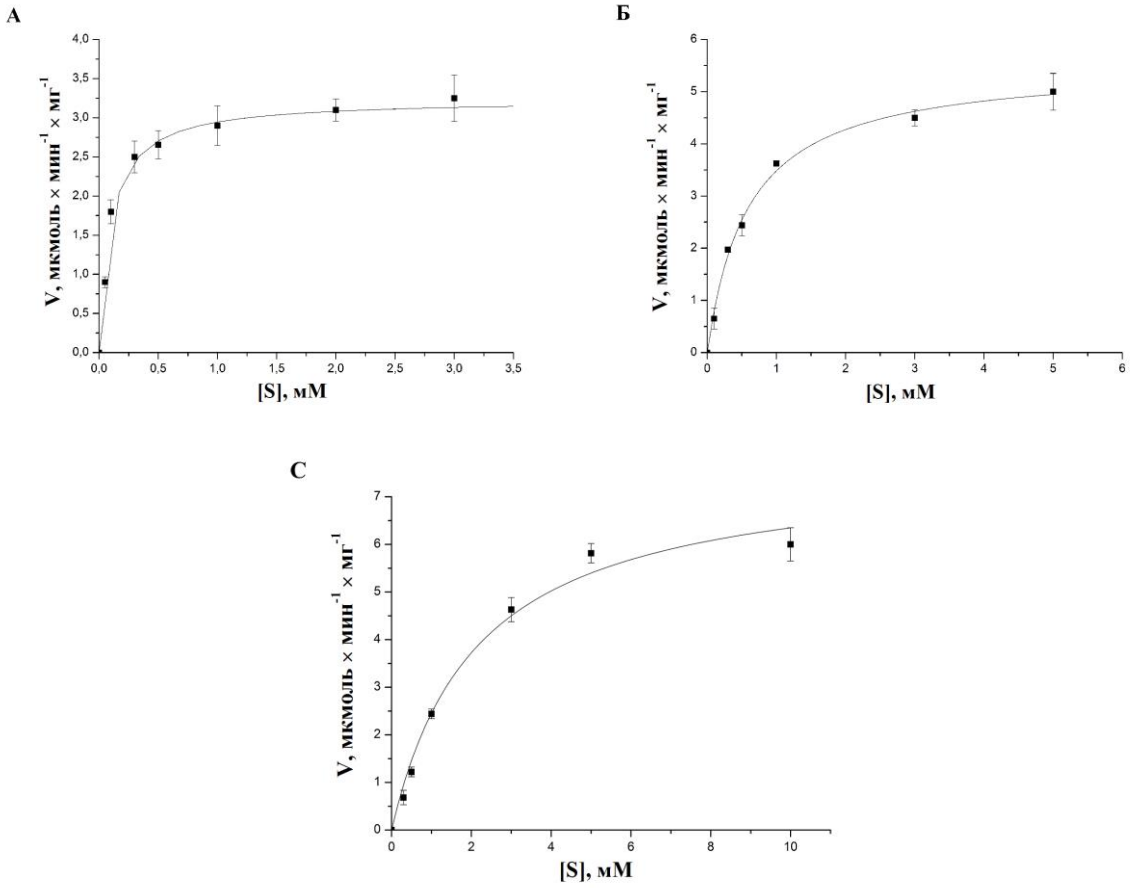

Рисунок 17 – Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза под действием эстеразы estUT1 от концентрации субстрата: (A) *p*NPC2, (B) *p*NPC4 и (C) *p*NPC8

3.3 Исследование влияния коэкспрессии с шаперонами *E. coli* на продукцию эстеразы estUT1

Ранее было показано, что эстераза estUT1 преимущественно продуцируется в клетках *E. coli* в виде телец включения. Для увеличения продукции белка в растворимой форме применяются разные подходы, включающие: подбор оптимальных по силе промоторов для регулирования уровня экспрессии гена, выбор оптимального штамма-продуцента, снижение температуры в процессе индукции биосинтеза белка, а также коэкспрессия белка с белками шаперонами, позволяющая значительно повысить долю растворимой фракции целевого белка [212].

В данной работе для увеличения продукции эстеразы estUT1 в растворимой форме была проведена ее коэкспрессия с шаперонами *E coli* (данные приведены в работе [213]). Известно, что система шаперонов, относящихся к DnaK (DnaK вместе с кошаперонами DnaJ и GrpE, вместе

составляющие систему KJE) снижает агрегацию и стимулирует протеолиз неправильно свернутых белков [214]. Би-шаперонная система, состоящая из KJE и ClpB, способствует растворению и дезагрегации белков [215, 216]. Система шаперонинов GroEL (GroEL вместе с кошаперонином GroES, ELS) способствует переходу белка из нерастворимой фракции в растворимую [212]. Поэтому в данной работе для изучения влияния шаперонов *E coli* на экспрессию estUT1 использовалась комбинация шаперонов KJE, ClpB и ELS, как одна из наиболее эффективных систем фолдинга. Ранее было показано, что такая комбинация шаперонов увеличила выход растворимой фракции некоторых белков, экспрессированных в *E. coli*, в 2,5-3,5 раза [102].

Для изучения влияния выбранной комбинации шаперонов *E. coli* на продукцию эстеразы estUT1, у индуцированных ИПТГ клеток-продуцентов (без и с коэкспрессией шаперонов) были выделены растворимая (супернатант клеточного лизата после отделения осадка) и нераствормая (тельца включения) фракции. Как показано на Рисунке 18 (дорожка 4), совместная экспрессия эстеразы с системой шаперонов KJE, ClpB и ELS привела к увеличению выхода целевого белка в растворимой фракции клеточного лизата по сравнению с клетками без шаперонов, где

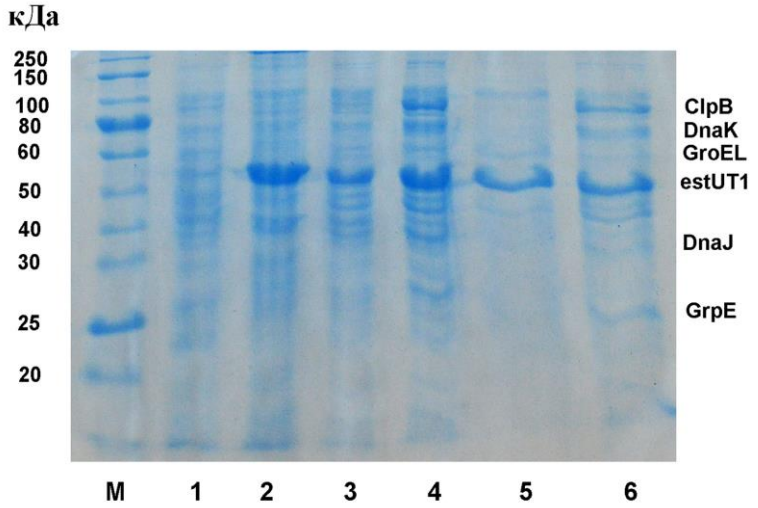

Рисунок 18 – Коэкпрессия эстеразы estUT1 с шаперонами *E coli*. М – маркер молекулярного веса белков; 1 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b(+); 2 – нерастворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1; 3 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1; 4 – растворимая фракция белка из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pET32b-UT1 и плазмидами с шаперонами; 5 – очищенная с помощью аффинной хроматографии эстераза estUT1; 6 – очищенная с помощью аффинной хроматографии эстераза, полученная коэкспрессией с шаперонами

наблюдалось образование телец включения (Рисунок 18, дорожка 2). Коэкспрессия с шаперонами увеличила удельную активность эстеразы в растворимой фракции с 22,6 ± 1,7 до 200,7 ± 15,5 ЕА×мг$^{-1}$ белка, что коррелирует с литературными данными. Например, коэкспрессия в *E. coli* шаперонов KJE и ELS с липазой бактерии *Psychrobacter* sp. привела к увеличению ее удельной активности с 66,51 ± 3,84 до 108,77 ± 4,62 ЕА×мг$^{-1}$ [105]. Таким образом, в данной работе показано положительное влияние системы шаперонов KJE, ClpB, ELS на продукцию эстеразы estUT1 в растворимой фракции клеточного белка, что отчасти позволяет упростить и удешевить процесс выделения этого фермента.

Таким образом, в данной работе было описано новое семейство бактериальных липолитических ферментов XVIII. Была получена и исследована рекомбинантная эстераза estUT1, выделенная из бактерии *U. thermosphaericus*, которая является первым охарактеризованным представителем этого семейства. Эстераза estUT1 отличается высокой термостабильностью и устойчивостью к влиянию органических растворителей, что делает данный фермент перспективным для использования в составе биокатализаторов для процессов, протекающих в ингибирующих условиях, в том числе в условиях высокой температуры и в присутствии органических растворителей. Применение коэкспрессии с шаперонами *E coli* KJE, ClpB и ELS позволило значительно увеличить активность estUT1 в растворимой фракции клеточного белка, тем самым расширив возможности его применения в составе биокатализаторов.

3.4 Характеристика ферментов, использованных в данной работе, и обоснование их применения в составе биокатализаторов для различных биотехнологических процессов

Для обоснования способов применения новых липолитических ферментов в иммобилизованном виде в различных биотехнологических процессах были использованы два фермента: полученная в ходе данной работы рекомбинантная термостабильная эстераза estUT1 из бактерии *U. thermosphaericus* UT1, экспрессированная в *E. coli*, и термостабильная липаза бактерии *G. stearothermophilus* G3, продуцируемая штаммом *E. coli* B-1298, предоставленным ФИЦ ИЦИГ СО РАН для исследований [174].

Ранее было проведено исследование свойств двух липолитических ферментов (Таблица 13). Оба фермента обладают высокой термостабильностью (свыше 50 °C), однако различаются по стабильности при длительной инкубации при этой температуре. Например, для эстеразы estUT1 время полуинактивации при температуре 60 °C составляет около 15 ч, что является

показателем ее высокой термостабильности. Кроме того, для эстеразы estUT1 показано, что на ее активность сильно влияют такие вещества как $CuSO_4$, $MgSO_4$,ФМСФ и ПАВ (Твин 20, Твин 80 и Тритон X-100), что стоит учитывать при ее применении в составе биокатализаторов в биотехнологических процессах.

Таблица 13 – Свойства ферментов, использованных в работе

Свойство		**Рекомбинантный фермент**	
		Эстераза estUT1 из бактерии *U. thermosphaericus* UT1	Внеклеточная липаза G3 из бактерии *G. stearothermophilus* G3 [174]
Способ получения		Экспрессия в *E. coli* BL21(DE3) в составе вектора pET32b(+) как химерного белка (TrxA-estUT1)	Экспрессия в *E. coli* B-1298 в составе плазмиды pQS-G3 (с сигнальным пептидом OmpA)
Субстрат		*p*NPC2, *p*NPC4, *p*NPC8	*p*NPC16
Оптимум температуры, °C		70-80	50
Оптимум pH		8,0	8,0-9,0
Время полуинактивации ($t_{1/2}$)	**50 °C**	12 ч	145 мин
	60 °C	~ 15 ч	33 мин
Стабильность в 30% водных растворах органических растворителей (остаточная активность после инкубации)	**Метанол**	85,8 ± 2,4% (50 °C, 6 ч); 36,0 ± 2,0% (50 °C, 24 ч)	75% (45 °C, 1 ч); 58% (45 °C, 3 ч)
	Этанол	66,2 ± 0,5% (50 °C, 6 ч); 17,7 ± 0,9% (50 °C, 24 ч)	41% (45 °C, 1 ч); 29% (45 °C, 3 ч)

В целом, липаза G3 является менее стабильной при 50 °C и в присутствии растворителей (30% метанола и этанола). G3 также обладает более низким температурным оптимумом (50 °C против 80 °C у эстеразы estUT1). При этом липаза G3 обладает способностью к гидролизу длинноцепочечных эфиров жирных кислот (*p*NPC16) в отличие от эстеразы estUT1, которая гидролизует сложные эфиры с длиной ацильного остатка менее C_8.

Таким образом, эстеразу estUT1 из бактерии *U. thermosphaericus* UT1 предпочтительнее использовать для гидролиза короткоцепочечных эфиров жирных кислот. В частности, в данной работе для этого было предложено применить эту эстеразу в реакции гидролиза инсектицида малатиона с целью прямой очистки стерилизованных муниципальных сточных вод. Из применяемых в настоящее время для иммобилизации ферментов подходов (в том числе адсорбцию, включение в гель, ковалентное связывание и ковалентную сшивку [113]) наиболее перспективным представляется использование метода поперечной сшивки агрегатов белков. Приготовление биокатализатора подобным образом проводится с минимальным количеством

стадий и не требует использования материала-носителя [217], что позволяет значительно снизить его стоимость, что особенно актуально для его применения с целью переработки отходов.

Способность к гидролизу длинноцепочечных эфиров жирных кислот позволяет использовать липазу G3 в составе биокатализаторов для переработки липидов растительного происхождения, содержащих длинноцепочечные жирные кислоты, в реакции метанолиза (для получения метиловых эфиров жирных кислот как компонентов биодизельного топлива) и переэтерификации растительных масел (для получения модифицированных жиров с контролируемыми свойствами) [218]. Рекомбинантные липазы бактерий р. *Geobacillus* имеют близкий к коммерческим ферментам температурный оптимум (например, для липазы из *Geobacillus* sp. ARM он составляет 50 °C [219]). Однако их свойства пока что мало изучены в составе биокатализаторов для применения реакциях метанолиза и переэтерификации масел, в отличие от биокатализаторов на основе микроорганизмов *R. miehei*, *T. lanuginosus*, *P. antarctica* (*C. antarctica*) и *C. rugosa* [220]. Для получения биокатализаторов на основе липаз бактерий р. *Geobacillus* ранее был использован метод адсорбции на силикагеле [221], микропористом полиэтилене [222], глиоксил агарозе [166], частицах полигидрокисбутирата [223], но не метод ковалентной иммобилизации на мезопористом силикагеле. Кроме того, липазы, полученные из бактерий р. *Geobacillus,* ранее не применялись для получения модифицированных жиров путем ФП масел.

3.5 Иммобилизация липолитических ферментов и их применение в процессах очистки муниципальных сточных вод, а также получения биодизельного топлива и модифицированных жиров

3.5.1 Применение рекомбинантной иммобилизованной эстеразы estUT1 в реакции биокаталитического гидролиза малатиона в стерилизованных муниципальных сточных водах

3.5.1.1 Приготовление биокатализатора CLEA-estUT1 на основе эстеразы estUT1

Для пригтовления биокатализатора (CLEA-estUT1) на основе эстеразы estUT1 был использован метод ПСФА (данные приведены в работе [213]), поскольку он позволяет получать высокоактивный белок в иммобилизованном виде. Для иммобилизации был использован белок с активностью 200,7 ± 15,5 ЕА×мг$^{-1}$ белка, полученный путем коэкспрессии эстеразы estUT1 с комбинацией шаперонов *E. coli* (согласно пункту 3.3), поскольку он обладал большей активностью в растворимой фракции по сравнению с экспрессией без шаперонов. Высокая

активность этой фракции клеточного лизата позволила избежать необходимости использования процесса растворения-рефолдинга телец включения, преимущественно образующихся при биосинтезе этого фермента в *E. coli* BL21(DE3), что значительно упростило процесс приготовления биокатализатора.

Выбор осадителя

Для оптимизации условий иммобилизации эстеразы estUT1 в первую очередь изучали влияние различных осадителей на степень иммобилизации белка. В качестве осадителей использовали ацетон, *трет*-бутанол, изопропанол, этанол и сульфат аммония (50%, вес./об.) в соотношении осадитель : фермент 3:1 (об./об.), результаты представлены в Таблице 14. Сульфат аммония является одним из наиболее часто применяемых осадителей при приготовлении ПСФА из различных ферментов, включая липазы [224], эстеразы [225], амилазы [226], протеазы [227]. В данной работе наибольшую степень иммобилизации показал биокатализатор, полученный путем осаждения сульфатом аммония, поэтому он и был использован в качестве осадителя для дальнейших исследований при приготовлении биокатализтора CLEA-estUT1.

Таблица 14 – Влияние различных осадителей на активность CLEA-estUT1

Тип осадителя	***ImD*, %**
Ацетон	30,3 ± 2,8
трет-Бутанол	34,5 ± 4,7
Изопропанол	8,7 ± 1,1
Этанол	6,2 ± 0,4
Сульфат аммония (50%, вес./об.)	58,4 ± 4,1

Условия приготовления: 0,5 мл раствора фермента (1 мг×мл$^{-1}$), соотношение осадитель : фермент 3:1 (об./об.), 75 мМ глутаровый альдегид, время иммобилизации 4 ч.

Выбор добавки

В данной работе было исследовано влияние двух различных добавок на активность CLEA-estUT1: БСА в качестве белкового ко-фидера [228] и SDS в качестве поверхностно-активного вещества, которое облегчает осаждение агрегатов в стабильной конформации и увеличивает межфазную поверхность фермента [229]. Активность биокатализатора, полученного без использования добавок, была принята за 100% (Таблица 15).

Показано, что наибольшее влияние на активность биокатализатора оказывал БСА, при его использовании активность полученного биокатализатора составила 154,2 ± 16,5% от контрольного значения (100,00 ± 4,7%). Такое увеличение активности объясняется наличием свободных аминогрупп аминокислот, таких как лизин, присутствующих в структуре БСА, которые взаимодействуют с глутаровым альдегидом, тем самым предотвращая денатурацию целевого белка [230]. SDS оказывает небольшое положительное влияние на активность полученного бикатализатора CLEA-estUT1 (109,7 ± 8,4%). В соответствии с полученными

результатами, БСА был выбран в качестве наиболее эффективной добавки для приготовления биокатализатора CLEA-estUT1.

Таблица 15 – Влияние добавок на активность CLEA-estUT1

Добавки	**Относительная активность, %**
Контроль*	100 ± 4,7
БСА	154,2 ± 16,5
SDS	109,7 ± 8,4

*Активность биокатализатора, полученного без добавок, была принята за 100%.
Условия приготовления: 0,5 мл раствора фермента (1 мг×мл$^{-1}$), 60% (вес./об.) сульфат аммония, 75 мМ глутаровый альдегид, время иммобилизации 4 ч.

Оптимизация условий приготовления CLEA-estUT1

В данной работе для уточнения оптимальных условий иммобилизации estUT1 путем поперечной сшивки с использованием метода отклика поверхности была разработана модель, описывающая этот процесс. Гранецентрированное центрально-композиционное планирование (FCCCD) состояло из 30 экспериментов (Таблица 16) и обеспечило достаточный объем данных для получения полиномиальной модели второго порядка для поверхности отклика. В качестве изменяемых параметров использовались: время иммобилизации, концентрации сульфата аммония, глутарового альдегида и БСА. Как показано в Таблице 16, наибольшая степень иммобилизации эстеразы была равна 85,4% в эксперименте №7, в следующих условиях: время иммобилизации 4,5 ч, концентрация сульфата аммония 55 % (вес./об.), глутарового альдегида 87,5 мМ и БСА 0,2 мМ.

В результате обработки экспериментальных данных были определены коэффициенты уравнения полной регрессионной модели и их статистическая значимость. По результатам регрессионного анализа была разработана полиномиальная модель второго порядка, представленная следующим уравнением:

$$ImD\ (\text{CLEA-estUT1}) = 66.18 + 4.74A + 6.70B + 7.78C + 13.84D + 3.28AB + 2.12AC + 0.50AD + 0.45BC + 1.13BD - 0.47CD - 23.67A^2 - 10.69B^2 - 7.42C^2 + 7.32D^2, \quad (10)$$

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

Для определения качества модели, используемой для оптимизации параметров приготовления CLEA-estUT1, был применен дисперсионный анализ переменных (ANOVA), результаты которого представлены в Таблице 17. Коэффициент корреляции R^2 для полученной модели составил 0,97, что свидетельствует о том, что установленная квадратичная модель объясняет более 97% дисперсии в экспериментальных данных. Значения *F*- фактора 33,36 и *p*

Таблица 16 – Матрица экспериментов гранецентрированного центрально-композиционного планирования для оптимизации условий приготовления CLEA-estUT1

Эксперимент	**Время, ч**	**Сульфат аммония, % (вес./об.)**	**Глутаровый альдегид, мМ**	**БСА, мМ**	***ImD*, %**
1	4,5	55	25	0,105	45,1
2	1	80	25	0,2	42,0
3	8	30	25	0,01	7,5
4	4,5	55	87,5	0,105	72,4
5	1	80	25	0,01	9,7
6	4,5	55	87,5	0,105	71,4
7	4,5	55	87,5	0,2	85,4
8	8	80	25	0,01	19,8
9	1	30	150	0,01	21,8
10	4,5	55	87,5	0,105	74,1
11	1	30	150	0,2	38,7
12	1	80	150	0,2	50,4
13	4,5	55	87,5	0,105	65,1
14	8	55	87,5	0,105	40,4
15	1	30	25	0,2	29,6
16	1	80	150	0,01	18,9
17	4,5	30	87,5	0,105	43,2
18	4,5	80	87,5	0,105	60,3
19	8	30	150	0,01	18,2
20	8	80	150	0,01	47,2
21	1	30	25	0,01	5,3
22	4,5	55	87,5	0,105	65,7
23	8	30	25	0,2	32,1
24	1	55	87,5	0,105	37,2
25	4,5	55	87,5	0,01	54,2
26	8	30	150	0,2	52,4
27	4,5	55	87,5	0,105	70,6
28	8	80	25	0,2	51,3
29	8	80	150	0,2	70,0
30	4,5	55	150	0,105	65,0

<0,0001 этой модели показывают, что модель является статистически значимой. Согласно Li et al. [231], значение *p* менее 0,05 указывает на то, что условие считается значимым, а более 0,10 – незначимым. Основываясь на *p*-значениях, представленных в Таблице 17, 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 немного меньший эффект на степень иммобилизации CLEA-estUT1.

Уравнение регрессии (10), применяемое для описания взаимодействия между переменными и определения оптимального значения каждого фактора для максимизации степени иммобилизации estUT1, представлено графиками трехмерной поверхности (Рисунок 19).

Таблица 17 – ANOVA анализ статистической значимости модели, описываемой уравнением (10)

Параметр	**Сумма квадратов**	***F*-значение**	***p*-значение**
Модель	13771,01	33,36	<0,0001
Время, A	403,56	13,69	0,0021
Сульфат аммония, B	808,96	27,44	0,0001
Глутаровый альдегид, C	1090,45	36,98	<0,0001
БСА, D	3449,76	117,00	<0,0001
AB	172,27	5,84	0,0288
AC	71,83	2,44	0,1394
AD	4,00	0,14	0,7178
BC	3,28	0,11	0,7435
BD	20,48	0,69	0,4177
CD	3,59	0,12	0,7319
A^2	1451,57	49,23	<0,0001
B^2	296,06	10,04	0,0064
C^2	142,83	4,84	0,0438
D^2	138,84	4,71	0,0465
Отсутствие соответствия	375,04	2,79	0,1345

Каждый график поверхности показывает зависимость степени иммобилизации от двух независимых факторов при фиксированном в центральной точке значении для остальных факторов.

Время иммобилизации является важным параметром при приготовлении биокатализаторов методом поперечной сшивки и для различных ферментов может изменяться от 1 до 20 ч [232, 233]. В данной работе для иммобилизации был выбран диапазон 1-8 ч. На Рисунке 19А, Б, В показано влияние времени на степень иммобилизации в зависимости от концентрации сульфата аммония, глутарового альдегида и БСА, соответственно. Наибольшая *ImD* наблюдалась при 4,5-5,5 ч реакции.

Количество осадителя (в данном случае, сульфата аммония) играет важную роль при приготовлении катализаторов методом ПСФА. Количество сульфата аммония также влияет на размер агрегатов, образующихся из белка в процессе осаждения. Показано, что низкая концентрация осадителя является недостаточной для эффективного образования агрегатов белка, а высокая концентрация может ингибировать активность фермента [224]. Согласно полученной модели большая часть белка осаждается из раствора 60-70% насыщении сульфатом аммония (Рисунок 19А, Г, Д). Такая концентрация сульфата аммония широко применяется при приготовлении ПСФА-катализаторов из гидролитических ферментов. Так, например, 70%

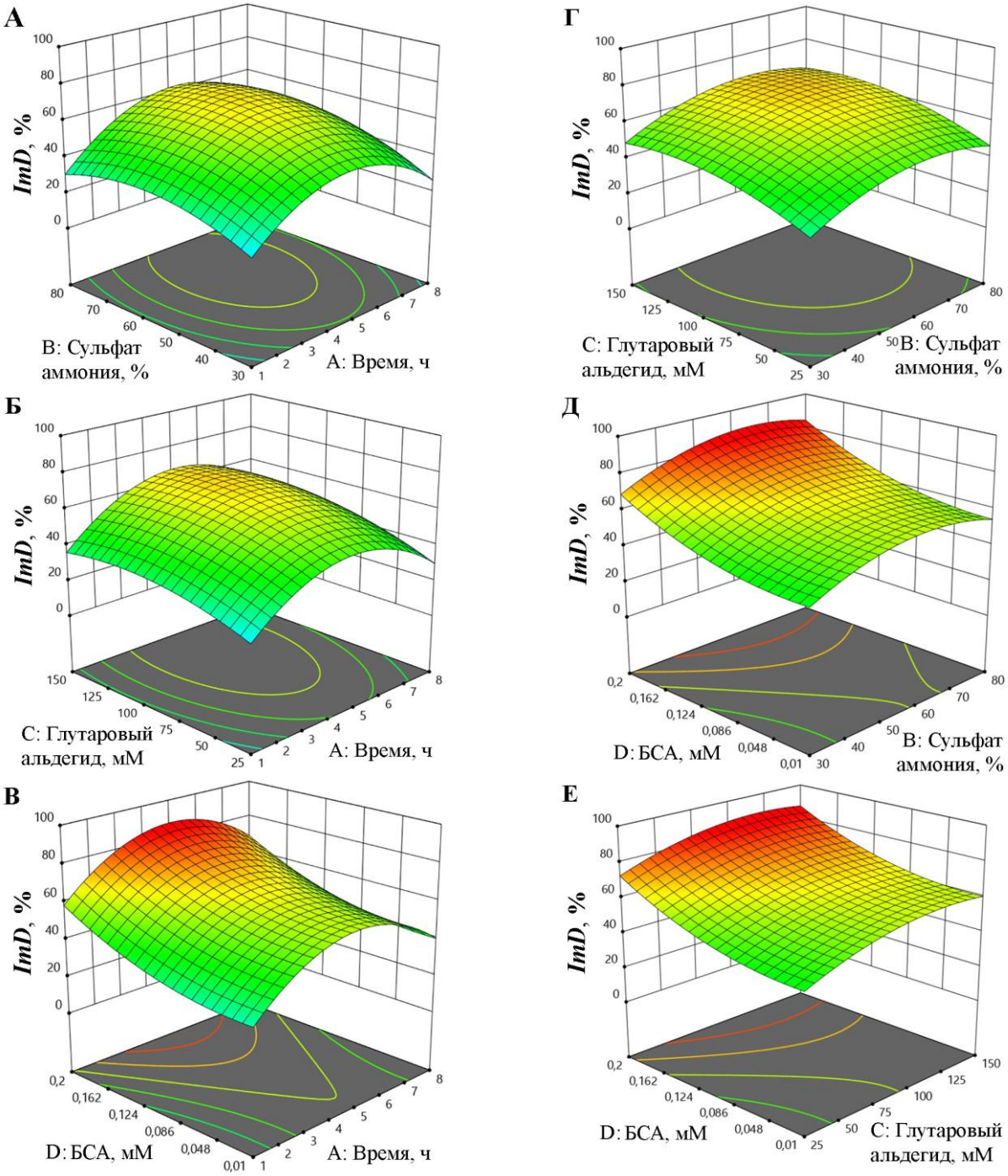

Рисунок 19 – Графики поверхностей отклика независимых переменных: (А) концентрация сульфата аммония и время иммобилизации; (Б) Концентрация глутарового альдегида и время иммобилизации; (В) концентрация БСА и время иммобилизации; (Г) концентрация глутарового альдегида и сульфата аммония; (Д) концентрация БСА и сульфата аммония; (Е) концентрация БСА и глутарового альдегида, на прогнозируемую степень иммобилизации CLEA-estUT1

насыщение сульфатом аммония используется для приготовления биокатализаторов методом поперечной сшивки из липазы M37 *Photobacterium lipolyticum* [232] и α-амилазы *B. amyloliquefaciens* [234].

Концентрация глутарового альдегида оказывает сильное влияние на активность полученного биокатализатора. Если используется недостаточное количество сшивающего агента, молекула фермента может оставаться гибкой и нестабильной, что приводит к выходу фермента в водный раствор. Слишком большое количество глутарового альдегида может привести к потере минимальной гибкости молекулы фермента вследствие образования плотноупакованных агрегатов белка с сильным диффузионным сопротивлением [228]. Поэтому следует оптимизировать концентрацию глутарового альдегида при приготовлении ПСФА-катализатора. Из Рисунка 19Б,Г,Е видно, что при использовании 115-125 мМ глутарового альдегида наблюдалась наибольшая активность полученных биокатализаторов. Обычно для приготовления биокатализаторов методом ПСФА используют 60-90 мМ глутаровый альдегид (75 мМ для иммобилизации липазы *Rhizopus oryzae* [233], 60 мМ для иммобилизации эстеразы *B. subtilis* [225]). Однако в некоторых случаях для приготовления биокатализаторов методом поперечной сшивки также используются и более высокие концентрации глутарового альдегида. Например, в работе [235] применяли 140 мМ глутаровый альдегид для иммобилизации каталазы, выделенной из бычьей печени.

В данной работе дополнительно оценивали влияние концентрации БСА (как добавочного агента) на активность полученного катализатора CLEA-estUT1. На Рисунке 19В,Д,Е представлено исследование влияния концентрации БСА на степень иммобилизации в зависимости от времени, концентрации сульфата аммония и глутарового альдегида, соответственно. Из представленных данных видно, что в исследуемом диапазоне концентрации БСА (0,01-0,2 мМ) эта зависимость является практически линейной, и наибольшее значение *ImD* достигается при концентрации БСА 0,2 мМ. В целом, концентрация БСА 0,1-0,2 мМ является широко применимой для приготовления биокатализаторов методом поперечной сшивки агрегатов ферментов. В работе [224] для приготовления ПСФА из липазы, выделенной из стручков какао, использовали 0,17 мМ БСА в качестве ко-фидера.

Таким образом, с помощью полученной модели были определены оптимальные условия приготовления биокатализатора CLEA-estUT1: время иммобилизации 5,1 ч, концентрация сульфата аммония, глутарового альдегида и БСА 65,1% (вес./об.), 120,6 и 0,2 мМ, соответственно. Удельная активность полученного биокатализатора составила 29,4 ± 0,5 ЕА $\times мг^{-1}$.

Модель, полученная в данном исследовании, была протестирована путем проведения контрольного эксперимента в оптимальных условиях. Как показано в Таблице 18, предсказанное значение степени иммобилизации с использованием разработанной статистической модели (Уравнение 10) в оптимальных условиях, равное 91,3%, хорошо согласуется с полученным экспериментальным значением. Таким образом, разработанная модель с использованием FCCCD показала высокую корреляцию с экспериментальными данными и может рассматриваться как

надежная и точная модель для описания условий приготовления биокатализатора на основе эстеразы estUT1 методом поперечной сшивки.

Таблица 18 – Экспериментальное тестирование полученной статистической модели (описываемой уравнением 10) в оптимальных условиях

Время, ч	**Сульфат аммония, % (вес./об.)**	**Глутаровый альдегид, мМ**	**БСА, мМ**	***ImD*, %**	
				Экспериментальное значение	**Теоретическое значение**
5,1	65,1	120,6	0,2	90,6 ± 2,7	91,3

3.5.1.2 Исследование свойств биокатализатора CLEA-estUT1

Влияние pH на активность и стабильность CLEA-estUT1

Для оценки применимости разработанного биокатализатора CLEA-estUT1 в различных условиях (в том числе, при различных температурах, pH, в присутствии различных веществ) и оценки влияния иммобилизаци на свойства фермента, в данной работе был проведен анализ стабильности свободной (без иммобилизации) и иммобилизованной эстеразы estUT1. Первоначально была исследована активность свободной и иммобилизованной эстеразы в диапазоне pH 5,0-10,0. Из представленных данных (Рисунок 20А) видно, что оптимум активности, как свободной, так и иммобилизованной estUT1 наблюдался при pH 8,0, однако для

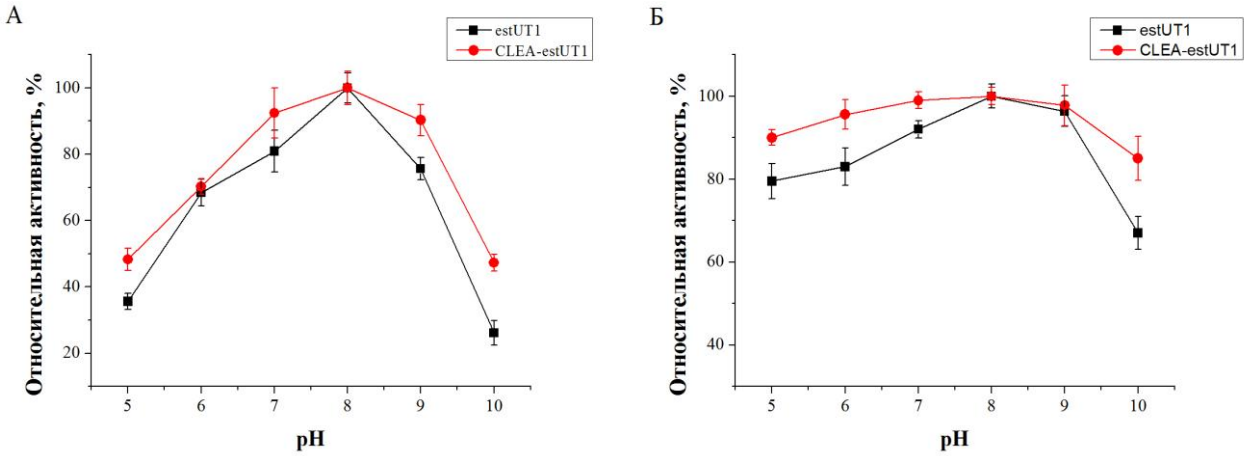

Рисунок 20 – Влияние pH на активность (А) и стабильность (Б) свободной и иммобилизованной estUT1. (А) Активность измеряли с *p*NPC2 в качестве субстрата в буферах с различными pH. Активность в Tris-HCl pH 8,0 была принята за 100%. (Б) pH-стабильность определяли в буферах с различным pH через 1 ч инкубации. Остаточную активность измеряли с *p*NPC2 в качестве субстрата. Активность до прогрева была принята за 100%

CLEA-estUT1 была отмечена повышенная по сравнению со свободным ферментом активность при pH 5,0-10,0. В целом, иммобилизация методом поперечной сшивки также увеличила стабильность эстеразы во всем диапазоне исследованных значений pH (Рисунок 20Б), что объясняется повышенной жесткостью структуры фермента вследствие образования ковалентных сшивок между агрегатами белка [236].

Влияние температуры на активность estUT1

Как показано на Рисунке 21 иммобилизация не оказывала влияния на температурный оптимум эстеразы estUT1, который составил 70-80 °C. Однако, по сравнению с неиммобилизованной эстеразой, биокатализатор CLEA-estUT1 отличался более высокой активностью в исследованном диапазоне температур (30-90 °C).

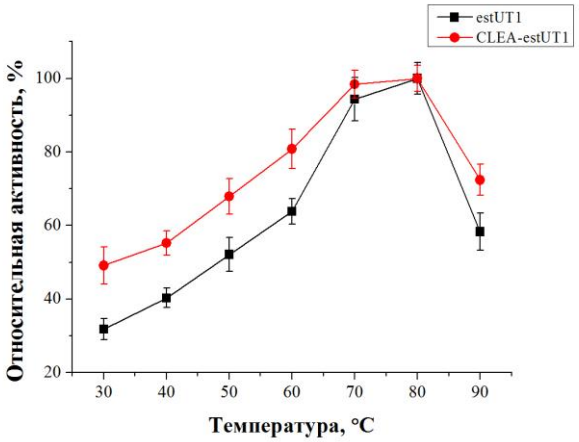

Рисунок 21 – Влияние температуры на активность свободной и иммобилизованной estUT1. Активность estUT1 и CLEA-estUT1 при 30-90 °C измеряли с использованием *p*NPC2 в качестве субстрата. Активность при 80 °C была принята за 100%

Сравнение значений констант скорости инактивации и времен полуинактивации (Таблица 19) показывает, что термостабильность estUT1 значительно возросла после иммобилизации (Рисунок 22), поскольку значение $t_{1/2}$ для иммобилизованной эстеразы при 50 и 60 °C увеличилось в 1,9 и 1,5 раз, соответственно, Увеличение термостабильности фермента после образования ПСФА объясняется возникновением дополнительных ковалентных взаимодействий, которые

Таблица 19 – Сравнение констант скорости инактивации (k_i) и времен полуинативации ($t_{1/2}$) для свободной и иммобилизованной estUT1 при 50-80 °C

Температура, °C	**k_i, ч$^{-1}$**		**$t_{1/2}$, ч**	
	estUT1	**CLEA-estUT1**	**estUT1**	**CLEA-estUT1**
50	$4{,}3 \times 10^{-2}$	$2{,}2 \times 10^{-2}$	16,1	31,3
60	$4{,}5 \times 10^{-2}$	$3{,}1 \times 10^{-2}$	15,4	22,5
70	$6{,}0 \times 10^{-2}$	$4{,}7 \times 10^{-2}$	11,5	14,8
80	$22{,}7 \times 10^{-2}$	$16{,}5 \times 10^{-2}$	3,1	4,2

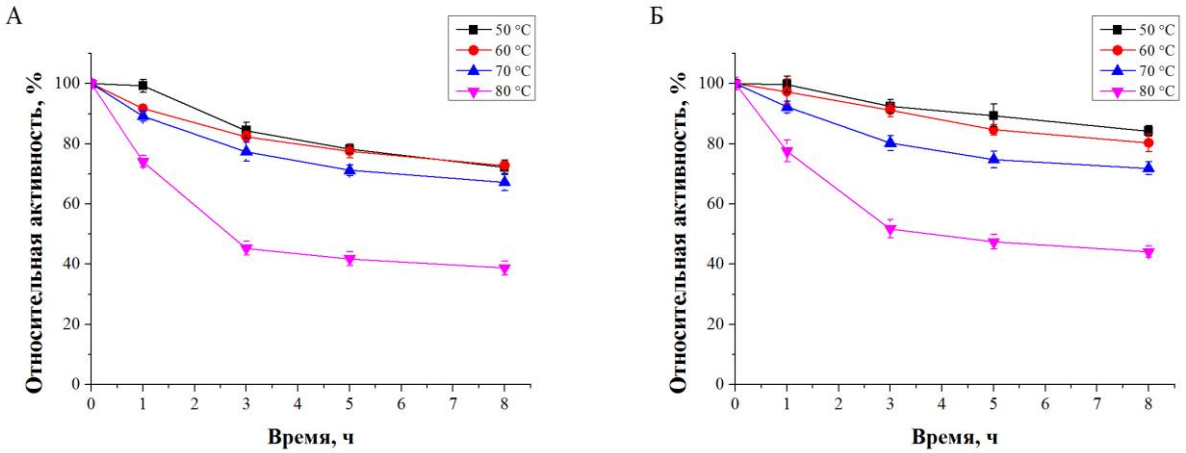

Рисунок 22 – Исследование термостабильности свободной (А) и иммобилизованной (Б) estUT1 при температурах 50-80 °C. Термостабильность определяли путем инкубации при 50-80 °C в течение 8 ч. Остаточную активность измеряли с *p*NPC2 в качестве субстрата. Активность до инкубации была принята за 100%

предотвращают нарушение третичной и вторичной структуры фермента вследствие его денатурации при высоких температурах [236], что подтверждалось в работах [224, 227].

Влияние различных добавок на активность CLEA-estUT1

В работе также было исследовано влияние различных веществ (растворителей, ингибиторов и ПАВ) после инкубации в течение 1 ч при температуре 50 °C на активность свободной и иммобилизованной эстеразы estUT1 (Рисунок 23). Показано, что в иммобилизованном виде эстераза обладает большей устойчивостью по отношению ко всем исследуемым химическим веществам, что согласуется с литературными данными [237, 238].

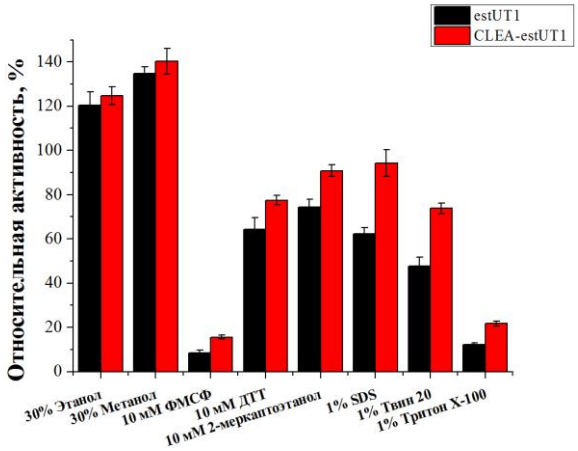

Рисунок 23 – Влияние различных добавок на активность свободной и иммобилизованной estUT1. EstUT1 и CLEA-estUT1 инкубировали в присутствии различных добавок в течение 1 ч. Остаточную активность измеряли с *p*NPC2 в качестве субстрата. Активность без добавления химических веществ была принята за 100%

Выявлено, что активность иммобилизованной эстеразы по сравнению с растворимой после инкубации с 10 мМ ФМСФ, ДТТ, 2-меркаптоэтанолом, 1% SDS и Твин 20 была больше в 1,9, 1,2, 1,2, 1,5 и 1,6 раз, соответственно. Таким образом, иммобилизация эстеразы estUT1 методом поперечной сшивки позволяет увеличивать устойчивость фермента к воздействию химических веществ разной природы, что значительно расширяет возможности ее применения.

Кинетические параметры CLEA-estUT1

Кинетические параметры свободной estUT1 и иммобилизованной CLEA-estUT1 были определены с использованием *p*NPC2, *p*NPC4, *p*NPC8 и малатиона в качестве субстратов (Рисунок 24). Среди использованных эфиров *n*-нитрофенола эстераза estUT1 наиболее эффективно гидролизует субстраты с короткой длиной алкильной цепи (C_2>C_4>C_8) – самое маленькое значение K_M было обнаружено при гидролизе *p*NPC2 (Таблица 20). Как можно заметить, после иммобилизации значение K_M для CLEA-estUT1 повысилось для всех исследуемых субстратов. Этот эффект объясняется конформационными изменениями в структуре фермента, вызванными иммобилизацией, что также может привести к снижению доступа субстрата в активный сайт фермента [228, 239]. Увеличение значения K_M для ПСФА по сравнению с растворимым ферментом также ранее отмечалось для протеаз [240], липаз [224] и

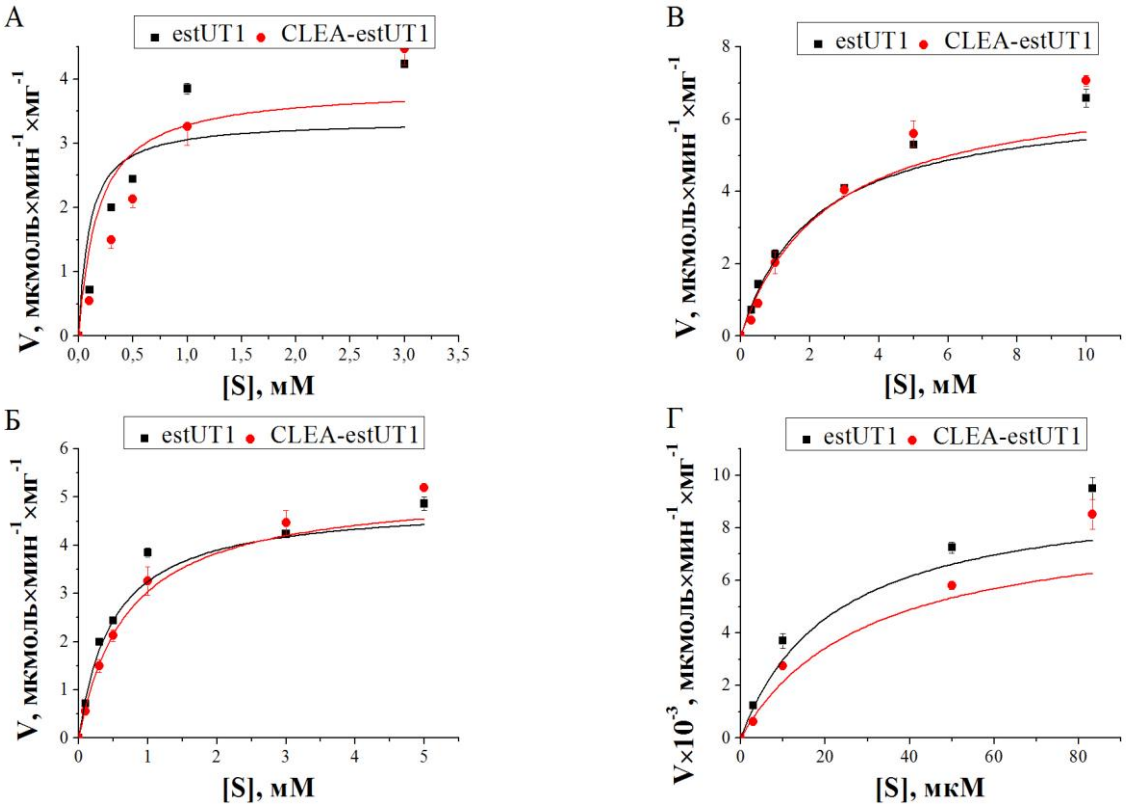

Рисунок 24 - Зависимость начальной скорости ферментативного гидролиза под действием свободной и иммобилизованной estUT1 от концентрации субстрата: (А) *p*NPC2, (В) *p*NPC4, (С) *p*NPC8 и (Д) малатиона

Таблица 20 – Сравнение кинетических параметров свободной и иммобилизованной estUT1. Активность 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) для 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

эстераз [225]. Каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) для CLEA-estUT1 была меньше, чем для свободного фермента, что согласуется с работами [224, 225]. Исследование кинетических параметров эстеразы выявило ее высокую каталитическую эффективность в отношении малатиона. Значение k_{cat}/K_M эстеразы estUT1 (835,5 ± 58,7 $с^{-1}\times мМ^{-1}$) было больше, чем у других гидролитических ферментов. Так, каталитическая эффективность органофосфорной гидролазы из *Flavobacterium* sp. составляет 154,91 $с^{-1}\times мМ^{-1}$ [241], а гидролазы из *A. niger* ZD11 – 55 $с^{-1}\times мМ^{-1}$ [187].

3.5.1.3 Применение CLEA-estUT1 в реакции гидролиза малатиона

Важным свойством биокатализатора для его эффективного практического применения является высокая операционная стабильность в течение многих циклов реакции. В данной работе исследовали операционную стабильность биокатализатора CLEA-estUT1, приготовленного в оптимальных условиях согласно разработанной модели (Таблица 18), в реакции гидролиза малатиона в реальных сточных водах с очистных сооружений г. Новосибирска (стерильная среда MWW) (Рисунок 25) [213]. Такой подход позволяет провести оценку потенциала применимости биокатализатора CLEA-estUT1 для очистки сточных вод от загрязнений на примере широко применяемого инсектицида, который при гидролизе теряет свою токсичность. Для исследования влияния реальных сточных вод на биокатализатор, операционная стабильность CLEA-estUT1 также оценивалась в референсных реакциях гидролиза малатиона в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0) и в стандартной синтетической среде, имитирующей бытовые сточные воды (OECD). Начальная концентрация малатиона во всех экспериментах составила 27,5 $мг\times л^{-1}$, а температура реакции 37

°C. Как видно из рисунка 25 в всех исследуемых средах наблюдалась высокая степень гидролиза малатиона: после первого цикла реакции *MHD* составила 99,4 ± 2,8, 99,2 ± 2,4 и 99,5 ±1,4% в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0), OECD и MWW, соответственно. Можно заметить, что в ходе эксперимента активность биокатализатора постепенно снижалась при использовании всех сред, сохраняя степень гидролиза малатиона малатиона свыше 55% после 25 циклов реакции (350 ч). Время полуинактивации CLEA-estUT1 в этих условиях составило 1155, 433 и 462 ч в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0), OECD и MWW, соответственно.

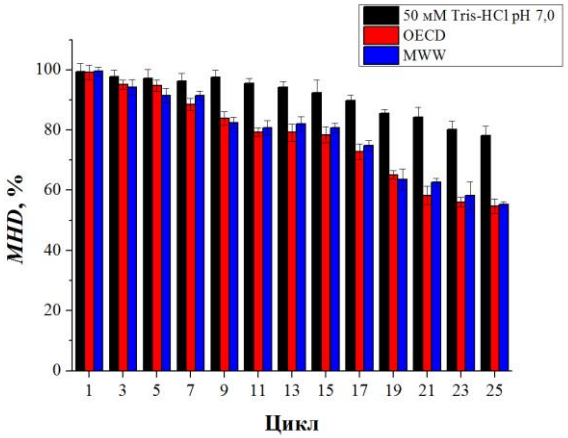

Рисунок 25 – Операционная стабильность CLEA-estUT1 в реакции гидролиза малатиона в различных средах в течение 25 циклов (1 цикл = 14 ч). Начальная концентрация малатиона 27,5 мг×л$^{-1}$, температура 37 °C

3.5.2 Применение рекомбинантной иммобилизованной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 для получения МЭЖК и переэтерифцированных масложировых смесей

3.5.2.1 Приготовление биокатализатора БКЛ на основе липазы G3

Для получения биокатализатора на основе рекомбинантной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 был использован метод ковалентной иммобилизации белка на силикагеле, который позволяет получать стабильные биокатализаторы благодаря образованию прочной связи между ферментом и носителем [120]. Кроме того, применение материала-носителя значительно повышает прочность гранул биокатализатора, что особенно важно для процессов, реализуемых в проточном режиме и связанных с высокой вязкостью среды (например, при использовании масел с высокой температурой плавления). Биокатализаторы, полученные таким способом, нашли широкое применение в различных биотехнологических процессах, в том числе в реакции

переэтерификации масел для получения МЭЖК и модифицированных пищевых жиров [111, 163], однако для липаз, полученных из бактерии *G. stearothermophilus* такой подход ранее не использовался.

Для приготовления биокатализатора БКЛ была использована фракция белка с удельной активностью 483,2 ЕА×г$^{-1}$, полученная из клеток продуцента *E. coli* B-1298 путем последовательного осаждения белка сульфатом аммония (п. 2,4) и его очистки с использованием диализа. После проведения иммобилизации степень иммобилизации биокатализатора БКЛ составила 8,7%, а удельная активность – 23,6 ЕА×г$^{-1}$ катализатора.

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

3.5.2.2.1 Исследование влияния различных факторов на выход МЭЖК

Растворитель

Применение липаз в реакции переэтерификации масел с метанолом для получения МЭЖК сопряжено с рядом проблем, одной из которых является инактивация ферментов под действием спиртов (метанола), а также из-за избытка продуктов реакции. Использование некоторых органических растворителей позволяет снизить концентрацию глицерина, который накапливается у поверхности биокатализатора, путем более эффективного разделения фаз [242]. В данной работе первоначально было исследовано влияние органических растворителей (ацетон, *н*-гексан и *трет*-бутанол) на $Y_{МЭЖК}$ в реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом в присутствии биокатализптора БКЛ (Таблица 21) [7].

Таблица 21 – Влияние различных растворителей на выход МЭЖК в реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом в присутствии биокатализатора БКЛ

Тип растворителя	**$Y_{МЭЖК}$, %**
Ацетон	0,0
н-Гексан	0,3
трет-Бутанол	4,9

Условия реакции: 2 г подсолнечного масла, мольное соотношение метанол : масло 3:1, 2,5% (вес./вес.) БКЛ, 5 мл органического растворителя, 40 °С, 24 ч.

Из представленных в Таблице 21 данных можно заметить, что использование ацетона и *н*-гексана в качестве растворителей ингибировало реакцию метанолиза, при их использрвании $Y_{МЭЖК}$ составил 0,0 и 0,3%, соответственно. В то же время применение *трет*-бутанола сдвигало реакцию в сторону переэтерификации, и $Y_{МЭЖК}$ составил 4,9%. *Трет*-бутанол является одним из

наиболее широко применияемых в реакции переэтерификации масел органических растворителей средней полярности, так при его применении снижается вязкость реакционной среды и увеличивается растворимость побочного продукта, которым является глицерин [243].

Количество биокатализатора

Для определения оптимального количества биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации масел, изменяли его содержание в реакционной среде от 0,25 до 20% (вес./вес.). Полученные данные (Рисунок 26) говорят о том, что количество биокатализатора в реакционной среде оказывает прямое влияние на выход МЭЖК, что может свидетельствовать об отсутствии диффузионных ограничений процесса переэтерификации с использованием БКЛ. Наибольший $Y_{МЭЖК}$ (36,9%) наблюдался с использованием биокатализатора в концентрации 20% (вес./вес.).

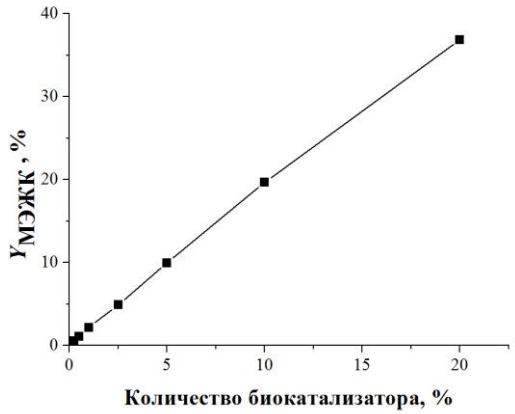

Рисунок 26 – Влияние количества биокатализатора БКЛ на эффективность образования МЭЖК в реакции переэтерификации подсолнечного масла (2 г) с метанолом в мольном соотношении 1:3 при добавлении 4 мл *трет*-бутанола и 4% (вес./вес.) воды при 40 °С в течение 24 ч

Температура

Температура является одним из главных параметров, влияющим на выход МЭЖК в реакции переэтерификации. При высоких температурах происходит снижение вязкости реакционной среды, что способствует увеличению скорости реакции. Однако, в то же время повышение температуры приводит к термической инактивации фермента [244]. Чтобы определить оптимальную температуру реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом в присутствии биокатализатора БКЛ использовали диапазон 30-60 °С. Из полученных результатов (Рисунок 27) можно сделать вывод о том, что липаза в составе биокатализатора БКЛ теряет свою активность при повышенных температурах (50-60 °С) в реакции переэтерификации. Максимальный $Y_{МЭЖК}$ (11,4%) наблюдался при 30 °С, а минимальный (2,4%) при 60 °С. Для дальнейшего исследования была выбрана температура процесса 40 °С (где $Y_{МЭЖК}$ составил

10,7%), поскольку в этих условиях не наблюдалось существенных различий в выходах МЭЖК между 30 и 40 °C, а использование температуры процесса равной 40 °C является предпочтительным вследствие снижения затрат на охлаждение реактора.

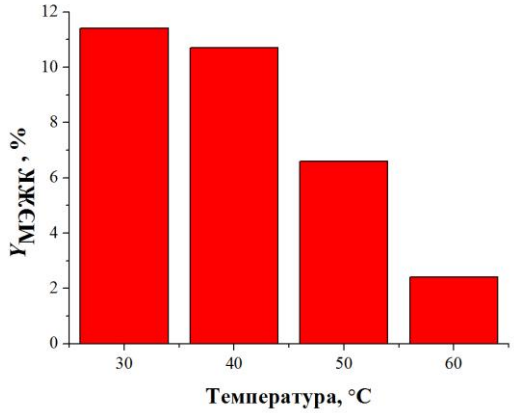

Рисунок 27 – Влияние температуры на выход МЭЖК в реакции переэтерификации подсолнечного масла (2 г) с метанолом в мольном соотношении 1:3 с использованием 5% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ при добавлении 4 мл *трет*-бутанола и 4% (вес./вес.) воды в течение 24 ч

Количество растворителя

Концентрация растворителя, в данном случае *трет*-бутанола, также является важным параметром, влияющим на выход МЭЖК в реакции ферментативной переэтерификации масел. Как видно из представленных данных (Рисунок 28), наибольший $Y_{МЭЖК}$ (13,7%) достигался в присутствии 4 мл *трет*-бутанола в качестве растворителя. Использование меньшего количества спирта (2 мл) является недостаточным, а дальнейшее увеличение количества *трет*-бутанола в

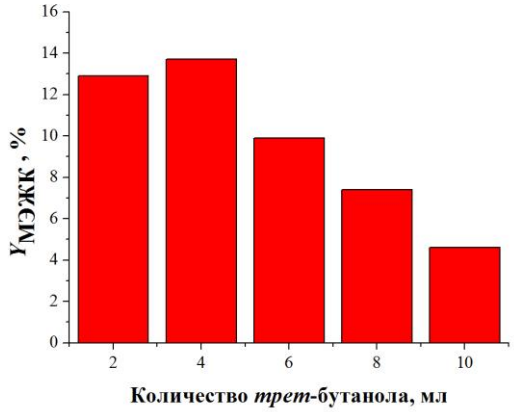

Рисунок 28 – Влияние количества *трет*-бутанола на выход МЭЖК в реакции переэтерификации подсолнечного масла (2 г) с метанолом в мольном соотношении 1:3 с использованием 5% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ при добавлении 4% (вес./вес.) воды при 40 °C и 24 ч

смеси (свыше 6 мл) сопровождается снижением выхода МЭЖК, вызванным разбавлением реагентов в реакционной системе [245].

Мольное соотношение метанол : масло

При оптимизации условий реакции переэтерификации для получения МЭЖК были использованы различные мольные соотношения метанол : масло (1:1 – 9:1). Выбор оптимального количества метанола в реакции переэтерификации масел очень важен, так как его недостаточное количество ведет к низкому выходу МЭЖК, а избыток может способствовать ингибированию липазы в составе биокатализатора.

Из результатов, представленных на Рисунке 29, видно, что при соотношении метанол : масло от 3:1 до 6:1 $Y_{МЭЖК}$ остается постоянным и составляет 11,3 и 11,7% соответственно. Однако, увеличение концентрации метанола в реакционной среде (при мольном соотношении метанол : масло 9:1) привело к ингибированию активности иммобилизованной липазы в составе катализатора, так как $Y_{МЭЖК}$ составил 2,1%. Таким образом, биокатализатор БКЛ на основе липазы *G. stearothermophillus* G3 оказался стабильным при использовании в широком диапазоне концентраций метанола (вплоть до мольного соотношения метанол : масло 6:1), а для дальнейших исследований было выбрано мольное соотношение метанол : масло 3:1.

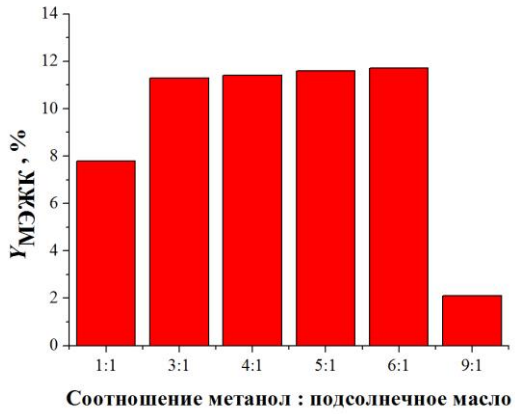

Рисунок 29 – Влияние содержания метанола на выход МЭЖК в реакции переэтерификации подсолнечного масла (2 г) с метанолом с использованием 5% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ при добавлении 4 мл *трет*-бутанола и 4% (вес./вес.) воды при 40 °С и 24 ч

Количество воды

Содержание воды является одним из ключевых факторов, влияющих на активность липаз в неводных средах. Известно, что вода в реакционной смеси способствует протеканию гидролиза, являющегося побочной реакцией переэтерификации и, как следствие, образованию нежелательных свободных жирных кислот [245]. Из полученных в работе данных (Рисунок 30) можно сделать вывод, что для оптимального функционирования биокатализатора БКЛ в реакции

переэтерификации подсолнечного масла с метанолом необходимо использовать 4% воды (об./вес.), при этом $Y_{МЭЖК}$ составляет 16,4%. При увеличении концентрации воды (5%, об./вес., и более) происходит снижение выхода МЭЖК, что, вероятно, связано с гидролизом субстрата.

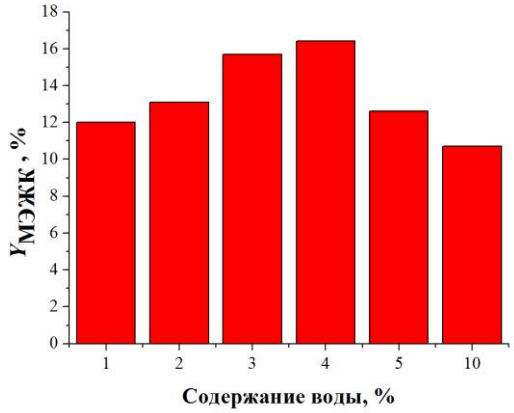

Рисунок 30 – Влияние количества воды на выход МЭЖК реакции переэтерификации подсолнечного масла (2 г) с метанолом в мольном соотношении 1:3 с использованием 5% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ при добавлении 4 мл *трет*-бутанола при 40 °С и 24 ч

3.5.2.2.2 Операционная стабильность биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации подсолнечного масла с метанолом

В работе [7] было проведено исследование биокатализатора БКЛ в оптимальных условиях реакции переэтерификации подсолнечного масла с метиловым спиртом. Оптимальные условия процесса были следующие: количество биокатализатора 20% (вес./вес.), температура реакции 40 °С, мольное соотношение метанол : масло 3:1, содержание *трет*-бутанола 4 мл, содержание воды 4% (об./вес.). Стабильность биокатализатора БКЛ оценивали в течение 20 циклов реакции, максимально достигнутый выход МЭЖК составил 44%. Как показано на Рисунке 31, в течение всего срока эксплуатации происходило равномерное снижение выхода МЭЖК. Время полуинактивации биокатализатора составило 477 ч, а на 20 цикле его активность составила 52,3% от исходной активности ($Y_{МЭЖК}$ = 22,9%). Полученные результаты говорят о стабильности БКЛ в реакции переэтерификации масел, по сравнению с другими иммобилизованными бактериальными липазами.

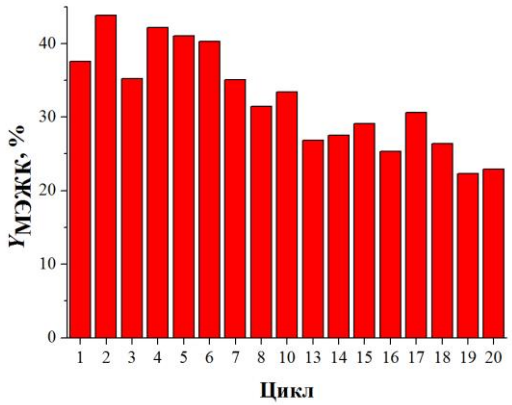

Рисунок 31 – Операционная стабильность биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации подсолнечного масла (2 г) с метанолом в мольном соотношении 1:3 с использованием 20% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ при добавлении 4 мл *трет*-бутанола и 4% (об./вес.) воды при 40 °С в течение 20 циклов (1 цикл = 24 ч)

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

3.5.2.3.1 Исследование влияния различных факторов на степень ферментативной переэтерификации масел

Для оптимизации процесса переэтерификации подсолнечного и гидрированного соевого масла (саломаса) для получения модифицированных пищевых жиров с использованием биокатализатора БКЛ первоначально было исследовано влияние на степень переэтерификации масел следующих параметров процесса: температуры и времени реакции, количества биокатализатора и молярного соотношения саломас : подсолнечное масло (данные представлены в работе [246]).

Количество биокатализатора и продолжительность реакции

Для определения оптимального количества биокатализатора и продолжительности реакции переэтерификации масел использовали биокатализатор БКЛ в количестве 10, 20 и 30% (вес./вес.) и проводили реакцию переэтерификации в течение 1-5 ч. Результаты, приведенные на Рисунке 32, демонстрируют, что после 2 ч реакции для всех использованных концентраций биокатализатора достигается равновесие реакции, а при использовании БКЛ в количестве 30% (вес./вес.) равновесие устанавливается уже после 1 ч. Таким образом, достаточным количеством биокатализатора для протекания процесса переэтерификации подсолнечного масла с саломасом

является 10% (вес./вес.) при котором достигается *ID* 57% после 2 ч реакции. Количество биокатализатора в концентрации 5-15% (вес./вес.) часто используется в реакции переэтерификации масел [247]. Так, например, в работе [248] максимальная степень переэтерификации (25-26%) натурального и гидрированного масла канолы (70:30, вес.%) при температуре 65 °C в течение 1-2 ч достигалась при использовании биокатализатора Lipozyme TL-IM в концентрации 6-10%.

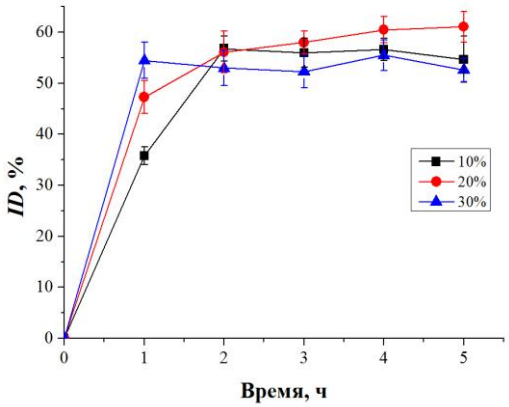

Рисунок 32 – Влияние количества биокатализатора БКЛ и продолжительности реакции на степень переэтерификации смеси подсолнечного масла и саломаса (600 мкл) в молярном соотношении 3:1 при 70 °C

Температура

Выбор оптимальной температуры процесса переэтерификации масел зависит как от состава исходного сырья, так и от термостабильности фермента в составе биокатализатора. В целом, широко используемым диапазоном температур для ферментативной переэтерификации масел для получения пищевых жиров, как в лабораторных, так и в промышленных условиях, является 50-80 °C [249]. Для определения оптимального значения температуры реакции переэтерификации смеси подсолнечного масла и саломаса в присутствии биокатализатора БКЛ его оценивали в диапазоне 70-80 °C (Рисунок 33). Максимальная *ID* (57%) достигалась при проведении процесса при температуре 70 °C. При повышении температуры процесса свыше 75 °C наблюдалось снижение степени переэтерификации, вызванное термической инактивацией липазы в составе биокатализатора [250].

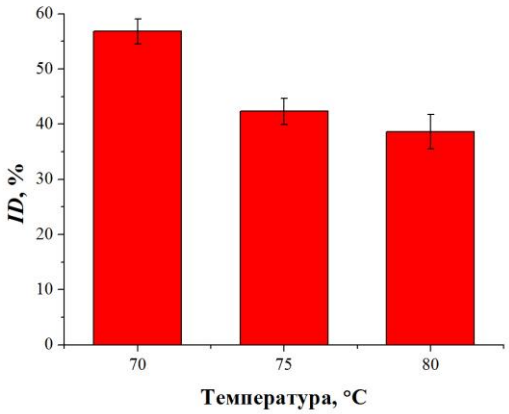

Рисунок 33 – Влияние температуры процесса на степень переэтерификации смеси подсолнечного масла и саломаса (600 мкл) в молярном соотношении 3:1 в присутствии 10% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ в течение 2 ч

Молярное соотношение саломас : подсолнечное масло

Для оценки влияния состава сырьевой смеси на реакцию переэтерификации масел, изменяли молярное соотношение саломас : подсолнечное масло от 2:3 до 1:9 (Рисунок 34). Как можно заметить, максимальная *ID* (48%) достигалась при соотношении саломас : подсолнечное масло 1:3. При увеличении содержания саломаса относительно смеси до 2:3 степень переэтерификации осталась практически без изменения (46%), что говорит о достаточном количестве предельных жирных кислот в смеси масел, которые обеспечивают образование триацилглицеридов с высоким содержанием насыщенных жирных кислот.

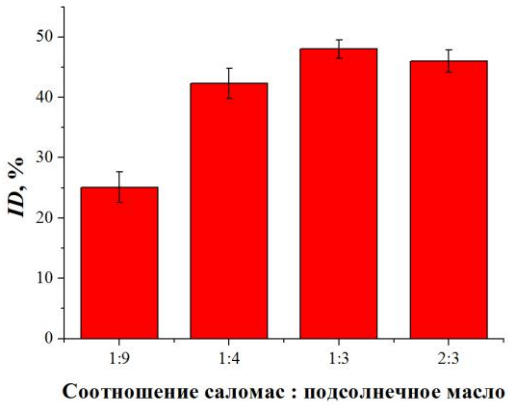

Рисунок 34 – Влияние молярного соотношения саломас : подсолнечное масло на степень переэтерификации смеси подсолнечного масла и саломаса (600 мкл) в присутствии 10% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ при 70 °C в течение 2 ч

Таким образом, для последующего исследования был выбран состав смеси саломас : подсолнечное масло, в соотношении 1:3. Использование подобных соотношений масел для

получения модифицированных жиров ранее применялось для биокатализатора Lipozyme TL IM, который использовался в качестве катализатора реакции переэтерификации смеси натурального и гидрированного кунжутного масла (70:30, вес.%) при температуре 70 °C для получения пищевых жиров – основы для маргаринов и шортенингов [249].

3.5.2.3.2 Операционная стабильность биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации смеси подсолнечного и гидрированного соевого масла

В работе была исследована операционная стабильность биокатализатора БКЛ в течение 120 ч в реакции переэтерификации подсолнечного и гидрированного соевого масла (Рисунок 35) [246]. Оптимальными условиями процесса являлись: количество биокатализатора 10% (вес./вес.), температура 70 °C, молярное соотношение саломас : подсолнечное масло 1:3.

В исследуемых условиях после первого цикла реакции переэтерификации масел с участием биокатализатора БКЛ была достигнута максимальная степень переэтерификации *ID* = 51%. В ходе дальнейшей эксплуатации происходило равномерное снижение степени переэтерификации, что объясняется десорбцией фермента с поверхности биокатализатора под влиянием масла. После 120 ч эксплуатации (5 циклов) катализатор сохранил 56,4% от своей первоначальной активности (*ID* = 28,8%). Время полуинактивации биокатализатора БКЛ на основе рекомбинантной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 в реакции переэтерификации подсолнечного и гидрированного соевого масла в оптимальных условиях составило 121 ч.

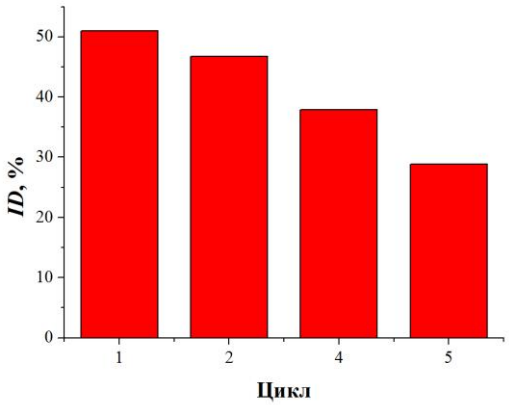

Рисунок 35 – Операционная стабильность биокатализатора БКЛ в реакции переэтерификации смеси саломас : подсолнечное масло подсолнечного масла и саломаса (600 мкл) в молярном соотношении 3:1 в присутствии 10% (вес./вес.) биокатализатора БКЛ при 70 °C в течение 5 циклов (1 цикл = 24 ч)

3.5.2.3.3 Физико-химические характеристики продуктов реакции переэтерификации смеси подсолнечного и гидрированного соевого масла

Анализ состава масел

Результат исследования состава масел, используемых в данной работе – саломаса, подсолнечного масла и их смеси в молярном соотношении 1:3 – приведен в Таблице 22. Данные масла характеризуются высоким содержанием длинноцепочечных жирных кислот (C_{16} и C_{18}). В состав подсолнечного масла входит большое количество ненасыщенных линолевой (57,9%) и олеиновой (24,7%) жирных кислот. Саломас почти полностью состоял из насыщенной стеариновой кислоты (94,5%).

Таблица 22 – Состав жирных кислот подсолнечного масла, саломаса и смеси саломас : подсолнечное масло 1:3

Жирная кислота	**Подсолнечное масло**	**Саломас**	**Саломас : подсолнечное масло (вес.%)[a]**
Пальмитиновая (C16:0)	8,7	5,5	7,9
Стеариновая (C18:0)	8,7	94,5	30,2
Олеиновая (C18:1)	24,7	0,0	18,5
Линолевая (C18:2)	57,9	0,0	43,4

[a] Состав жирных кислот смеси был рассчитан с помощью массобаланса на основе средней молекулярной массы подсолнечного масла и саломаса.

Для оценки состава триацилглицеридов, входящих в состав продуктов реакции переэтерификации смеси саломаса и подсолнечного масла в молярном соотношении 1:3 с использованием биокатализатора БКЛ, был использован метод ВЭЖХ-МС (Рисунок 36). Анализ проводили, как для исходной смеси, так и для продуктов после 2 ч реакции переэтерификации. Список обнаруженных триацилглицеридов приведен в Таблице 23. Исходя из полученных данных видно, что в составе исходной смеси масел преобладали триацилглицериды с насыщенными остатками жирных кислот, характеризующиеся высокими температурами плавления, такие как SSS (9,1%), SPS (5,8%), PLP (1,3%), концентрация которых снижалась в ходе процесса переэтерификации. Через 2 ч реакции переэтерификации в смеси продуктов появился триацилглицерид SOS (2,9%), а также увеличилось содержание переэтерифицированных триацилглицеридов, таких как OLO (5,1%), SLL (8,7%), SOL (6,5%), SOO (10,6%). Также происходило уменьшение концентрации триацилглицеридов с высоким содержанием ненасыщенных остатков жирных кислот (LLL, LLP и LOL), что способствует стабильности продуктов реакции переэтерификации к окислению на воздухе [251].

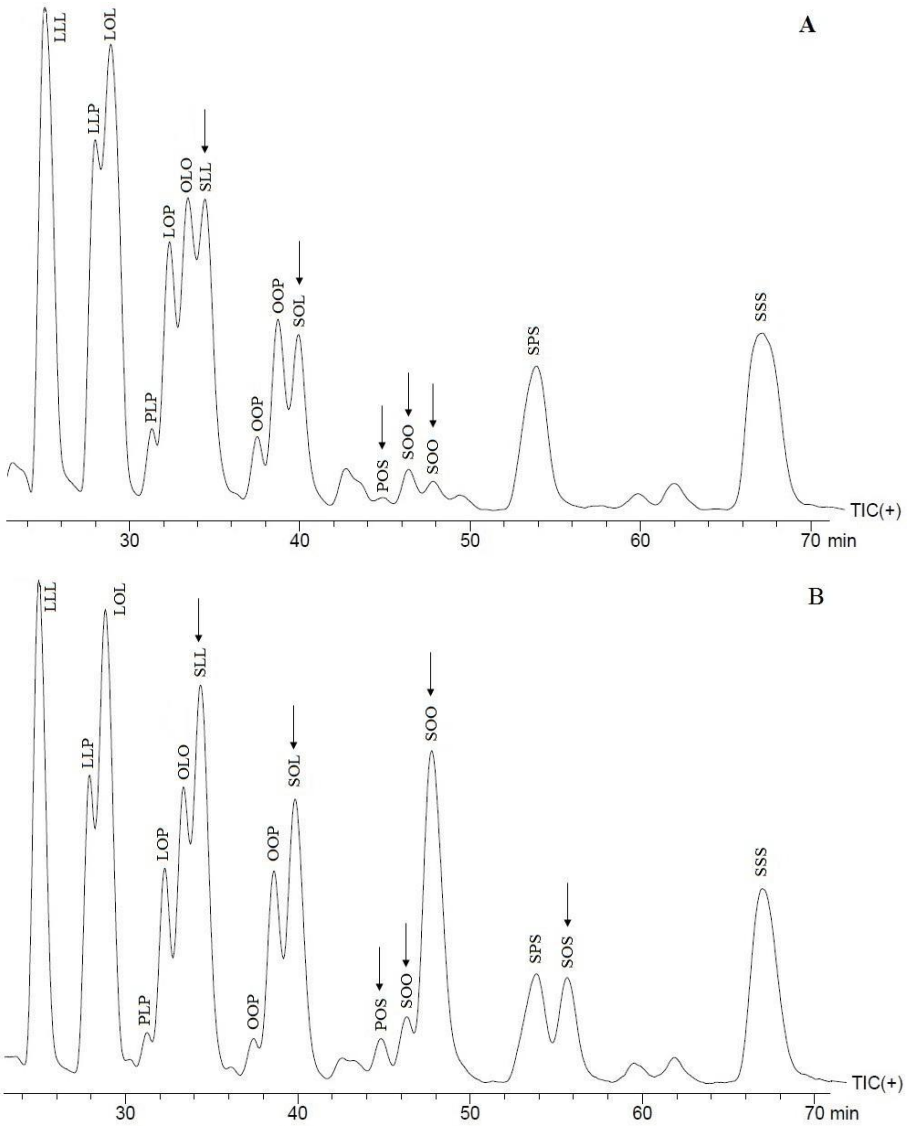

Рисунок 36 – Профили триацилглицеридов смеси саломас : подсолнечное масло (3:1) (A) до и (B) после 2 ч реакции переэтерификации при 70 °C и количестве биокатализатора БКЛ 10% (вес./вес.) по данным ВЭЖХ-МС. Стрелками отмечены пики триацилглицеридов, площадь которых увеличилась во время реакции переэтерификации

Таблица 23 – Состав триацилглицеридов (площадь пика, %) смеси саломас : подсолнечное масло 3:1 до и после 2 ч реакции переэтерификации при 70 °C и количестве биокатализатора БКЛ 10% (вес./вес.)

Триацилглицерид[а]	**$[M + Na]^+$ *m/z***	**ECN**	**До ПЭ[б], %**	**После ПЭ, %**
LLL	901,8	42	12,4	9,2
LLP	877,8	44	6,7	4,3
LOL	903,8	44	12,3	9,8
PLP	853,8	46	1,3	0,7
LOP	879,8	46	5,4	3,5
OLO	905,9	46	6,9	5,1
SLL	905,9	46	7,8	8,7

OOP	881,8	48	5,4	4,9
SOL	907,9	48	4,1	6,5
POS	883,9	50	0,2	1,0
SOO	909,8	50	1,5	10,6
SPS	885,8	52	5,8	3,5
SOS	911,9	52	-	2,9
SSS	913,9	54	9,1	7,4
Другие			21,1	21,9

[a] Эфирные группы триацилглицеридов: P – пальмитиновая, S – стеариновая, O – олеиновая, L – линолевая.

Измерение температуры плавления масел

Одной из основных целей применения реакции переэтерификации является получение масложировых продуктов с измененными физико-химическими свойствами. Реакция переэтерификации сопровождается перераспределением жирнокислотных остатков в молекулах триацилглицеридов, что, как правило, приводит к изменению температуры плавления продуктов по сравнению с исходной смесью [248]. В данной работе с использованием метода AOCS Cc.3.25 [192] было исследовано изменение температуры плавления четырех смесей саломас : подсолнечное масло в молярных соотношениях от 1:9 до 2:3 в ходе реакции переэтерификации (Рисунок 37). В оптимальных условиях, определенных в ходе работы (молярное соотношение саломас : подсолнечное масло 1:3, 70 °C и 10% (вес./вес.) БКЛ), произошло снижение температуры плавления полученной переэтерифицированной масложировой смеси с 60 до 56 °C

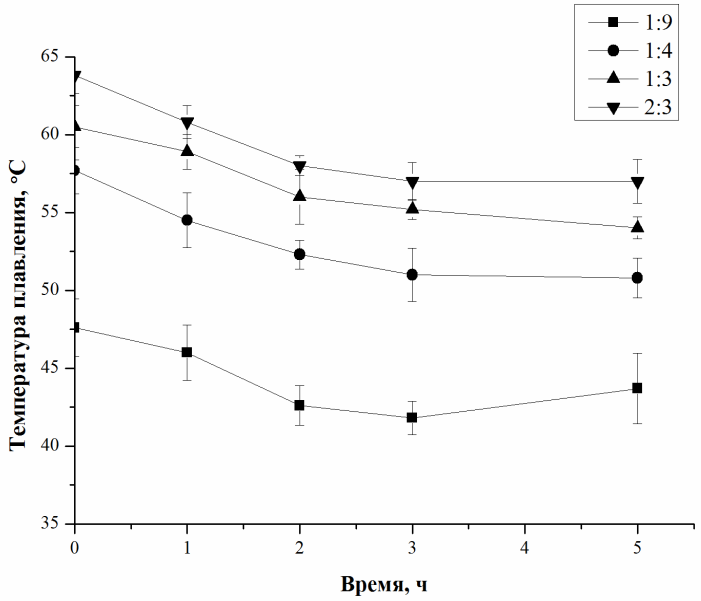

Рисунок 37 – Измерение температуры плавления смеси саломас : подсолнечное масло в молярных соотношениях от 1:9 до 2:3 в реакции переэтерификации подсолнечного масла и гидрированного соевого масла в присутствии биокатализатора БКЛ

через 2 ч реакции. В работе Sellami et al. [252] также было показано снижение температуры плавления масел на 4 °C в результате переэтерификации пальмового стеарина и олеина (2:3, вес.%) при 50 °C в течение 24 ч с использованием липазы *R. oryzae*, иммобилизованной на частицах $CaCO_3$. Исходя из данных, представленных на Рисунке 37, можно сделать вывод, что через 2 ч реакции достигается ее равновесие, так как после этого срока не происходит изменения температуры плавления продукта реакции. За это время происходит полное перераспределение остатков жирных кислот в молекулах триацилглицеридов, что также коррелирует с вышеизложенными результатами о достижении максимальной степени переэтерификации масел через 2 ч (Рисунок 32). Как уже было установлено (Таблица 23), при переэтерификации смеси саломаса и подсолнечного масла происходит снижение концентрации триацилглециридов с более высокой температурой плавления (SSS, SPS, PLP), что, в свою очередь, способствует снижению общего профиля плавления смеси масел.

3.6 Характеристика полученных в работе биокатализаторов

Исходя из данных о свойствах полученных в ходе работы биокатализаторов был проведен их анализ (Таблица 24). Из представленных данных видно, что оба полученных в работе биокатализатора (CLEA-estUT1 и БКЛ) значительно различаются по свойствам, что позволило применить их в процессах, сопряженных с реакциями гидролиза и переэтерификации разнообразных субстратов.

Для приготовления биокатализатора CLEA-estUT1 была использована ранее не охарактеризованная рекомбинантная эстераза estUT1 из бактерии *U. thermosphaericus* UT1

Таблица 24 – Характеристика биокатализаторов, полученных в ходе работы

Биокатализатор	**CLEA-estUT1**	**БКЛ**	
Активный компонент	Рекомбинантная эстераза estUT1 из бактерии *U. thermosphaericus* UT1	Рекомбинантная внеклеточная липаза G3 из бактерии *G. stearothermophilus* G3 [174]	
Субстратная специфичность	Гидролиз сложных эфиров жирных кислот длиной $<C_8$	Гидролиз сложных эфиров жирных кислот длиной C_{16} [174]	
Применение	Гидролиз малатиона (очистка сточных вод)	Получение МЭЖК (биодизельное топливо)	Получение переэтерифцированных масложировых смесей (продукты питания)
Способ получения белка для иммобилизации	Коэкспрессия плазмиды pET32b-UT1 в клетках *E. coli* BL21(DE3) с шаперонами KJE, ClpB и ELS с последующей очисткой с использованем аффинной хроматографии	Экспрессия плазмиды pQE-G3 в штамме *E. coli* B-1298 с последующей очисткой путем осаждения с использованием сульфата аммония в концентрациях 30% и 80% с последующим диализом	

Способ иммобилизации	Поперечная сшивка агрегатов белка	Ковалентная иммобилизация на мезопористом силикагеле	
Удельная активность белка использованного для иммобилизации	200,7 ± 15,5 ЕА×мг$^{-1}$ белка	483,2 ЕА×г$^{-1}$ белка	
Условия приготовления	Время иммобилизации 5,1 ч, сульфат аммония 65,1% (вес./об.), глутаровый альдегид 120,6 мМ, БСА 0,2 мМ. Для иммобилизации использовали 1 мг белка на 3 мл раствора	Силикагель предварительно модифицировали – аминировали с помощью APTS с последующей обработкой 1,2% глутаровым альдегидом. Время иммобилизации липазы 3 ч, температура 50 °С. Для иммобилизации использовали 50 мг белка на 1 г носителя	
Удельная активность биокатализатора	29,4 ± 0,5 ЕА×мг$^{-1}$ биокатализатора	23,6 ЕА×г$^{-1}$ биокатализатора	
Степень иммобилизации белка	90,6 ± 2,7%	8,7%	
Оптимальные условия реакции	Стерилизованные сточные воды с очистных сооружений г. Новосибирска (MWW) с малатионом в концентрации 27,5 мг×л$^{-1}$ при 37 °С	Количество биокатализатораа 20% (вес./вес.), мольное соотношение метанол : масло 3:1, содержание *трет*-буанола 4 мл, содержание воды 4% (об./вес.), 40 °С	Количество биокатализатора 10% (вес./вес.), молярное соотношение саломас : подсолнечное масло 1:3, 2 ч, 70 °С
Превращение субстрата и оценка операционной стабильности биокатализатора	Максимально достигнутая *MHD* 99,5 ±1,4%; *MHD* 55,2 ± 1,1% после 25 циклов реакции (350 ч); $t_{1/2}$ - 462 ч	Максимально достигнутый $Y_{МЭЖК}$ 44%; $Y_{МЭЖК}$ 22,9% после 20 циклов (480 ч) реакции; $t_{1/2}$ - 477 ч	Максимально достигнутая *ID* 51%; *ID* 28,8% после 5 цикла (120 ч) реакции; $t_{1/2}$ - 121 ч

(Таблица 13), обдающая способностью к гидролизу сложных эфиров жирных кислот (<C_8). Высокая термостабильность (при температурах 50-70 °С) и активность фермента позволила использовать ранее не применявшийся оригинальный подход к получению белка для иммобилизации, заключающийся в использовании растворимой фракции белка после коэкспрессии целевого белка с шаперонами с дополнительной хроматографической очисткой. С использованием такого подхода была получена высокая удельная активность белка и исключена необходимость применения ренатурации белка (estUT1), получаемого в тельцах включения.

В работе было установлено, что применение метода ПСФА для приготовления биокатализатора на основе эстеразы estUT1 позволило получить высокоактивный биокатализатор CLEA-estUT1, удельная активность которого составила 29,4 ± 0,5 ЕА×мг$^{-1}$ (Таблица 24). При оптимизации процедуры приготовления биокатализатора CLEA-estUT1 методом отклика поверхности с применением гранецентрированного центрально-композиционного планирования удалось получить максимальную степень иммобилизации белка, равную 90,6 ± 2,7% (Таблица 18). Выявлено, что иммобилизация повышает активность фермента при pH 5,0-10,0 и температуре 30-90 °C. Биокатализатор CLEA-estUT1 отличается высокой стабильностью в денатурирующих условиях, в том числе при высокой температуре (50-80 °C), различных pH (5,0-10,0), и в присутствии ряда химических веществ, в том числе 10 мМ растворах ФМСФ, ДТТ, 2-меркаптоэтанола, а также в 1% SDS и Твин 20.

Биокатализатор CLEA-estUT1 показал высокую эффективность и операционную стабильность в реакции гидролиза инсектицида малатиона (Рисунок 25). Максимально достигнутая степень гидролиза малатиона составила 99,5 ± 1,4%. Исследуемый в данной работе биокатализатор CLEA-estUT1 не только превзошел по активности применяющиеся биокатализаторы, например, на основе штамма *Bacillus* sp. S14 (степень удаления малатиона при его использовании составляет 64,4% [139]), но также показал высокую стабильность в реакции гидролиза малатиона в 50 мМ Tris-HCl pH 7,0, сохраняя *MHD* свыше 78,1 ± 3,1% в течение 25 циклов. Помимо этого, в данной работе впервые было исследовано удаление малатиона из стерилизованных муниципальных сточных вод (среда MWW) с использованием биокаталитического подхода – степень гидролиза малатиона составила 55,2 ± 1,1% после 25 циклов. Таким образом, иммобилизованная эстераза estUT1 является эффективным биокатализатором для применения в процессах гидролиза инсектицидов, в том числе для очистки стерилизованных муниципальных сточных вод.

Несмотря на то, что термостабильная рекомбинантная липаза бактерии *G. stearothermophilus* G3, использованная в данной работе для приготовления биокатализатора БКЛ методом ковалентной иммобилизации, уступала эстеразе estUT1 по ряду характеристик, в том числе по термостабильности (оптимуму и времени полуинактивации) (Таблица 13), ее удалось применить в двух биотехнологических процессах, связанных с переэтерификацией сложных эфиров длинноцепочечных жирных кислот. Ковалентная иммобилизация белка с удельной активностью 483,2 ЕА×г$^{-1}$, полученного из продуцента *E. coli* B-1298, на мезопористом силикагеле привела к получению биокатализатора БКЛ с активностью 23,6 ЕА×г$^{-1}$ (степень иммобилизации составила 8,7%).

Применение биокатализатора БКЛ в процессах получения МЭЖК как компонентов биодизельного топлива (в реакции метанолиза подсолнечного масла) позволило получить

средний выход продуктов реакции в начале эксплуатации (максимально достигнутый выход МЭЖК в течение 24 ч - 44%), после 480 ч эксплуатации $Y_{МЭЖК}$ составил 22,9% (Таблица 24), в то время как для аналогичных биокатализаторов этот показатель был выше. Например, ковалентно иммобилизованная на силикагеле липазы бактерии *B. aerius* в реакции метанолиза касторового масла и метанола в соотношении 1:4 при 55 °C обеспечивала максимальный выход МЭЖК 78,13% за 96 ч [163]. Отмечена высокая стабильность БКЛ – время полуинактивации биокатализатора в исследуемых условиях составило 477 ч. Стабильность катализатора БКЛ оказалась выше, чем стабильности биокатализаторов на основе других бактериальных липаз, приготовленных аналогичным способом. Так исследование операционной стабильности липазы бактерии *P. cepacia*, ковалентно иммобилизованной на активированных глутаровым альдегидом покрытых силикагелем магнитных частицах, показало, что она сохраняла 55% от первоначальной активности при эксплуатации при 40 °C после 5 циклов (120 ч) реакции переэтерификации соевого масла с метанолом [253]. В то же время БКЛ уступает по показателю стабильности коммерческим биокатализаторам на основе грибных липаз, например, катализатору Lipozyme TL IM, который обеспечивает выход МЭЖК свыше 94% через 180 ч переэтерификации соевого масла [254].

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что термостабильная липаза бактерии *G. stearothermophilus* G3, впервые иммобилизованная на силикагеле, отличалась высокой операционной стабильностью по сравнению с другими иммобилизованными бактериальными липазами в целевой реакции. Однако для достижения более высоких показателей выхода МЭЖК в целевой реакции необходимо дальнейшее изучение применения липазы G3 в качестве активного компонента биокатализатора. Повышение эффективности иммобилизованной липазы G3, как катализатора ПЭ масел, может быть достигнуто, как путем увеличения термостабильности фермента методами биоинженерии, так и с помощью применния иных методов иммобилизации.

Другим применением биокатализатора БКЛ в данной работе являлась реакция ПЭ растительных масел, широко применяемая в промышленности для получения масложировых основ для производства различных продуктов (маргаринов, спредов, заменителей масло-какао). Биокатализатор БКЛ также обладал средней эффективностью в реакции переэтерификации подсолнечного масла и гидрированного соевого масла – максимальная степень ПЭ составила 51% (Таблица 24). Время его полуинактивации в оптимальных условиях составило 121 ч. Следует отметить, что исследуемый в настоящей работе биокатализатор БКЛ, отличающийся активностью при повышенной температуре (70 °C), превосходит по эффективности катализаторы на основе липаз других микроорганизмов с низкими температурными оптимумами активности, как например, в реакции ПЭ смеси пальмового стеарина и подсолнечного масла при 60 °C в

присутствии иммобилизованных *A. niger, C. rugosa* и *Mucor javanicus* степень иммобилизации составила 23,8, 6,2 и 10,8%, соответственно [173]. Однако БКЛ немного уступает иммобилизованной липазе *Pseudomonas* sp. – степень иммобилизации в реакции ПЭ смеси пальмового стеарина и подсолнечного масла составила 77,3% [173]. Также БКЛ уступает по показателям стабильности и активности коммерческому биокатализатору Lipozyme TL IM на основе грибной липазы *T. lanuginosus*. В реакции переэтерификации пальмового стеарина и кокосового масла (75:25, вес.%) Lipozyme TL IM был стабилен в пилотном реакторе с загрузкой 300 кг при 70 °C и 4 × 10^{-3} MPa в течение 9 циклов (54 ч) и обеспечивал степень переэтерификации 80-100% [19].

Таким образом, в данной работе впервые было показано, что иммобилизованная на мезопористом силикагеле термостабильная липаза бактерии *G. stearothermophilus* G3 применима в качестве биокатализатора процесса переэтерификации масел для получения модифицированных жиров со средней эффективностью. Исследуемый биокатализатор был стабилен в реакции переэтерификации смеси саломаса и подсолнечного масла при температуре 70 °C. Однако, как уже было сказано выше, необходимы дальнейшие исследования по улучшению характеристик катализатора БКЛ для эффективного использования в процессах переэтерификации масел.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена исследованию свойств новых липолитических ферментов и применению биокатализаторов в реакциях гидролиза и переэтерификации липидов. Представлены результаты выделения бактериальных штаммов, выделенных из образцов компоста, отобранных в Новосибирской области и Республики Тыва, обладающие липолитической активностью при температурах до 65 °C. В ходе работ был выделен штамм термофильной бактерии *U. thermosphaericus* UT1, свойства ферментов которой ранее не были изучены. Из полученного штамма была клонирована и экспрессирована в клетках *E. coli* новая термостабильная эстераза estUT1. Исследование свойств фермента показало, что фермент обладает высоким температурным оптимумом (70-80 °C), длительным временем полуинактивации (при 60 °C ~ 15 ч), а также обладает высокой устойчивостью к различным химическим веществам, в том числе к органическим растворителям. Исследование свойств и структуры estUT1 позволило заключить, что данная эстераза относится к новому, ранее неизвестному семейству липолитических ферментов, которому был присвоен порядковый номер XVIII. Высокая стабильность фермента в широких условиях позволит применять его в процессах, сопряженных с использованием денатурирующих условий.

В представленной работе впервые был применен комплексный подход, включающий коэкспрессию эстеразы с шаперонами с целью повышения выхода растворимого белка, с последующей иммобилизацией полученного фермента методом поперечной сшивки. Предложенный подход позволил не только существенно повысить выход целевого белка, но и также упростить процесс приготовления биокатализатора. Полученный биокатализатор CLEA-estUT1 отличался высокой стабильностью в денатурирующих условиях (высокая температура, широкий диапазон значений pH, в присутствии различных химических веществ) и обладал высокой операционной стабильностью в реакции гидролиза фосфорорганического инсектицида малатиона в стерилизованных муниципальных сточных водах. Таким образом, результаты работы позволяют утверждать, что биокатализатор CLEA-estUT1 на основе новой эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* благодаря своим свойствам является перспективным для различных биотехнологических процессов, основанных на реакциях гидролиз короткоцепочечных сложных эфиров, включая процессы очистки сточных вод от загрязняющих веществ, в том числе малатиона.

В работе впервые было показано применение иммобилизованной термостабильной липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 в реакции переэтерификации масел. Термостабильная

липаза G3, иммобилизованная методом ковалентного связывания на аминированном силикагеле, была стабильна (по сравнению с некоторыми описанными в литературе биокатализаторами) в двух разных процессах переэтерификации масел: переэтерификации подсолнечного масла с метанолом с целью получения МЭЖК (основа биодизельного топлива) и переэтерификации подсолнечного масла и саломаса для получения модифицированных жиров. Биокатализатор БКЛ обладает средней эффективностью, при применении в обоих процессах он обеспечивал выходы продуктов реакций ($Y_{МЭЖК}$ и *ID*), сравнимые с некоторыми другими иммобилизованными бактериальными ферментами, поэтому необходимы его дальнейшие улучшения для применения в целевых реакциях. Полученные в данной работе результаты будут являться основой для оптимизации биокатализторов на основе липазы бактерии *G. stearothermophilus* G3 для их применения в реакциях переэтерификации сложных эфиров длинноцепочечных жирных кислот.

Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что исследованные в работе иммобилизованные бактериальные липолитические ферменты являются перспективными биокатализаторами для применения в различных биотехнологических процессах, основанных на реакциях гидролиза и переэтерификации липидов.

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 °C 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 °C 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 5,0-10,0 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ГХ-МС – газовая хроматомасс-спектрометрия

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФ – Диметилформамид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

ЕА – единица активности

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

Малатион – *O*,*O*-диметил-*S*-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфат

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот

Об. - объем

ОП – оптическая плотность

ПАВ – поверхностно-активные вещества

Паратион – *O*,*O*-диэтил-*O*-(4-нитрофенил)тиофосфат

Пендиметалин – *N*-(1-этилпропил)-2,6-динитро-3,4-ксилидин

П.н. – пара нуклеотидов

П.о. – пара оснований

Профенофос – *O*-(4-бромо-2-хлорфенил)*O*-этил-*S*-пропил-фосфоротиоат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭ – переэтерификация

Р. – род

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид

ФП – ферментативная переэтерификация

ЭДТА – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

APCI – химическая ионизация при атмосферном давлении

APTS – 3-аминопропилтриэтоксисилан

CLE – поперечно сшитые ферменты, англ. “cross-linked enzymes”

CLEA, ПСФА – поперечно сшитые ферментные агрегаты, англ. “cross-linked enzyme aggregates”

CLEC – поперечно сшитые кристаллы фермента, англ. “cross-linked enzyme crystals”

CSDE – поперечно сшитые высушенный препарат фермента, англ. “cross-linked spray-dried enzymes”

dNTPs – дезоксинуклеотидтрифосфаты

ECN – эквивалентное углеродное число

ESI – электрораспыление

FCCCD – гранецентрированное центрально-композиционное планирование

HSL – гормон-чувствительная липаза

ID – степень переэтерификации

ImD – степень иммобилизации

Lid – англ., крышка

MANA – моноаминоэтил-N-аминоэтил

MHD – степень гидролиза малатиона

MWW – муниципальные сточные воды, англ. “municipal wastewater”

Neibour-joining – метод ближайших соседей

Nucleophilic elbow – англ., нуклеофильный локоть

*p*NP – *n*-нитрофенол

*p*NPC2 – *n*-нитрофенил ацетат

*p*NPC4 – *n*-нитрофенил бутират

*p*NPC8 – *n*-нитрофенил октаноат

*p*NPC12 – *n*-нитрофенил додеканоат

*p*NPC16 – *n*-нитрофенил пальмитат

*p*NPC18 – *n*-нитрофенил стеарат

RSM – метод отклика поверхности

SDS – додецилсульфат натрия

Sp – специфичность

$t_{1/2}$ – время полуинактивации

TG – триацилглицерид

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

$Y_{\text{мэжк}}$ – выход метиловых эфиров жирных кислот

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крякунова Е. В., Канарский А. В. Применение иммобилизованных микроорганизмов и ферментов // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15, № 22. – С. 101-105.

2. Маслова О. В., Сенько О. В., Степанова Н. А., Ефременко Е. Н. Получение молочной кислоты с использованием свободных и иммобилизованных в криогель поливинилового спирта клеток бактерий и мицелиальных грибов: сравнительный анализ характеристик биокатализаторов и процессов // Катализ в промышленности. – 2016. № 3. – С. 69-75.

3. Ефременко Е. Н., Лягин И. В., Гудков Д. А., Степанов Н. А., Сенько О. В., Маслова О. В., Ковалев Д. А., Завьялова Н. В., Холстов В. И., Янковская А. А. Комбинированное применение ферментного и бактериального биокатализаторов в процессах биодеструкции ФОВ и продуктов их разложения // Теоретическая и прикладная экология. – 2015. № 3. – С. 35-39.

4. Ekinci A. P., Dinçer B., Baltaş N., Adıgüzel A. Partial purification and characterization of lipase from *Geobacillus stearothermophilus* AH22 // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2016. – Т. 31, № 2. – С. 325-331.

5. Mahadevan G. D., Neelagund S. E. Thermostable lipase from *Geobacillus* sp. Iso5: Bioseparation, characterization and native structural studies // Journal of Basic Microbiology. – 2014. – Т. 54, № 5. – С. 386-396.

6. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. 2006. / Vakhlu J., Kour A., 2006. 2006.

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

8. Sheldon R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Т. 92, № 3. – С. 467-477.

9. Amin M. T., Alazba A. A., Manzoor U. A Review of Removal of Pollutants from Water/Wastewater Using Different Types of Nanomaterials // Advances in Materials Science and Engineering. – 2014. – Т. 2014. – С. 24.

10. Khan S., Zaffar H., Irshad U., Ahmad R., Khan A. R., Shah M. M., Bilal M., Iqbal M., Naqvi T. Biodegradation of malathion by *Bacillus licheniformis* strain ML-1 // 2016. – 2016. – Т. 68, № 1. – С. 9.

11. Goda S. K., Elsayed I. E., Khodair T. A., El-Sayed W., Mohamed M. E. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria // Biodegradation. – 2010. – Т. 21, № 6. – С. 903-913.

12. Geed S. R., Kureel M. K., Shukla A. K., Singh R. S., Rai B. N. Biodegradation of malathion and evaluation of kinetic parameters using three bacterial species // Resource-Efficient Technologies. – 2016. – Т. 2. – С. S3-S11.

13. More V. S., Tallur P. N., Niyonzima F. N., More S. S. Enhanced degradation of pendimethalin by immobilized cells of *Bacillus lehensis* XJU // 3 Biotech. – 2015. – Т. 5, № 6. – С. 967-974.

14. Talwar Manjunatha P., Ninnekar Harichandra Z. Biodegradation of pesticide profenofos by the free and immobilized cells of *Pseudoxanthomonas suwonensis* strain HNM // Journal of Basic Microbiology. – 2015. – Т. 55, № 9. – С. 1094-1103.

15. Freedman B., Butterfield Royden O., Pryde Everett H. Transesterification kinetics of soybean oil 1 // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1986. – Т. 63, № 10. – С. 1375-1380.

16. Xiao M., Mathew S., Obbard J. P. Biodiesel fuel production via transesterification of oils using lipase biocatalyst // GCB Bioenergy. – 2009. – Т. 1, № 2. – С. 115-125.

17. Сорокина К. Н., Розанов А. С., Брянская А. В., Пельтек С. Е. Выделение и исследование свойств бактерий термальных источников Северного прибайкалья, обладающих липолитической активностью // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4-1. – С. 651-658.

18. Osório Natália M., da Fonseca M. M. R., Ferreira-Dias S. Operational stability of *Thermomyces lanuginosa* lipase during interesterification of fat in continuous packed-bed reactors // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2006. – Т. 108, № 7. – С. 545-553.

19. Zhang H., Xu X., Nilsson J., Mu H., Adler-Nissen J., Høy C.-E. Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated *Thermomyces lanuginosa* lipase in a large-scale study // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2001. – Т. 78, № 1. – С. 57-64.

20. Сорокина К. Н., Самойлова Ю. В., Пилигаев А. В., Шивакумар У., Пармон В. Н. Новые методы одностадийной переработки полисахаридных компонентов лигноцеллюлозной биомассы (целлюлозы и гемицеллюлоз) в ценные продукты Часть 2. Подходы, применяемые в биотехнологической переработке поли- и моносахаридов в ценные продукты, востребованные химической промышленностью // Катализ в промышленности. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 70-77.

21. Bornscheuer U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis // FEMS Microbiology Reviews. – 2002. – Т. 26, № 1. – С. 73-81.

22. Юзбашева Е. Ю., Готовцев П. М., Мостова Е. Б., Перковская Н. И., Ломоносова М. А., Бутылин В. В., Синеокий С. П., Василов Р. Г. Получение биодизеля методом ферментативного катализа // Биотехнология. – 2014. – Т. 1. – С. 8-24.

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

24. Безбородов А. М., Загустина Н. А. Липазы в реакциях катализа в органическом синтезе (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 4. – С. 347-373.

25. Sharma D., Sharma B., Shukla A. K. Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A Review // Biotechnology. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 23-40.

26. Нагибина В. В., Ребезов М. Б., Анохина Е. С., Максимюк Н. Н., Асенова Б. К. Разработка мультиферментных моющих средств для предприятий пищевой промышленности // Молодой ученый. – 2014. – Т. 8. – С. 214-216.

27. Baeza-Jiménez R., López-Martínez L. X., Otero C., Kim I.-H., García H. S. Enzyme-catalysed hydrolysis of phosphatidylcholine for the production of lysophosphatidylcholine // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2013. – Т. 88, № 10. – С. 1859-1863.

28. Hide W. A., Chan L., Li W. H. Structure and evolution of the lipase superfamily // Journal of Lipid Research. – 1992. – Т. 33, № 2. – С. 167-78.

29. Mehta A., Bodh U., Gupta R. Fungal lipases: a review // Journal of Biotech Research. – 2017. – Т. 8. – С. 58-77.

30. Kapoor M., Gupta M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications // Process Biochemistry. – 2012. – Т. 47, № 4. – С. 555-569.

31. Lowe M. E. The triglyceride lipases of the pancreas // Journal of Lipid Research. – 2002. – Т. 43, № 12. – С. 2007-2016.

32. Jaeger K.-E., Dijkstra B. W., Reetz M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases // Annual Review of Microbiology. – 1999. – Т. 53, № 1. – С. 315-351.

33. Montella I. R., Schama R., Valle D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2012. – Т. 107, № 4. – С. 437-449.

34. Arpigny J. L., Jaeger K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties // Biochemical Journal. – 1999. – Т. 343, № Pt 1. – С. 177-183.

35. Ramnath L., Sithole B., Govinden R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry // Canadian Journal of Microbiology. – 2016. – Т. 63, № 3. – С. 179-192.

36. Kim H.-K., Park S.-Y., Lee J.-K., Oh T.-K. Gene Cloning and Characterization of Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 1998. – Т. 62, № 1. – С. 66-71.

37. Privé F., Kaderbhai N. N., Girdwood S., Worgan H. J., Pinloche E., Scollan N. D., Huws S. A., Newbold C. J. Identification and Characterization of Three Novel Lipases Belonging to Families II and V from *Anaerovibrio lipolyticus* 5ST // PLoS ONE. – 2013. – Т. 8, № 8. – С. e69076.

38. Pérez C., Juárez K., García-Castells E., Soberón G., Servín-González L. Cloning, characterization, and expression in *Streptomyces lividans* 66 of an extracellular lipase-encoding gene from *Streptomyces* sp. M11 // Gene. – 1993. – Т. 123, № 1. – С. 109-114.

39. Choo D.-W., Kurihara T., Suzuki T., Soda K., Esaki N. A Cold-Adapted Lipase of an Alaskan Psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – Т. 64, № 2. – С. 486-491.

40. Cai J., Xie Y., Song B., Wang Y., Zhang Z., Feng Y. *Fervidobacterium changbaicum* Lip1: identification, cloning, and characterization of the thermophilic lipase as a new member of bacterial lipase family V // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Т. 89, № 5. – С. 1463-1473.

41. Hong K. H., Jang W. H., Choi K. D., Yoo O. J. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Carboxylesterase: Cloning and Expression of the Esterase Gene in *Escherichia coli* // Agricultural and Biological Chemistry. – 1991. – Т. 55, № 11. – С. 2839-2845.

42. Tao W., Lee M. H., Wu J., Kim N. H., Lee S.-W. Isolation and characterization of a family VII esterase derived from alluvial soil metagenomic library // The Journal of Microbiology. – 2011. – Т. 49, № 2. – С. 178-185.

43. Kim Y. S., Lee H. B., Choi K. D., Park S., Yoo O. J. Cloning of *Pseudomonas fluorescens* Carboxylesterase Gene and Characterization of Its Product Expressed in *Escherichia coli* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 1994. – Т. 58, № 1. – С. 111-116.

44. Braaz R., Handrick R., Jendrossek D. Identification and characterisation of the catalytic triad of the alkaliphilic thermotolerant PHA depolymerase PhaZ7 of *Paucimonas lemoignei* // FEMS Microbiology Letters. – 2003. – Т. 224, № 1. – С. 107-112.

45. Levisson M., van der Oost J., Kengen S. W. M. Characterization and structural modeling of a new type of thermostable esterase from *Thermotoga maritima* // FEBS Journal. – 2007. – Т. 274, № 11. – С. 2832-2842.

46. Lee M.-H., Lee C.-H., Oh T.-K., Song J. K., Yoon J.-H. Isolation and Characterization of a Novel Lipase from a Metagenomic Library of Tidal Flat Sediments: Evidence for a New Family of Bacterial Lipases // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Т. 72, № 11. – С. 7406-7409.

47. Kim E.-Y., Oh K.-H., Lee M.-H., Kang C.-H., Oh T.-K., Yoon J.-H. Novel Cold-Adapted Alkaline Lipase from an Intertidal Flat Metagenome and Proposal for a New Family of Bacterial Lipases // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – Т. 75, № 1. – С. 257-260.

48. Rao L., Xue Y., Zheng Y., Lu J. R., Ma Y. A Novel Alkaliphilic *Bacillus* Esterase Belongs to the 13th Bacterial Lipolytic Enzyme Family // PLOS ONE. – 2013. – Т. 8, № 4. – С. e60645.

49. Rao L., Xue Y., Zhou C., Tao J., Li G., Lu J. R., Ma Y. A thermostable esterase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* opening up a new family of bacterial lipolytic enzymes // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. – 2011. – Т. 1814, № 12. – С. 1695-1702.

50. Zarafeta D., Moschidi D., Ladoukakis E., Gavrilov S., Chrysina E. D., Chatziioannou A., Kublanov I., Skretas G., Kolisis F. N. Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases // Scientific Reports. – 2016. – Т. 6. – С. 38886.

51. Li M., Yang L.-R., Xu G., Wu J.-P. Cloning and characterization of a novel lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* GS11: The first member of a new bacterial lipase family XVI // Journal of Biotechnology. – 2016. – Т. 228. – С. 30-36.

52. Castilla A., Panizza P., Rodríguez D., Bonino L., Díaz P., Irazoqui G., Rodríguez Giordano S. A novel thermophilic and halophilic esterase from *Janibacter* sp. R02, the first member of a new lipase family (Family XVII) // Enzyme and Microbial Technology. – 2017. – Т. 98. – С. 86-95.

53. Bharathi D., Rajalakshmi G., Komathi S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil // Journal of King Saud University - Science. – 2018.https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.018.

54. Tae H. H., Feng Q., Chongli Y., Xuebing Z., Doraiswami R., Dehua L., Arvind V. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Protein engineering and lipase production // Biotechnology and Bioengineering. – 2014. – Т. 111, № 4. – С. 639-653.

55. Kim J., Deng L., Hong E., Ryu Y. Cloning and characterization of a novel thermostable esterase from *Bacillus gelatini* KACC 12197 // Protein Expression and Purification. – 2015. – Т. 116. – С. 90-97.

56. Bayoumi R. A., S. El-louboudey S., Sidkey N., Abdel-Rahman M. Production, Purification and Characterization of Thermoalkalophilic Lipase for Application in Bio-detergent Industry // Journal of Applied Sciences Research. – 2007. – Т. 3, № 12. – С. 1752-1765.

57. Chiş L., Hriscu M., Bica A., Toşa M., Nagy G., Róna G., G. Vértessy B., Dan Irimie F. Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase produced by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain // The Journal of General and Applied Microbiology. – 2013. – Т. 59, № 2. – С. 119-134.

58. Shariff F. M., Rahman R. N. Z. R. A., Basri M., Salleh A. B. A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp // International Journal of Molecular Sciences. – 2011. – Т. 12, № 5. – С. 2917-2934.

59. Sivaramakrishnan R., Muthukumar K. Isolation of thermo-stable and solvent-tolerant *Bacillus* sp. lipase for the production of biodiesel // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2012. – Т. 166, № 4. – С. 1095-1111.

60. Xie Z., Xu B., Ding J., Liu L., Zhang X., Li J., Huang Z. Heterologous expression and characterization of a malathion-hydrolyzing carboxylesterase from a thermophilic bacterium, *Alicyclobacillus tengchongensis* // Biotechnology Letters. – 2013. – Т. 35, № 8. – С. 1283-1289.

61. Mohamed Z. K., Ahmed M. A., Fetyan N. A., Elnagdy S. M. Isolation and molecular characterisation of malathion-degrading bacterial strains from waste water in Egypt // Journal of Advanced Research. – 2010. – Т. 1, № 2. – С. 145-149.

62. Surendhiran D., Sirajunnisa A. R., Vijay M. An alternative method for production of microalgal biodiesel using novel *Bacillus lipase* // 3 Biotech. – 2015. – Т. 5, № 5. – С. 715-725.

63. Leow T. C., Sharif F. M., Rahman R. N. Z. R. A., Salleh A. B., Basri M. Thermostable lipases // Book Thermostable lipases / Editor. – New York, NY, USA: Nova Science Publishers Inc., 2006. – С. 41-61.

64. Vieille C., Zeikus G. J. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2001. – Т. 65, № 1. – С. 1-43.

65. Castro-Ochoa L. D., Rodríguez-Gómez C., Valerio-Alfaro G., Oliart Ros R. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11 // Enzyme and Microbial Technology. – 2005. – Т. 37, № 6. – С. 648-654.

66. Balan A., Ibrahim D., Abdul Rahim R., Ahmad Rashid F. A. Purification and Characterization of a Thermostable Lipase from *Geobacillus thermodenitrificans* IBRL-nra // Enzyme Research. – 2012. – Т. 2012. – С. 987523.

67. Stathopoulou P. M., Savvides A. L., Karagouni A. D., Hatzinikolaou D. G. Unraveling the Lipolytic Activity of Thermophilic Bacteria Isolated from a Volcanic Environment // BioMed Research International. – 2013. – Т. 2013. – С. 13.

68. Salameh M. d. A., Wiegel J. Purification and Characterization of Two Highly Thermophilic Alkaline Lipases from *Thermosyntropha lipolytica* // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Т. 73, № 23. – С. 7725-7731.

69. Кригер А. В., Дышлюк Л. С., Долганюк В. Ф., Зимина М. И., Асякина Л. К. Выделение, очистка и изучение свойств рекомбинантной липазы, экспрессированной в *Escherichia coli* // Фундаментальные исследования. – 2013. – Т. 12. – С. 122-126.

70. Litthauer D., Ginster A., van Eeden Skein E. *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – Т. 30, № 2. – С. 209-215.

71. Nawani N., Kaur J. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33 // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2000. – Т. 206, № 1. – С. 91-96.

72. Сорокина К. Н., Нуриддинов М. А., Розанов А. С., Иванисенко В. А., Пельтек С. Е. Компьютерный анализ структуры липаз бактерий рода *Geobacillus* и выявление мотивов,

влияющих на их термостабильность // Вавиловский журнал генетики и селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4-3. – С. 666-674.

73. Kumar R., Sharma A., Kumar A., Singh D. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Properties // World Applied Sciences Journal. – 2012. – Т. 16, № 7. – С. 940-948.

74. Gricajeva A., Bendikienė V., Kalėdienė L. Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – Т. 92. – С. 96-104.

75. Ewis H. E., Abdelal A. T., Lu C.-D. Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus* // Gene. – 2004. – Т. 329. – С. 187-195.

76. Kaur G., Singh A., Sharma R., Sharma V., Verma S., Sharma P. K. Cloning, expression, purification and characterization of lipase from *Bacillus licheniformis*, isolated from hot spring of Himachal Pradesh, India // 3 Biotech. – 2016. – Т. 6, № 1. – С. 49.

77. Bradoo S., Saxena R. K., Gupta R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1999. – Т. 15, № 1. – С. 87-91.

78. Ramani K., Chockalingam E., Sekaran G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2010. – Т. 37, № 5. – С. 531-535.

79. Andersson R. E., Hedlund C. B., Jonsson U. Thermal Inactivation of a Heat-Resistant Lipase Produced by the Psychrotrophic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* // Journal of Dairy Science. – 1979. – Т. 62, № 3. – С. 361-367.

80. Sharma S., Kanwar S. S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications // The Scientific World Journal. – 2014. – Т. 2014. – С. 15.

81. Schmidt-Dannert C., Sztajer H., Stöcklein W., Menge U., Schmid R. D. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism. – 1994. – Т. 1214, № 1. – С. 43-53.

82. Sugihara A., Tani T., Tominaga Y. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus* sp // The Journal of Biochemistry. – 1991. – Т. 109, № 2. – С. 211-216.

83. Hun C. J., Rahman R. N. Z. A., Salleh A. B., Basri M. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase // Biochemical Engineering Journal. – 2003. – Т. 15, № 2. – С. 147-151.

84. Гумеров В. М., Марданов А. В., Колосов П. М., Равин Н. В. Выделение и функциональная характеристика липазы из термоалкалофильной бактерии *Thermosyntropha lipolytica* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – С. 376-382.

85. Ферменты: лабораторный практикум. / Гамаюрова В. С., Зиновьева М. Е. – Казань: Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2010. – 278 с.

86. Hertadi R., Widhyastuti H. Effect of Ca^{2+} Ion to the Activity and Stability of Lipase Isolated from *Chromohalobacter japonicus* BK-AB18 // Procedia Chemistry. – 2015. – Т. 16. – С. 306-313.

87. Bisht D., Yadav S. K., Darmwal N. S. An oxidant and organic solvent tolerant alkaline lipase by *P. aeruginosa* mutant: Downstream processing and biochemical characterization // Brazilian Journal of Microbiology. – 2013. – Т. 44, № 4. – С. 1305-1314.

88. Lestari P., Raharjo T. J., Matsjeh S., Haryadi W. Partial purification and biochemical characterization of extracellular lipase from *Azospirillum* sp. JG3 bacteria // AIP Conference Proceedings. – 2016. – Т. 1755, № 1. – С. 080003.

89. Dharmsthiti S., Pratuangdejkul J., Theeragool G., Luchai S. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 // The Journal of General and Applied Microbiology. – 1998. – Т. 44, № 2. – С. 139-145.

90. Jaeger K.-E., Ransac S., Dijkstra B. W., Colson C., van Heuvel M., Misset O. Bacterial lipases // FEMS Microbiology Reviews. – 1994. – Т. 15, № 1. – С. 29-63.

91. Hassing G. S. Partial purification and some properties of a lipase from *Corynebacterium acnes* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology. – 1971. – Т. 242, № 2. – С. 381-394.

92. Lanser A. C., Manthey L. K., Hou C. T. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein // Current Microbiology. – 2002. – Т. 44, № 5. – С. 336-340.

93. Kanmani P., Kumaresan K., Aravind J. Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase // Brazilian Journal of Microbiology. – 2015. – Т. 46, № 4. – С. 1235-1243.

94. Zheng J.-y., Wang J., Zhou S.-s., Li X.-j., Ying X.-x., Wang Z. A stereoselective esterase from *Bacillus megaterium*: Purification, gene cloning, expression and catalytic properties // Protein Expression and Purification. – 2017. – Т. 136. – С. 66-72.

95. Valero F. Heterologous Expression Systems for Lipases: A Review // Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols / Sandoval G. – Totowa, NJ: Humana Press, 2012. – С. 161-178.

96. Самойлова Ю. В., Тулупов А. А., Сорокина К. Н. Современные подходы к разработке новых ферментов липаз и продуцентов на их основе // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2014. – Т. 12, № 4. – С. 77-84.

97. Borrelli G. M., Trono D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Т. 16, № 9. – С. 20774-20840.

98. Høegh I., Patkar S., Halkier T., Hansen M. T. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae* // Canadian Journal of Botany. – 1995. – Т. 73, № S1. – С. 869-875.

99. Падкина М. В., Самбук Е. В. Генетически модифицированные микроорганизмы - продуценты биологически активных соединений // Экологическая генетика. – 2015. – Т. 13, № 2. – С. 36-57.

100. Villaverde A., Mar Carrió M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies // Biotechnology Letters. – 2003. – Т. 25, № 17. – С. 1385-1395.

101. de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli* // Microbial Cell Factories. – 2009. – Т. 8. – С. 26-26.

102. de Marco A., Deuerling E., Mogk A., Tomoyasu T., Bukau B. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli* // BMC Biotechnology. – 2007. – Т. 7. – С. 32-32.

103. Saibil H. R. Chaperone machines in action // Current Opinion in Structural Biology. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 35-42.

104. Quyen D. T., Schmidt-Dannert C., Schmid R. D. High-Level Formation of Active *Pseudomonas cepacia* Lipase after Heterologous Expression of the Encoding Gene and Its Modified Chaperone in *Escherichia coli* and Rapid In Vitro Refolding // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – Т. 65, № 2. – С. 787-794.

105. Shuo-shuo C., Xue-zheng L., Ji-hong S. Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948 // Protein Expression and Purification. – 2011. – Т. 77, № 2. – С. 166-172.

106. Datta S., Christena L. R., Rajaram Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials // 3 Biotech. – 2013. – Т. 3, № 1. – С. 1-9.

107. Sheldon R. A., van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how // Chemical Society Reviews. – 2013. – Т. 42, № 15. – С. 6223-6235.

108. Крякунова Е. В., Канарский А. В. Иммобилизация микроорганизмов и ферментов // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15, № 17. – С. 189-194.

109. Логинова О. О., Холявка М. Г., Артюхов В. Г. Физико-химические и кинетические свойства гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана // Биофармацевтический журнал. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 13-16.

110. Mitchell S., Pérez-Ramírez J. Mesoporous zeolites as enzyme carriers: Synthesis, characterization, and application in biocatalysis // Catalysis Today. – 2011. – Т. 168, № 1. – С. 28-37.

111. Cunha A. G., Fernández-Lorente G., Bevilaqua J. V., Destain J., Paiva L. M. C., Freire D. M. G., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase—a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2008. – Т. 146, № 1. – С. 49-56.

112. Palomo J. M., Segura R. L., Fernández-Lorente G., Pernas M., Rua M. L., Guisán J. M., Fernández-Lafuente R. Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus*

by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports // Biotechnology Progress. – 2008. – Т. 20, № 2. – С. 630-635.

113. Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes // Biotechnology, Biotechnological Equipment. – 2015. – Т. 29, № 2. – С. 205-220.

114. Ефременко Е. Н., Сенько О. В., Алескерова Л. Э., Аленина К. А., Мажуль М. М., Исмаилов А. Д. Биосенсоры на основе иммобилизованных в криогеле поливинилового спирта светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* для биомониторинга экотоксикантов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 5. – С. 490-496.

115. Гамаюрова В. С., Зиновьева М. Е., Елизарова Е. В., Васина К. Л. Иммобилизация и стабилизация ферментных препаратов липаз // Вестник Казанского технологического университета. – 2007. № 2. – С. 103-108.

116. Wen H., Nallathambi V., Chakraborty D., Calabrese Barton S. Carbon fiber microelectrodes modified with carbon nanotubes as a new support for immobilization of glucose oxidase // Microchimica Acta. – 2011. – Т. 175, № 3. – С. 283-289.

117. Wang Z.-G., Wan L.-S., Liu Z.-M., Huang X.-J., Xu Z.-K. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2009. – Т. 56, № 4. – С. 189-195.

118. Betigeri S. S., Neau S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads // Biomaterials. – 2002. – Т. 23, № 17. – С. 3627-3636.

119. Ковалева Т. А., Кожокина О. М., Багно О. П., Трофимова О. Д., Беленова А. С. Иммобилизация гидролитических ферментов на анионитах // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, № 6. – С. 1035-1041.

120. Soares Cleide M. F., Santana M. H. A., Zanin Gisella M., de Castro Heizir F. Covalent Coupling Method for Lipase Immobilization on Controlled Pore Silica in the Presence of Nonenzymatic Proteins // Biotechnology Progress. – 2008. – Т. 19, № 3. – С. 803-807.

121. Yilmaz E., Can K., Sezgin M., Yilmaz M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester // Bioresource Technology. – 2011. – Т. 102, № 2. – С. 499-506.

122. Ovsejevi K., Manta C., Batista-Viera F. Reversible Covalent Immobilization of Enzymes via Disulfide Bonds // Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition / Guisan J. M. – Totowa, NJ: Humana Press, 2013. – С. 89-116.

123. Горбунова А. Н., Максимова Ю. Г., Овечкина Г. В., Максимов А. Ю. Каталитические и стереоселективные свойства иммобилизованной амидазы *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 5. – С. 482-489.

124. Sheldon R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts // Biochemical Society Transactions. – 2007. – Т. 35, № 6. – С. 1583.

125. Cao L., Langen L. v., Sheldon R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? // Current Opinion in Biotechnology. – 2003. – Т. 14, № 4. – С. 387-394.

126. Yu H. W., Chen H., Wang X., Yang Y. Y., Ching C. B. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2006. – Т. 43, № 1. – С. 124-127.

127. Zhang Y., Pagilla K. Treatment of malathion pesticide wastewater with nanofiltration and photo-Fenton oxidation // Desalination. – 2010. – Т. 263, № 1. – С. 36-44.

128. Shayeghi M., Dehghani M. H., Alimohammadi M., Goodini K. Using Ultraviolet Irradiation for Removal of Malathion Pesticide in Water // Journal of Arthropod-Borne Diseases. – 2012. – Т. 6, № 1. – С. 45-53.

129. Kim Y.-H., Ahn J.-Y., Moon S.-H., Lee J. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase // Chemosphere. – 2005. – Т. 60, № 10. – С. 1349-1355.

130. Ibrahim W. M., Karam M. A., El-Shahat R. M., Adway A. A. Biodegradation and Utilization of Organophosphorus Pesticide Malathion by Cyanobacteria // BioMed Research International. – 2014. – Т. 2014. – С. 392682.

131. Лягин И. В., Ефременко Е. Н., Варфоломеев С. Д. Ферментные биосенсоры для определения пестицидов // Успехи химии. – 2017. – Т. 86, № 4. – С. 339-355.

132. Acharya K. P., Shilpkar P., Shah M. C., Chellapandi P. Biodegradation of Insecticide Monocrotophos by *Bacillus subtilis* KPA-1, Isolated from Agriculture Soils // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2015. – Т. 175, № 4. – С. 1789-1804.

133. Salunkhe V. P., Sawant I. S., Banerjee K., Rajguru Y. R., Wadkar P. N., Oulkar D. P., Naik D. G., Sawant S. D. Biodegradation of Profenofos by *Bacillus subtilis* Isolated from Grapevines (Vitis vinifera) // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – Т. 61, № 30. – С. 7195-7202.

134. Hussaini S. Z., Shaker M., Mohammed A. I. Isolation of Bacteria for Degradation of Selected Pesticides. // Advances in Bioresearch. – 2013. – Т. 4, № 3. – С. 82-85.

135. Pailan S., Gupta D., Apte S., Krishnamurthi S., Saha P. Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhattai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2015. – Т. 103. – С. 191-195.

136. Singh B., Kaur J., Singh K. Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Т. 28, № 3. – С. 1133-1141.

137. Biodegradation of Cypermethrin by Immobilized Cells of *Micrococcus* sp. strain CPN 1. / Tallur D. P., I. Mulla S., B. Megadi V., T P M., Ninnekar H., 2015.

138. Zheng C., Zhou J., Wang J., Qu B., Lu H., Zhao H. Aerobic degradation of nitrobenzene by immobilization of *Rhodotorula mucilaginosa* in polyurethane foam // Journal of Hazardous Materials. – 2009. – Т. 168, № 1. – С. 298-303.

139. Adhikari S., Chattopadhyay P., Ray L. Biosorption of Malathion by immobilized cells of *Bacillus* sp. S14 // Chemical Speciation & Bioavailability. – 2010. – Т. 22, № 4. – С. 271-276.

140. Diao J., Zhao G., Li Y., Huang J., Sun Y. Carboxylesterase from *Spodoptera Litura*: Immobilization and use for the Degradation of Pesticides // Procedia Environmental Sciences. – 2013. – Т. 18. – С. 610-619.

141. Заварухин С. Г., Иванова А. С., Кукушкин Р. Г., Лебедев М. Ю., Симонов А. Н., Шерстюк О. В., Яковлев В. А. Кинетика переэтерификации рапсового масла на гетерогенном барий-алюмооксидном катализаторе с учетом давления метанола // Катализ в промышленности. – 2013. № 3. – С. 67-74.

142. Зорин В. В., Петухова Н. И., Шахмаев Р. Н. Перспективные направления утилизации глицеринсодержащих отходов в производстве биодизельного топлива // Российский химический журнал. – 2011. – Т. 55, № 1. – С. 77-88.

143. Ишбаева А. У., Талипова Л. А., Шахмаев Р. Н., Вершинин С. С., Спирихин Л. В., Зорин В. В. Получение биодизеля кислотно-катализируемой переэтерификацией подсолнечного масла изопропиловым спиртом // Башкирский химический журнал. – 2009. – Т. 16, № 2. – С. 36-38.

144. Gog A., Roman M., Toşa M., Paizs C., Irimie F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives // Renewable Energy. – 2012. – Т. 39, № 1. – С. 10-16.

145. 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.

146. Пилигаев А. В., Сорокина К. Н., Пармон В. Н. Получение высокоэнергетической биомассы при гетеротрофной культивации микроводорослей в процессах водоочистки // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2015. – Т. 13, № 4. – С. 19-26.

147. Shimada Y., Watanabe Y., Samukawa T., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1999. – Т. 76, № 7. – С. 789-793.

148. Миннебаев Л. Ф., Юдина А. В., Емышаева Н. В., Вершинин С. С., Шахмаев Р. Н., Зорин В. В. Получение биодизельного топлива интерэтерификацией сурепного масла этилацетатом в присутствии Novozym 435 // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20, № 4. – С. 22-24.

149. Noureddini H., Gao X., Philkana R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil // Bioresource Technology. – 2005. – Т. 96, № 7. – С. 769-777.

150. Ognjanovic N., Bezbradica D., Knezevic-Jugovic Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability // Bioresource Technology. – 2009. – Т. 100, № 21. – С. 5146-5154.

151. Kumari V., Shah S., Gupta M. N. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from Madhuca indica // Energy & Fuels. – 2007. – Т. 21, № 1. – С. 368-372.

152. Xie W., Ma N. Immobilized Lipase on Fe3O4 Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production // Energy & Fuels. – 2009. – Т. 23, № 3. – С. 1347-1353.

153. Kawakami K., Oda Y., Takahashi R. Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude Jatropha oil // Biotechnology for Biofuels. – 2011. – Т. 4. – С. 42-42.

154. Gonzalo A., García M., Luis Sánchez J., Arauzo J., Peña J. Á. Water Cleaning of Biodiesel. Effect of Catalyst Concentration, Water Amount, and Washing Temperature on Biodiesel Obtained from Rapeseed Oil and Used Oil // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2010. – Т. 49, № 9. – С. 4436-4443.

155. Salis A., Pinna M., Monduzzi M., Solinas V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis // Journal of Biotechnology. – 2005. – Т. 119, № 3. – С. 291-299.

156. Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2000. – Т. 77, № 4. – С. 355-360.

157. Hama S., Tamalampudi S., Yoshida A., Tamadani N., Kuratani N., Noda H., Fukuda H., Kondo A. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production // Bioresource Technology. – 2011. – Т. 102, № 22. – С. 10419-10424.

158. Liu Y., Yan Y., Hu F., Yao A. n., Wang Z., Wei F. Transesterification for biodiesel production catalyzed by combined lipases: Optimization and kinetics // AIChE Journal. – 2009. – Т. 56, № 6. – С. 1659-1665.

159. Khor G. K., Sim J. H., Kamaruddin A. H., Uzir M. H. Thermodynamics and inhibition studies of lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification // Bioresource Technology. – 2010. – Т. 101, № 16. – С. 6558-6561.

160. Kim S. H., Kim S.-j., Park S., Kim H. K. Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – Т. 85-86. – С. 10-16.

161. Cai X., Ma J., Wei D.-z., Lin J.-p., Wei W. Functional expression of a novel alkaline-adapted lipase of *Bacillus amyloliquefaciens* from stinky tofu brine and development of immobilized enzyme for biodiesel production // Antonie van Leeuwenhoek. – 2014. – Т. 106, № 5. – С. 1049-1060.

162. Winayanuwattikuna P., Piriyakananona K., Wongsathonkittikunb P., Charoenpanich J. Immobilization of a thermophilic solvent-stable lipase from *Acinetobacter baylyi* and its potential for use in biodiesel production // ScienceAsia. – 2014. – Т. 40, № 4. – С. 327-334.

163. Narwal S. K., Saun N. K., Dogra P., Chauhan G., Gupta R. Production and Characterization of Biodiesel Using Nonedible Castor Oil by Immobilized Lipase from *Bacillus aerius* // BioMed Research International. – 2015. – Т. 2015. – С. 281934.

164. Abdulla R., Ravindra P. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude Jatropha curcas L. oil // Biomass and Bioenergy. – 2013. – Т. 56. – С. 8-13.

165. Li K., Fan Y., He Y., Zeng L., Han X., Yan Y. *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis // Scientific Reports. – 2017. – Т. 7, № 1. – С. 16473.

166. Godoy C. A. New Strategy for the Immobilization of Lipases on Glyoxyl–Agarose Supports: Production of Robust Biocatalysts for Natural Oil Transformation // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Т. 18, № 10. – С. 2130.

167. Mao Y., Yin T., Du W., Zhao X., Dai L., Liu D. High Level Expression of Lipase BTL2 by *Pichiapastoris* and Its Application for Biodiesel Production // Journal of Bioprocess Engineering and Biorefinery. – 2014. – Т. 3, № 3. – С. 177-181.

168. Гамаюрова В. С., Зиновьева М. Е., Шнайдер К. Л. Ферментативные методы модификации растительных масел // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – Т. 15, № 22. – С. 106.

169. Turan S., Karabulut I., Vural H. Influence of sn-1,3-lipase-catalysed interesterification on the oxidative stability of soybean oil-based structured lipids // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2006. – Т. 87, № 1. – С. 90-97.

170. Гамаюрова В. С., Черных М. Н. Мифы и реальность в пищевой промышленности. Часть 3. Конъюгированные транс-изомеры высших жирных кислот // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 17. – С. 210-213.

171. Torres C. F., Munir F., Blanco R. M., Otero C., Hill C. G. Catalytic transesterification of corn oil and tristearin using immobilized lipases from *Thermomyces lanuginosa* // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2002. – Т. 79, № 8. – С. 775-781.

172. Zhang H., Xu X., Mu H., Nilsson J., Adler-Nissen J., Høy C. E. Lipozyme IM-catalyzed interesterification for the production of margarine fats in a 1 kg scale stirred tank reactor // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2000. – Т. 102, № 6. – С. 411-418.

173. Lai O. M., Ghazali H. M., Chong C. L. Effect of enzymatic transesterification on the melting points of palm stearin-sunflower oil mixtures // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1998. – Т. 75, № 7. – С. 881-886.

174. Розанов А. С., Пельтек С. Е., Сорокина К. Н. Штамм бактерии Escerichia coli xl1-blue/pqs-g3, продуцент термостабильной липазы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* G3 // Book Штамм бактерии Escerichia coli xl1-blue/pqs-g3, продуцент термостабильной липазы бактерии Geobacillus stearothermophilus G3 / Editor. – РФ.

175. OECD. Guidelines for Testing of Chemicals Simulation Tests-Aerobic Sewage Treatment. Technical Report. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) //. – 1996. – С. 19-142.

176. 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. – Т. 250. – С. 538-547.

177. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Research. – 1997. – Т. 25, № 17. – С. 3389-3402.

178. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution. – 1987. – Т. 4, № 4. – С. 406-425.

179. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – Т. 30, № 12. – С. 2725-2729.

180. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling // Bioinformatics. – 2006. – Т. 22, № 2. – С. 195-201.

181. Laskowski R. A., Macarthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. {PROCHECK}: a program to check the stereochemical quality of protein structures // J. Appl. Cryst. – 1993. – Т. 26. – С. 283-291.

182. Zheng L., Baumann U., Reymond J.-L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol // Nucleic Acids Research. – 2004. – Т. 32, № 14. – С. e115-e115.

183. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Т. 227. – С. 680.

184. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. – 1976. – Т. 72, № 1. – С. 248-254.

185. Eom G. T., Song J. K., Ahn J. H., Seo Y. S., Rhee J. S. Enhancement of the Efficiency of Secretion of Heterologous Lipase in *Escherichia coli* by Directed Evolution of the ABC Transporter System // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Т. 71, № 7. – С. 3468-3474.

186. Kim M. H., Park S., Kim Y. H., Won K., Lee S. H. Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – Т. 97, № Supplement C. – С. 209-214.

187. Liang W. Q., Wang Z. Y., Li H., Wu P. C., Hu J. M., Luo N., Cao L. X., Liu Y. H. Purification and Characterization of a Novel Pyrethroid Hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11 // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Т. 53, № 19. – С. 7415-7420.

188. Lawton J. M., Doonan S. Thermal inactivation and chaperonin-mediated renaturation of mitochondrial aspartate aminotransferase // Biochemical Journal. – 1998. – Т. 334, № 1. – С. 219.

189. Xu Z., Liu S., Lu X., Rao S., Kang Z., Li J., Wang M., Chen J. Thermal inactivation of a recombinant lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* BBE in the absence and presence of additives // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2014. – Т. 94, № 9. – С. 1753-1757.

190. ГОСТ 16190-70. Сорбенты. Метод определения насыпной плотности // Book ГОСТ 16190-70. Сорбенты. Метод определения насыпной плотности / Editor, 1971. – С. 7.

191. Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Shayakhmetova I., Cohen Z. Biosynthesis of eicosapentaenoic acid (EPA) in the freshwater eustigmatophyte *Monodus subterraneus* (eustigmatophyceae) // Journal of Phycology. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 745-756.

192. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, 4th Ed. – Champaign: American Oil Chemists' Society, 1993.

193. Ghazali H. M., Hamidah S., Che Man Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases // Journal of the American Oil Chemists’ Society. – 1995. – Т. 72, № 6. – С. 633-639.

194. Paquot C. 2.301 - Preparation of the Fatty Acid Methyl Esters // Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives (Sixth Edition)Pergamon, 1979. – С. 96-102.

195. Torres S., Martínez M. A., Pandey A., Castro G. R. An organic-solvent-tolerant esterase from thermophilic *Bacillus licheniformis* S-86 // Bioresource Technology. – 2009. – Т. 100, № 2. – С. 896-902.

196. Madan B., Mishra P. Directed evolution of *Bacillus licheniformis* lipase for improvement of thermostability // Biochemical Engineering Journal. – 2014. – Т. 91. – С. 276-282.

197. Yang Z., Zhang Y., Shen T., Xie Y., Mao Y., Ji C. Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSL family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2 // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2013. – Т. 115, № 2. – С. 133-137.

198. Handrick R., Reinhardt S., Focarete M. L., Scandola M., Adamus G., Kowalczuk M., Jendrossek D. A New Type of Thermoalkalophilic Hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with High Specificity for Amorphous Polyesters of Short Chain-length Hydroxyalkanoic Acids // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Т. 276, № 39. – С. 36215-36224.

199. Charbonneau D. M., Beauregard M. Role of Key Salt Bridges in Thermostability of *G. thermodenitrificans* EstGtA2: Distinctive Patterns within the New Bacterial Lipolytic Enzyme Family XV // PLOS ONE. – 2013. – Т. 8, № 10. – С. e76675.

200. Samoylova Y. V., Sorokina K. N., Romanenko M. V., Parmon V. N. Cloning, expression and characterization of the esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* which belongs to a new lipase family XVIII // Extremophiles. – 2018.10.1007/s00792-018-0996-9.

201. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* // Current Opinion in Biotechnology. – 1999. – Т. 10, № 5. – С. 411-421.

202. Singh S. M., Panda A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2005. – Т. 99, № 4. – С. 303-310.

203. Vallejo L. F., Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins // Microbial Cell Factories. – 2004. – Т. 3. – С. 11-11.

204. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies // Protein Expression and Purification. – 2003. – Т. 28, № 1. – С. 1-8.

205. Mats H. Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms // Current Protein & Peptide Science. – 2000. – Т. 1, № 2. – С. 209-235.

206. Brod F. C. A., Vernal J., Bertoldo J. B., Terenzi H., Arisi A. C. M. Cloning, Expression, Purification, and Characterization of a Novel Esterase from *Lactobacillus plantarum* // Molecular Biotechnology. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 242-249.

207. Zhu Y., Zheng W., Ni H., Liu H., Xiao A., Cai H. Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6 // Journal of Basic Microbiology. – 2015. – Т. 55, № 10. – С. 1219-1231.

208. Mnisi S. M., Louw M. E., Theron J. Cloning and Characterization of a Carboxylesterase from *Bacillus coagulans* 81-11 // Current Microbiology. – 2005. – Т. 50, № 4. – С. 196-201.

209. Ateşlier Z. B. B., Metin K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp // Enzyme and Microbial Technology. – 2006. – Т. 38, № 5. – С. 628-635.

210. Alvarez-Macarie E., Augier-Magro V., Baratti J. Characterization of a Thermostable Esterase Activity from the Moderate Thermophile *Bacillus licheniformis* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 1999. – Т. 63, № 11. – С. 1865-1870.

211. Kakugawa S., Fushinobu S., Wakagi T., Shoun H. Characterization of a thermostable carboxylesterase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Т. 74, № 3. – С. 585-591.

212. Sørensen H. P., Mortensen K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* // Microbial Cell Factories. – 2005. – Т. 4. – С. 1-1.

213. Samoylova Y., Sorokina K., Piligaev A., Parmon V. Preparation of Stable Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of a *Ureibacillus thermosphaericus* Esterase for Application in Malathion Removal from Wastewater // Catalysts. – 2018. – Т. 8, № 4. – С. 154.

214. Mogk A., Mayer Matthias P., Deuerling E. Mechanisms of Protein Folding: Molecular Chaperones and Their Application in Biotechnology // ChemBioChem. – 2002. – Т. 3, № 9. – С. 807-814.

215. Schlieker C., Bukau B., Mogk A. Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology // Journal of Biotechnology. – 2002. – Т. 96, № 1. – С. 13-21.

216. Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rüdiger S., Röder D., Langen H., Bukau B. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB // The EMBO Journal. – 1999. – Т. 18, № 24. – С. 6934-6949.

217. Sheldon R. A. Cross-Linked Enzyme Aggregates as Industrial Biocatalysts // Organic Process Research & Development. – 2011. – Т. 15, № 1. – С. 213-223.

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

219. Ebrahimpour A., Rahman R. N. Z. R. A., Basri M., Salleh A. B. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM // Bioresource Technology. – 2011. – Т. 102, № 13. – С. 6972-6981.

220. Mangas-Sánchez J., Adlercreutz P. Highly efficient enzymatic biodiesel production promoted by particle-induced emulsification // Biotechnology for Biofuels. – 2015. – Т. 8. – С. 58.

221. Bhardwaj K. K., Saun N. K., Gupta R. Immobilization of Lipase from *Geobacillus* sp. and Its Application in Synthesis of Methyl Salicylate // Journal of Oleo Science. – 2017. – Т. 66, № 4. – С. 391-398.

222. Badillo-Zeferino G. L., Ruiz-López I. I., Oliart-Ros R., Sánchez-Otero M. G. Improved expression and immobilization of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermostable recombinant lipase // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2015. – Т. 64, № 1. – С. 62-69.

223. Mendes A. A., Oliveira P. C., Vélez A. M., Giordano R. C., Giordano R. d. L. C., de Castro H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis // International Journal of Biological Macromolecules. – 2012. – Т. 50, № 3. – С. 503-511.

224. Khanahmadi S., Yusof F., Amid A., Mahmod S. S., Mahat M. K. Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa pod husk // Journal of Biotechnology. – 2015. – Т. 202, № Supplement C. – С. 153-161.

225. Zheng G.-W., Yu H.-L., Li C.-X., Pan J., Xu J.-H. Immobilization of *Bacillus subtilis* esterase by simple cross-linking for enzymatic resolution of dl-menthyl acetate // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2011. – Т. 70, № 3. – С. 138-143.

226. Nadar S. S., Muley A. B., Ladole M. R., Joshi P. U. Macromolecular cross-linked enzyme aggregates (M-CLEAs) of α-amylase // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – Т. 84. – С. 69-78.

227. Mahmod S. S., Yusof F., Jami M. S., Khanahmadi S., Shah H. Development of an immobilized biocatalyst with lipase and protease activities as a multipurpose cross-linked enzyme aggregate (multi-CLEA) // Process Biochemistry. – 2015. – Т. 50, № 12. – С. 2144-2157.

228. Dong T., Zhao L., Huang Y., Tan X. Preparation of cross-linked aggregates of aminoacylase from *Aspergillus melleus* by using bovine serum albumin as an inert additive // Bioresource Technology. – 2010. – Т. 101, № 16. – С. 6569-6571.

229. Gupta R., Beg Q., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2002. – Т. 59, № 1. – С. 15-32.

230. Torres M. P. G., Foresti M. L., Ferreira M. L. Effect of different parameters on the hydrolytic activity of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of lipase from *Thermomyces lanuginosa* // Biochemical Engineering Journal. – 2013. – Т. 72, № Supplement C. – С. 18-23.

231. Li Q., Zheng G., Li Z., Yu K. Efficient Approximation of P-value of the Maximum of Correlated Tests, with Applications to Genome-Wide Association Studies // Annals of Human Genetics. – 2008. – Т. 72, № 3. – С. 397-406.

232. Han J. Y., Kim H. Transesterification using the cross-linked enzyme aggregate of *Photobacterium lipolyticum* lipase M37 // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Т. 21, № 11. – С. 1159-1165.

233. Kartal F., Kilinc A. Crosslinked aggregates of *Rhizopus oryzae* lipase as industrial biocatalysts: Preparation, optimization, characterization, and application for enantioselective resolution reactions // Biotechnology Progress. – 2012. – Т. 28, № 4. – С. 937-945.

234. Talekar S., Waingade S., Gaikwad V., Patil S., Nagavekar N. Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase // Journal of Biochemical Technology. – 2012. – Т. 3, № 4. – С. 349-353.

235. Tükel S. S., Hürrem F., Yildirim D., Alptekin Ö. Preparation of crosslinked enzyme aggregates (CLEA) of catalase and its characterization // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2013. – Т. 97, № Supplement C. – С. 252-257.

236. Yu C.-Y., Li X.-F., Lou W.-Y., Zong M.-H. Cross-linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: A highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides // Journal of Biotechnology. – 2013. – Т. 166, № 1. – С. 12-19.

237. Jang E., Ryu B., Kim T. Identification, Characterization, and Immobilization of an Organic Solvent-Stable Alkaline Hydrolase (PA27) from *Pseudomonas aeruginosa* MH38 // Molecules. – 2014. – Т. 19, № 9. – С. 14396.

238. Ju H., Ryu B. H., Doohun Kim T. Identification, characterization, immobilization of a novel type hydrolase (LmH) from *Listeria monocytogenes* // International Journal of Biological Macromolecules. – 2015. – Т. 72, № Supplement C. – С. 63-70.

239. Xu D.-Y., Yang Y., Yang Z. Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media // Journal of Biotechnology. – 2011. – Т. 152, № 1. – С. 30-36.

240. Mahmod S. S., Yusof F., Jami M. S., Khanahmadi S. Optimizing the preparation conditions and characterization of a stable and recyclable cross-linked enzyme aggregate (CLEA)-protease // Bioresources and Bioprocessing. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 3.

241. Schofield D. A., DiNovo A. A. Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – Т. 109, № 2. – С. 548-557.

242. Luković N., Knežević-Jugović Z., Bezbradica D. Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils: Recent Trends, Challenges and Future Perspectives // Alternative Fuel / Manzanera M.IntechOpen, 2011.

243. Wang L., Du W., Liu D., Li L., Dai N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2006. – Т. 43, № 1–4. – С. 29-32.

244. Lu J., Nie K., Xie F., Wang F., Tan T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125 // Process Biochemistry. – 2007. – Т. 42, № 9. – С. 1367-1370.

245. Zheng Y., Quan J., Ning X., Zhu L.-M., Jiang B., He Z.-Y. Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – Т. 25, № 1. – С. 41.

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

247. Sun J., Yu B., Curran P., Liu S.-Q. Lipase-catalysed transesterification of coconut oil with fusel alcohols in a solvent-free system // Food Chemistry. – 2012. – Т. 134, № 1. – С. 89-94.

248. Jenab E., Temelli F., Curtis J. M. Lipase-catalysed interesterification between canola oil and fully hydrogenated canola oil in contact with supercritical carbon dioxide // Food Chemistry. – 2013. – Т. 141, № 3. – С. 2220-2228.

249. Otero C., López-Hernandez A., García H. S., Hernández-Martín E., Hill C. G. Continuous enzymatic transesterification of sesame oil and a fully hydrogenated fat: Effects of reaction conditions on product characteristics // Biotechnology and Bioengineering. – 2006. – Т. 94, № 5. – С. 877-887.

250. Colla L. M., Ficanha A. M. M., Rizzardi J., Bertolin T. E., Reinehr C. O., Costa J. A. V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation // BioMed Research International. – 2015. – Т. 2015. – С. 725959.

251. Neff W. E., El-Agaimy M. A., Mounts T. L. Oxidative stability of blends and interesterified blends of soybean oil and palm olein // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 1994. – Т. 71, № 10. – С. 1111-1116.

252. Sellami M., Ghamgui H., Frikha F., Gargouri Y., Miled N. Enzymatic transesterification of palm stearin and olein blends to produce zero-trans margarine fat // BMC Biotechnology. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 48.

253. Kalantari M., Kazemeini M., Arpanaei A. Evaluation of biodiesel production using lipase immobilized on magnetic silica nanocomposite particles of various structures // Biochemical Engineering Journal. – 2013. – Т. 79. – С. 267-273.

254. Xu W. D. J. Z., Dehua Liu Y. Conversion of Soybean Oil to Biodiesel Fuel Using Lipozyme TL IM in a Solvent-free Medium // Biocatalysis and Biotransformation. – 2004. – Т. 22, № 1. – С. 45-48.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

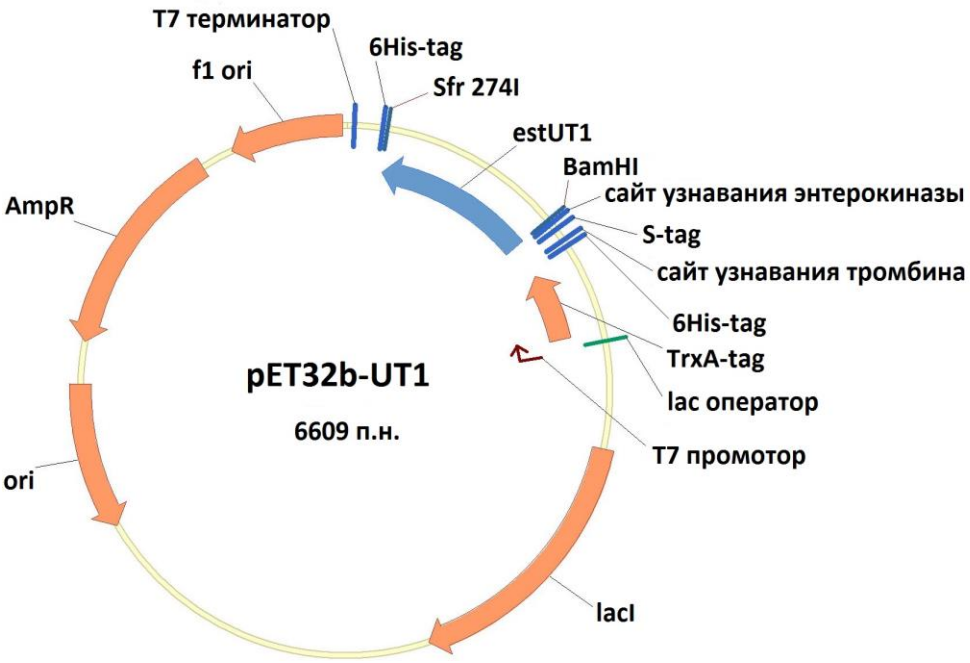

Рисунок 1 – Карта генетической конструкции pET32b-UT1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

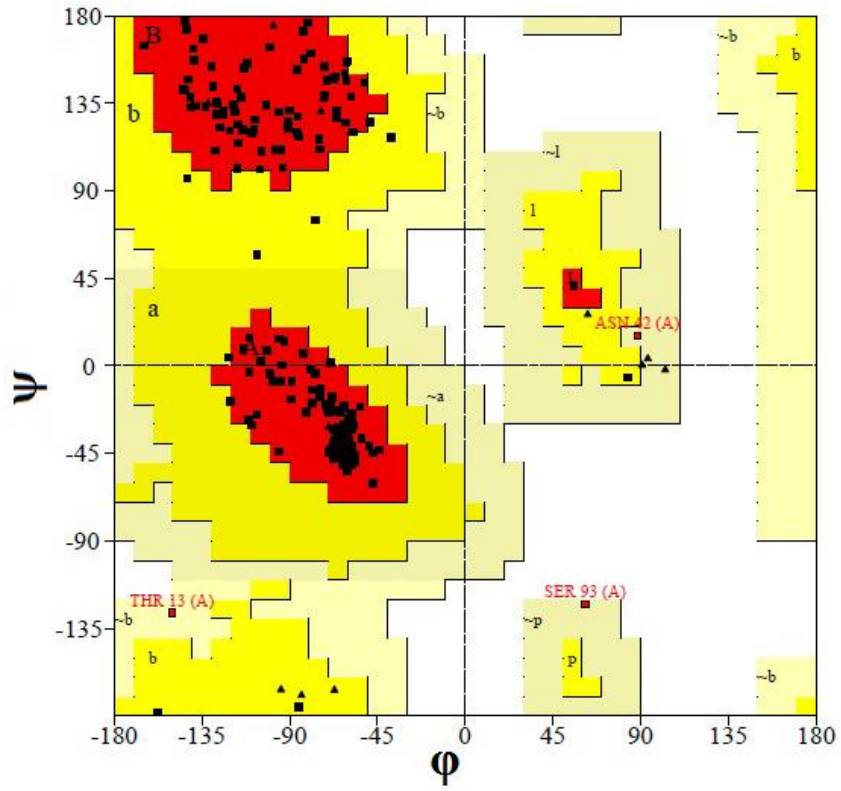

Рисунок 1 – Карта Рамачандрана для аминокислотных остатков эстеразы estUT1

Остатки в наиболее благоприятных областях [A, B, L]	201	93,9%
Остатки в разрешенных областях [a, b, l, p]	10	4,7%
Остатки в допустимых областях [~ a, ~ b, ~ l, ~ p]	3	1,4%
Остатки в запрещенных областях	0	0%
Количество остатков (за исключением Gly и Pro)	214	100%
Количество концевых остатков (за исключением Gly и Pro)	2	
Количество остатков Gly (показано треугольниками)	16	
Количество остатков Pro	10	
Общее количество остатков	242	

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность академику РАН, д.х.н., профессору Пармону Валентину Николаевичу за всестороннюю поддержку в ходе работы и научному руководителю к.б.н. Сорокиной Ксении Николаевне за помощь в работе над диссертацией.

Автор также глубоко признательна Лаборатории молекулярных биотехнологии ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН в лице к.б.н. Розанова А.С. и заведующего лабораторией, к.б.н. Пельтека С. Е. за предоставленный штамм *E. coli* B-1298, использованный в работе, к.х.н. Шашкову М.В. за исследования образцов методом ГХ-МС и помощь в обработке и интерпретации результатов, Пилигаеву А.В. за помощь в проведении анализов методом ВЭЖХ-МС и советы по интерпретации результатов, а также Самойловой Г.П. и Самойлову В.Н. за постоянную поддержку.