

На правах рукописи

КУЗЬМИН ДЕНИС ВЛАДИМИРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ПО ПОЛУЧЕНИЮ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

1.5.6. Биотехнология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Долгопрудный - 2025

Работа выполнена в лаборатории трансляционной геномной биоинформатики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Научный консультант: **Буздин Антон Александрович**, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией трансляционной геномной биоинформатики, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Официальные оппоненты: **Алешкин Андрей Владимирович**, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор РАН, директор по новым продуктам Общества с ограниченной ответственностью «Орфан-Био»)

Гайсина Лира Альбертовна, доктор биологических наук, доцент, научный руководитель отдела научной работы, профессор кафедры биоэкологии и биологического образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы»

Ревин Виктор Васильевич, доктор биологических наук, профессор, декан Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Защита состоится «24» апреля 2025 года в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.016.01 (Д 006.027.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) по адресу 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, тел. +7(499)976-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ <http://www.vniisb.ru/ru/council/>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Романов Дмитрий Викторович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Фотосинтезирующие микроорганизмы (эукариотические микроводоросли, цианобактерии и анаэробные фототрофные бактерии) - это одноклеточные или колониальные организмы, обитающие как в пресноводных, так и солоноводных и морских водоемах, использующие световую энергию и превращающие воду и диоксид углерода в органические вещества (Demirel, Z. et al. 2018).

Микроводоросли обладают значительным биотехнологическим потенциалом, так как являются одними из самых быстрорастущих фотосинтезирующих микроорганизмов на Земле (Olasehinde, T. A. et al. 2017), (Rozenberg, J. M. et al. 2024). Их культивирование требует относительно небольшого объема воды и может осуществляться на территориях, непригодных для сельского хозяйства. Кроме того, рост биомассы микроводорослей сопровождается поглощением углекислого газа и выделением кислорода (Demirel, Z. et al. 2018).

Микроводоросли способны синтезировать широкий спектр различных соединений, таких как белки, углеводы, липиды, витамины, пигменты и другие. Более 1000 биологически активных веществ выделены из микроводорослей. Среди них соединения, обладающие антиоксидантными, антибактериальными, противовирусными, противоопухолевыми, регенерирующими, гипотензивными, нейропротекторными и иммуностимулирующими эффектами (Gürlek, C. et al. 2019). Биопродукты из микроводорослей могут быть крайне востребованы в различных отраслях: сельское хозяйство, химическая промышленность, энергетика, фармацевтика и медицина (Bhattacharjee M. 2016).

Тем не менее, получение новых биопродуктов из фотосинтезирующих микроорганизмов сталкивается с рядом проблем:

- ограниченность понимания фундаментальных аспектов метаболизма микроводорослей, требующая применения новых комплексных междисциплинарных подходов;
- сфокусированность на оптимизации свойств известных промышленных штаммов микроводорослей или поиск нового штамма, но в качестве продуцента известного коммерчески успешного биопродукта;
- отсутствие универсальных протоколов культивирования, связанное с огромным числом видов и разнообразием занимаемых экологических ниш;
- низкая воспроизводимость скорости роста и продуктивности штамма в лабораторных и промышленных условиях культивирования.

В связи с этим актуальным является поиск комплексных рентабельных подходов для обнаружения, идентификации и промышленного культивирования микроводорослей-продуцентов ценных соединений.

Такие задачи требуют разработки новых подходов как с точки зрения организации научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, так и с точки зрения промышленного производства.

Ответом на существующие ограничения научно-исследовательского процесса может стать внедрение платформенных решений, интегрирующих в себе различные методы и позволяющих более эффективно решать поставленные задачи. В рамках этого подхода биотехнологические платформы определяются как совокупность технологий, методов и инструментов, которые используются для разработки и производства биопродуктов. Эти платформы могут включать в себя различные подходы, такие как генетическая инженерия, клеточные технологии, методы

микробиологии и биохимии (Deep-dive into platform biotech companies: phenotypes, business models, destinations. URL: <https://biodraft.substack.com/p/deep-dive-into-platform-biotech-companies>).

С точки зрения решаемой задачи важнейшими характеристиками биотехнологических платформ являются:

1. Многофункциональность: платформы могут использоваться для разработки различных продуктов - от биотоплива до вакцин. В отличие от традиционных подходов, когда весь процесс настроен на получение одного конкретного продукта, платформенные решения позволяют создавать множество новых соединений, обеспечивая непрерывный поток инноваций.

2. Инновационность: платформы легко интегрируют в себя передовые методы и инструменты, такие как, например, CRISPR для редактирования генома и машинное обучение для анализа больших данных.

3. Гибкость: платформы могут быть адаптированы к различным источникам (известным ранее или неисследованным штаммам) и искомым продуктам (биотопливо и фармацевтические препараты).

4. Междисциплинарность: биотехнологические платформы развиваются на стыке различных дисциплин, таких как микробиология, биохимия, геномная инженерия и биоинформатика.

С точки зрения промышленного использования микроводорослей существующие технологические решения разделяются на два типа: ориентированные на низкомаржинальные продукты - использование непосредственно биомассы (флокулянты, кормовые добавки); ориентированные на высокомаржинальные продукты - выделение биологически активных веществ (антиоксиданты, полиненасыщенные жирные кислоты). В то же время, более перспективным подходом является объединение всех этапов переработки биомассы в непрерывную цепочку, ориентированную на последовательное извлечение всего спектра биопродуктов различной добавочной стоимости (по аналогии с нефтепереработкой). Для достижения экономической эффективности процессы промышленного производства продуктов из биомассы микроводорослей должны отличаться устойчивостью, гибкостью, низкими энергетическими затратами и легкостью адаптации к различным характеристикам штаммов.

Степень разработанности темы исследования

Микроводоросли используют в промышленной биотехнологии уже более пятидесяти лет, при этом потенциал этих микроорганизмов остается в значительной степени не раскрытым как с точки зрения источника новых биологически активных молекул, так и с точки зрения максимизации выхода целевого продукта.

На сегодняшний день для изучения в лабораторных условиях доступно порядка 4500 видов микроводорослей. При этом промышленно культивируется лишь несколько десятков штаммов (Sinetova, M.A. et al. 2020). Большая часть исследований посвящена оптимизации свойств уже известных штаммов-продуцентов. Как правило, речь идет о создании клонотек мутантов, среди которых путем массового скрининга по определенному генетическому или фенотипическому признаку отбирается лучший. Параллельно с этим проводятся работы по оптимизации условий промышленного культивирования с целью повышения выхода целевого метаболита: минерального состава среды, интенсивности и режима освещения, конструкции фотобиореактора и др.

Для получения оригинальных метаболитов из известных штаммов-продуцентов обычно проводят радикальное изменение параметров культивирования. Под действием экстремальных внешних факторов пластичный метаболизм микроводорослей переключается на синтез оригинальных молекул. Крайне редко удастся обнаружить новый дикий штамм-продуцент биологически активных молекул (Georgianna, D. R. et al. 2012). Для этого часто применяют широкомасштабный скрининг культуральной среды или экстрактов оригинальных микроводорослей.

Отдельной проблемой по-прежнему является выделение и идентификация вещества, ответственного за тот или иной биологический эффект (антибактериальный, противоопухолевый, противовоспалительный и др.). Большая часть исследований ограничивается описанием эффектов той или иной фракции (водной или спиртовой, к примеру), что связано с высокими рисками для исследователя: большие денежные и временные затраты, вероятность переоткрыть известную молекулу.

Кроме того, значения продуктивности, получаемые в лабораторных условиях, как правило, не коррелируют с выходом целевого вещества при промышленном культивировании.

На сегодняшний день предсказательная *in silico* аналитика по новым перспективным продуцентам сводится к поиску филогенетически близких штаммов (на основе анализа последовательностей генов 18S рРНК) или анализу научных публикаций и патентов.

На текущем этапе развития биотехнологии микроводорослей большинство предприятий, как правило, сосредоточены на получении монопродукта из биомассы. Вследствие этого разрабатываются технологии, оптимизированные для получения максимальной прибыли от реализации лишь этого вещества.

Цель и задачи исследования

Цель работы - создание биотехнологической платформы для получения биологически активных соединений из фотосинтезирующих микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. изучение биохимического состава штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов-продуцентов биотехнологически значимых продуктов;
2. изучение влияния условий культивирования (освещенность и состав среды культивирования) на накопление липидов и пигментов для отдельных представителей микроводорослей;
3. оценка продуктивности выделенных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов в условиях полупромышленного культивирования;
4. изучение возможности использования биомассы выделенных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов в аквакультуре;
5. изучение антимикробных веществ, продуцируемых фотосинтезирующими микроорганизмами;
6. разработка методов широкомасштабного скрининга экстрактов фотосинтезирующих микроорганизмов для выявления биологически активных молекул.

Научная новизна работы

Впервые выделен и охарактеризован наиболее эффективный штамм-продуцент коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина. Определены оптимальные условия

культивирования *Mallomonas furtiva* SBV13, позволяющие достичь содержания фукоксантина 26,6 мг/г.

Впервые выделен и охарактеризован наиболее эффективный штамм-продуцент омега-3 эйкозапентаеновой жирной кислоты (ЭПК) - *Vischeria magna* SBV108. Определены оптимальные условия культивирования *Vischeria magna* SBV108, позволяющие достичь содержания ЭПК 46,1 мг/г. Согласно проведенному анализу литературы, *Vischeria magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом ЭПК среди пресноводных и почвенных микроводорослей по показателю удельного содержания (мг/г) в условиях интенсивного культивирования.

Разработан прототип стартерного корма для выращивания мальков красной тилипии на основе Supreme-15 (Alltech Coppens) и биомассы микроводорослей *Mallomonas furtiva* SBV13 и *Vischeria magna* SBV108. Показано, что добавление 10 % по весу биомассы *Vischeria magna* SBV108, богатой омега-3 эйкозапентаеновой кислотой, улучшило конверсию корма, ростовые характеристики малька, эффективность использования белка и энергии более чем на 20 %.

Впервые из культуральной жидкости микроводоросли *Dunaliella salina* в консорциуме с гетеротрофными микроорганизмами выделен и охарактеризован антибиотик нового класса - этил-3-[(4-метил-пиперазин-1-ил)дiazенил]-1Н-индол-2-карбоксилат, эффективный против метициллин-резистентного золотистого стафилококка. Разработана методика химического синтеза исходной молекулы (BX-SI001), проведена hit-to-lead оптимизация и доклинические исследования лучшего производного BX-SI043.

Впервые для определения биологической активности и поиска молекулярных мишеней экстрактов из биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов использована технология Онкобокс. Ранее данная платформа использовалась только для предсказания эффективности таргетной противоопухолевой терапии на основе данных транскриптома онкопациента. Потенциал предиктивной аналитики данной технологии был валидирован в отношении цитотоксической активности тотальных экстрактов биомассы микроводорослей и цианобактерий.

При помощи данной технологии разработаны и верифицированы новые подходы для масштабного скрининга экстрактов биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов, включающие предсказательную аналитику содержания биологически активных соединений.

Предложена оригинальная модель биотехнологической платформы, которая позволяет: осуществлять предсказательную аналитику содержания биологически активных соединений в экстрактах микроорганизмов на основе транскриптомных данных; идентифицировать активные метаболиты; выполнять химическую модификацию метаболитов для улучшения их свойств; осуществлять биотехнологическое производство в полупромышленном масштабе.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выделен и охарактеризован новый штамм зеленой микроводоросли *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11, содержание и состав липидов в котором делает его эффективным сырьем для производства биодизельного топлива. Биодизельное топливо является перспективной альтернативой традиционным ископаемым видам топлива благодаря своей экологической чистоте, возобновляемости и способности снижать выбросы парниковых газов по сравнению с традиционными ископаемыми видами топлива. Было показано, что при культивировании в условиях азотного и/или фосфорного голодания происходит увеличение содержания липидов с 17 % до 59 % от сухой биомассы.

B. bullatus MZ-Ch11 превосходит все ранее описанные маслянистые зеленые водоросли и сопоставим с наиболее эффективным промышленным-продуцентом липидов *Nannochloropsis oceanica* - 64,3 % сухой биомассы (Mandal, S. et al. 2009), (Wan, C. et al. 2013).

Разработан регламент полупромышленного культивирования *B. bullatus* MZ-Ch11 в закрытом панельном фотобиореакторе Lumian AGS с суммарным полезным объём до 260 л. Показано, что при двухнедельном культивировании в условиях десятикратного снижения и полного отсутствия в среде нитратов и фосфатов, соответственно, волюметрический выход липидов достигал 80 мг/л/день.

Обнаружен и охарактеризован новый штамм-продуцент коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина *Mallomonas furtiva* SBV13, определены оптимальные условия культивирования, позволяющие достичь содержания фукоксантина 26,6 мг/г сухой биомассы. Благодаря своим антиоксидантным свойствам, фукоксантин активно используется в космецевтике (средства ухода за кожей) и нутрицевтике (функциональные добавки).

Разработан регламент полупромышленного культивирования *Mallomonas furtiva* SBV13 в закрытом панельном фотобиореакторе Lumian AGS с суммарным полезным объемом до 260 л. Показано, что при интенсивности освещения 120 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, температурном диапазоне от 16 °C до 30 °C, нейтральных pH, концентрации нитратов и фосфатов от 5 до 10 и от 0,5 до 5 ммоль/л, соответственно, волюметрический выход фукоксантина составил 3,7 мг/л/день. Полученные значения сопоставимы или превосходят аналогичные величины для волюметрического выхода фукоксантина при полупромышленном и промышленном культивировании *P. tricornutum* (от 7 до 12 мг/л) (Guler, B. A. et al. 2019), (Megía-Hervás, I. et al. 2020). На сегодняшний день, фукоксантин чаще всего выделяют из бурых водорослей, таких как *Fucus vesiculosus* и *Laminaria japonica*. Однако, содержание этого пигмента в макроводорослях редко превышает 2 % от сухого веса, варьируя от 172 до 720 мг/кг.

Анализ литературных данных, а также изучение собственной коллекции микроводорослей (более 200 штаммов, включающих 14 классов) позволил показать, что наиболее перспективными для промышленного производства фукоксантина являются три группы микроводорослей: диатомовые (содержание фукоксантина до 21,67 мг/г сухой массы), *Chrysophyceae* (до 26,6 мг/г сухой массы) и *Prymnesiophyceae* (до 18,23 мг/г сухого веса).

Сравнительный анализ *Mallomonas furtiva* SBV13 с другими промышленными продуцентами фукоксантина (*Phaeodactylum tricornutum* и *Isochrysis aff. Galbana*) показал его преимущества как с точки зрения продуктивности фукоксантина (мг/г сухой биомассы), так и с точки зрения скорости накопления биомассы (г сухой биомассы/ л культуральной среды) (Guler, B. A. et al. 2019).

Охарактеризован новый пресноводный штамм-продуцент омега-3 эйкозапентаеновой кислотой (ЭПК) - *Vischeria magna* SBV108. Эйкозапентаеновая кислота - это полиненасыщенная жирная кислота класса омега-3, обладающая важным значением для здоровья человека, особенно для сердечно-сосудистой системы.

Анализ существующих данных позволяет утверждать, что *Vischeria magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом среди всех почвенных и пресноводных микроводорослей. Содержание ЭПК в биомассе *Vischeria magna* SBV108 составляет 46,1 мг/г сухого веса. Среди солоноводных штаммов только для *Nannochloropsis oceanica* CY2 показано большее содержание ЭПК - 55,7 мг/г сухого веса (Chen C.-Y. et al. 2013).

Показано, что в условиях культивирования *Vischeria magna* SBV108 в закрытом панельном фотобиореакторе Lumian AGS с суммарным полезным объемом до 260 л

волюметрическая продуктивность составляет 13,4 мг/л/день. Согласно этим данным, волюметрическая продуктивность *Vischeria magna* SBV108 превышает таковую для *Nannochloropsis oceanica* CY2 почти на 30 % (Chen, C. Y. et al. 2018) и находится в диапазоне полученных ранее значений для различных штаммов и условий культивирования (конструкция и полезный объем фотобиореактора): 5,7 - 650 мг/л/день. (Benavides, A. M. S. et al. 2013), (Chen, Y. C. et al. 2015), (Chen, C. Y. et al. 2018), (Nogueira, N. et al. 2020), (Cheng-Wu, Z. et al. 2001).

Поиск новых пресноводных продуцентов ЭПК имеет большое практическое значение, так как их выращивание часто требует меньших затрат на инфраструктуру, пресноводные системы могут быть проще в эксплуатации и менее подвержены коррозии.

В рамках докторской диссертации проведена разработка и тестирование стартерного корма для аквакультуры на основе Supreme-15 (Alltech Coppens) и биомассы микроводорослей-продуцентов эйкозапентаеновой кислоты и фукоксантина. Разработанный прототип корма не менее чем на 20 % эффективнее коммерческих аналогов по всем значимым параметрам: конверсия корма, ростовые характеристики малька, эффективность использования белка и др.

Результаты работы демонстрируют, что микроводоросли, такие как *Vischeria magna* SBV108 и *Mallomonas furciva* SBV13, могут служить альтернативными источниками белка и полиненасыщенных жирных кислот для аквакультуры. Показано, что добавление 10 % микроводорослей, биомасса которых обогащена эйкозапентаеновой кислотой, более чем на 20 % улучшает показатели роста и эффективность кормления мальков красной тилапии. Исследование биохимических свойств других штаммов микроводорослей может привести к созданию более эффективных и сбалансированных кормов. Результаты работы подчеркивают важность использования микроводорослей как перспективного ингредиента для кормов в аквакультуре, что может привести к улучшению производительности и устойчивости сектора в целом.

Из культуральной жидкости микроводорослей *Dunaliella salina*, зараженных нитчатым грибом *Streptomyces* sp., выделено оригинальное соединение этил-3-[(4-метил-пиперазин-1-ил)дiazенил]-1Н-индол-2-карбоксилат (BX-SI001), обладающее антимикробной активностью против ряда грамположительных бактерий, включая метициллин-резистентный золотистый стафилококк (Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*).

Метициллин-резистентный золотистый стафилококк вошел в тройку наиболее смертоносных бактерий, став причиной гибели более 100 000 человек в 2019 году (Ranjbar, R. et al. 2022). В России доля устойчивых к антибиотикам штаммов золотистого стафилококка на протяжении последних 10 лет сохраняется в среднем на уровне 40 %.

Соединение BX-SI001 является новым классом антибиотиков и относится к группе 3-триазеноиндолов. Ранее активность 3-триазеноиндолов была изучена против различных микобактерий, в том числе против их мультирезистентных штаммов. Замещенные 3-триазеноиндолы показали высокую *in vitro* активность против изониазид-резистентного штамма *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium avium* (Патент RU 2724334 C1.2020).

Получена химическая модификация оригинального соединения - BX-SI043 (этил-6-фтор-3-[пирролидин-1-ил-азо]-1Н-индол-2-карбоксилат), обладающая высокой активностью (диапазон минимальных ингибирующих концентраций 0,125-0,5 мг/л) в отношении 41 штамма MRSA с множественной лекарственной устойчивостью и относительно низкой цитотоксичностью *in vitro* (индекс селективности 76). Соединение BX-SI043 обладает низкой токсичностью при внутрижелудочном (> 600 мг/кг) введении крысам. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 вещество BX-SI043 можно отнести к 3-му классу умеренно опасных веществ и рекомендовать

для дальнейшего исследования эффективности на крысах на модели инфекции кожи и мягких тканей, вызванной MRSA.

Новизна технических решений подтверждена 3 патентами РФ.

Методология и методы исследования

Методология выполнения исследования состоит из теоретического, экспериментального и практического блоков. Рассмотрены методология и организация выполнения научных исследований, охарактеризованы объекты и основные методы исследований. Работа выполнена с использованием методов биотехнологического, микробиологического, биохимического, молекулярно-биологического, биоинформатического и статистического и анализа.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Биотехнологическая платформа, позволяющая: (1) проводить широкомасштабный скрининг экстрактов микроорганизмов; (2) делать предсказательную аналитику содержания биологически активных соединений в экстрактах; (3) идентифицировать активные метаболиты; (4) проводить их биотехнологическое получение в полупромышленном масштабе; (5) проводить химическую модификацию метаболитов с целью улучшения их свойств.
2. Валидированная методика определения биологической активности и поиска молекулярных мишеней экстрактов из фотосинтезирующих микроорганизмов с помощью технологии Онкобокс.
3. Разработанный на основе метаболита микроводоросли *Dunaliella salina* антибиотик нового класса эффективен против метициллин-резистентного золотистого стафилококка. Доклинические исследования острой токсичности на крысах позволяют отнести соединение к третьему классу токсичности (умеренно токсичному).
4. *Mallomonas furtiva* SBV13 штамм-продуцент коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина содержит 26,6 мг фукоксантина/г сухой биомассы, что является наибольшей известной концентрацией этого соединения в биомассе.
5. *Vischeria magna* SBV108 штамм-продуцент омега-3 полиненасыщенной жирной кислоты (ЭПК) содержит 46,1 мг ЭПК/г сухой биомассы, что является наибольшей известной концентрацией среди пресноводных микроводорослей.
6. Использование микроводорослей *Vischeria magna* SBV108 и *Mallomonas furtiva* SBV13 в составе стартового корма для мальков красной тилапии позволило не менее чем на 20 % повысить эффективность корма по сравнению с коммерческим аналогом по наиболее значимым параметрам: конверсия корма, ростовые характеристики малька, эффективность использования белка и энергии.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является обобщением результатов теоретических и экспериментальных исследований, выполненных в период с 2013 по 2024 гг. автором непосредственно и в сотрудничестве с коллегами. Личный вклад автора включает постановку целей и задач исследований, разработку методологии проведения исследований, планирование и участие в проведении экспериментов, анализ полученных экспериментальных данных и их сопоставление с мировыми данными, подготовку научных отчетов и рукописей, обобщение

результатов, формулировку выводов. Определение жирнокислотного и пигментного составов биомассы микроводорослей осуществлялось на базе Кафедры физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина» (г. Москва). Эксперименты по выращиванию красной тиляпии выполнялись на базе кафедры Аквакультуры и водных биоресурсов ФГБУ ВО Астраханского Государственного Технического Университета (АГТУ) (г. Астрахань). Получение синтетических аналогов субстанции BX-SI001 проводили на базе Отдела биомолекулярной химии ГНЦ ИБХ РАН (г. Москва). Изучение фармакокинетических показателей субстанции BX-SI043 *in vitro* проводили совместно с ООО «НИИ ХимРар» (г. Москва). Изучение острой токсичности лидирующей субстанции BX-SI043 *in vivo* проводили совместно с ООО «Институт доклинических исследований» (Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмолловский).

Апробация результатов

Материалы диссертации доложены и обсуждены на многочисленных отечественных и международных научно-практических мероприятиях:

- VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 18-20 марта 2014 года);
- XXVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 09-12 февраля 2015 года);
- XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 08-11 февраля 2016 года);
- Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии в комплексном развитии регионов» (г. Москва, 15-17 марта 2016 года);
- The 6th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts (г. Сан-Диего (США), 26-29 июня 2016 года);
- IV международная конференция для технологических предпринимателей Startup Village 2016 (г. Москва, 02-03 июня 2016 года);
- XI молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (г. Москва, 01-02 ноября 2016 года);
- XXIX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 07-10 февраля 2017 года);
- V международная конференция для технологических предпринимателей Startup Village 2017 (г. Москва, 06-07 июня 2017 года);
- 19-я Российская агропромышленная выставка «Золотая осень» (г. Москва, 04-07 октября 2017 года);
- XXX зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 12-15 февраля 2018 года);
- 4th Future Agro Challenge Global Agripreneurs Summit (г. Стамбул (Турция), 14-17 апреля 2018);
- Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 23-25 мая 2018 года);
- 20-я Российская агропромышленная выставка «Золотая осень» (г. Москва, 10-13 октября 2018 года);
- 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever (г. Прага (Чехия), 07-12 июля 2018 года);

- XXXI зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 11-14 февраля 2019 года);
- Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (г. Москва, 25-27 февраля 2019 года);
- Международная промышленная выставка «Иннопром» (г. Екатеринбург, 07-10 июля 2024 г.).

Публикации

По результатам, полученным в диссертационной работе, опубликованы 9 публикаций в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, Российского индекса научного цитирования, а также индексируемых «Web of Science» и «Scopus». В изданиях, входящих в список журналов «Web of Science» первого квартиля (Q1) опубликовано 3 статьи, входящих в список журналов второго квартиля (Q2) - 6 статей. Опубликовано 1 глава в монографии, зарегистрировано 3 патента РФ.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, семи глав, заключения, списка литературы из 566 наименований, 10 приложений. Общий объем диссертации составляет 306 страниц, включает 58 рисунков и 45 таблиц.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному консультанту А.А. Буздину д.б.н., профессору РАН, заведующему лабораторией трансляционной геномной биоинформатики МФТИ за доброжелательную и конструктивную критику. Автор выражает глубокую признательность Е.Н. Патовой, ведущему научному сотруднику отдела флоры и растительности Севера Института биологии Коми Уральского отделения Российской академии наук, за предоставление штаммов микроводорослей; Е.С. Гусеву, старшему научному сотруднику лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии Института проблем экологии и эволюции им А.Н. Северцова Российской академии наук, за постоянное содействие и научно-методическую помощь; сотрудникам Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук за научную консультацию и предоставление штаммов микроводорослей. Коллективу ООО «Соликсент» М.А. Петрушкиной и А.С. Мамаевой за помощь в полупромышленном культивировании фотосинтетических микроорганизмов. Сотруднику ООО «Виридиас» А.В. Филимоновой за проведение работ с клиническими изолятами MRSA. Коллективу кафедры физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «РГУ нефти и газа (НИУ) имени И.М. Губкина» за бесценную помощь в проведении количественного химического анализа исследуемых образцов. Особую благодарность за неоценимую помощь в реализации большинства задач исследования автор выражает Б.А. Сорокину, сотруднику лаборатории трансляционной геномной биоинформатики МФТИ. Также автор выражает благодарность З.Б. Намсараеву, начальнику лаборатории синтетической биологии НИЦ «Курчатовский институт», за внимание, оказанное научной работе и квалифицированную консультационную поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

Представлен аналитический обзор по состоянию и перспективам развития биотехнологии микроводорослей (1.1). Детально рассмотрены различные биопродукты, получаемые из фотосинтетических микроорганизмов (1.2). Описаны основные параметры культивирования, влияющие на продуктивность микроводорослей (скорость накопления биомассы и удельное содержание ценного метаболита) (1.3). Проанализированы способы промышленного культивирования микроводорослей (1.4). Рассмотрены современные подходы к повышению эффективности штаммов-продуцентов (1.5) и технологии высокопроизводительного скрининга (1.6). Подробно описаны существующие платформенные решения в области медицины и биотехнологии (1.7, 1.8).

2. Материалы и методы

Описаны методы молекулярной идентификации, лабораторного культивирования и биохимического анализа различных штаммов микроводорослей. Охарактеризованы условия полупромышленного культивирования штаммов в фотобиореакторе Lumian AGS 260 с рабочим объемом 260 л. Изложены основные подходы к созданию и тестированию стартерных кормов из микроводорослей для мальков красной тиляпии *Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*. Приведена методология изучения антимикробного соединения, включающая получение библиотеки химических производных оригинального соединения, определение минимальной ингибирующей концентрации и измерение цитотоксичности. Детально разобраны подходы к изучению фармакокинетических свойств лидирующего антибиотического соединения и определению *in vivo* острой токсичности на крысах. Изложены использованные биоинформатические методы анализа активации клеточных сигнальных путей при воздействии экстрактов из биомассы микроводорослей и цианобактерий.

3. Изучение биотехнологического потенциала выделенных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов и оптимизация условий полупромышленного культивирования

3.1 Отбор перспективных штаммов-продуцентов липидов, полиненасыщенных омега-3 жирных кислот и каротиноидов

Согласно современным концепциям, при поиске высокопродуктивных и ценных с точки зрения биотехнологических производств штаммов микроводорослей особое внимание следует уделять представителям из филогенетических линий с уже известными продуцентами ценных соединений (Galloway, A. W. et al. 2015), (Neofotis, P. et al. 2016). Поэтому на первом этапе был проведен отбор ряда штаммов из ранее созданных коллекций культур водорослей и цианобактерий для целей биотехнологического назначения, представляющих новые виды, а также новые штаммы известных видов различных групп микроводорослей. Всего в работе были изучены 160 штаммов микроводорослей и цианобактерий, полученных из следующих коллекций: Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (КМЦ IPPAS ИФР РАН), Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина (WDCM602: GENUS. URL: https://www.ibiw.ru/index.php?p=project/algo/WDCM602/mgmt_genus&id=1), Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН (Коллекция живых штаммов

микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA), URL: <https://ib.komisc.ru/sykoa>) и личных коллекций Е.С. Гусева, Е.И. Мальцева и М.С. Куликовского. Кроме того, были изучены природные образцы, отобранные в России, Вьетнаме, Индонезии и Монголии, а также переданные для совместного изучения коллекционные штаммы из Университета Геттингена (Германия) (SAG catalogue of strains. URL: <https://sagdb.uni-goettingen.de/index.php>).

Изучаемые штаммы охватывали 14 классов микроводорослей и цианобактерий (Таблица 1).

Таблица 1 - Распределение изучаемых фотосинтезирующих микроорганизмов по классам.

Эукариотические микроорганизмы	Число штаммов
Bacillariophyceae	60
Zygnematophyceae	14
Eustigmatophyceae	12
Chlorophyceae	11
Chrysophyceae	10
Trebouxiophyceae	9
Xanthophyceae	5
Cryptophyceae	4
Euglenophyceae	2
Rhodophyceae	2
Haptophyceae	2
Palmophyllophyceae	1
Pavlovophyceae	1
Прокариотические микроорганизмы	Число штаммов
Cyanobacteria	27

3.2 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов липидов

На первом этапе были исследованы микроводоросли, способные в большом количестве синтезировать липиды, которые традиционно считаются ценным природным сырьем для биотоплива третьего поколения, используются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве (Shaikh, K. M. et al. 2019), (Levasseur, W. et al. 2020).

По итогам анализа информации, представленной в научных публикациях, были отобраны представители класса Chlorophyceae, в частности из рода *Bracteacoccus*. Липидный метаболизм этой группы был мало изучен, но в тоже время были опубликованы данные, согласно которым представители этого рода способны накапливать до 63 % липидов от сухого веса (Ratha, S. K. et al. 2012), (Minyuk, G. S. et al. 2015). Изучаемый штамм одноклеточной коккоидной почвенной зеленой микроводоросли *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 был выделен в степной зоне Днепропетровской области Украины (Рисунок 1).

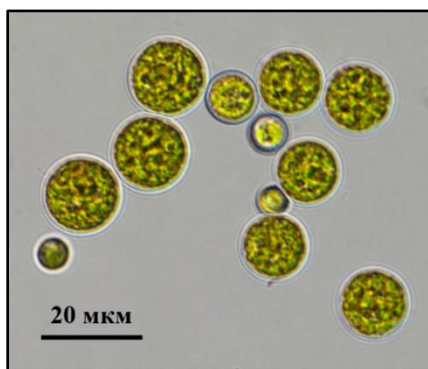


Рисунок 1 - Микрофотография *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 (Mamaeva, A. et al. 2018).

Вегетативные клетки сферические, реже яйцевидные, диаметр 7,0 - 22,7 мкм. Клеточная стенка тонкая или иногда слегка утолщенная после 6-месячного возраста (до 1,5 мкм). Бесполое размножение осуществляется апланоспорами, тогда как половое размножение не наблюдается. Согласно современной концепции таксономии зеленых водорослей, *B. bullatus* относится к семейству Bracteacoccaceae, порядок Sphaeropleales (Fucikova, K. et al. 2012). Филогенетический анализ (БВ и МП методы анализа) фрагмента гена 18S рРНК-ITS1-5.8S рРНК-ITS2 показал, что штамм *B. bullatus* MZ-Ch11 объединяется в одну кладу со штаммом *B. bullatus* SAG 2032 (Рисунок 2) с высокими величинами статистических поддержек (МП анализ 99; БВ анализ 100).

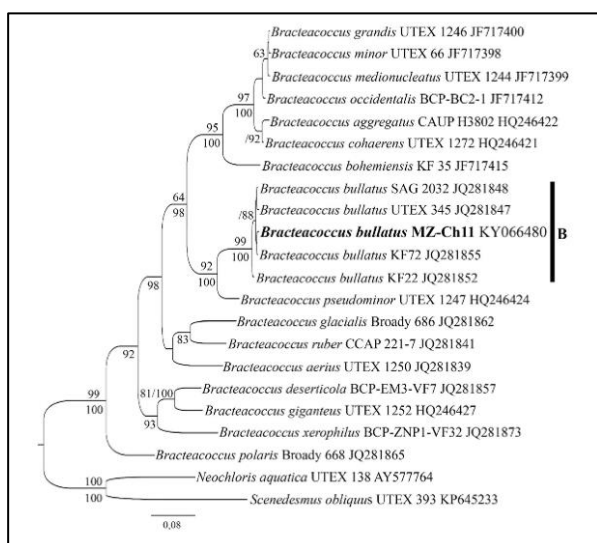


Рисунок 2 - Фрагмент байесовского дерева для штаммов *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов 18S рРНК-ITS1-5.8S рРНК-ITS2 438 п.н. для 21 штамма зеленых водорослей. Штамм *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 выделен жирным шрифтом. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями - значения Байесовских апостериорных вероятностей (<80 не указаны) (Mamaeva, A. et al. 2018).

Изучение предсказанной вторичной структуры ITS2, идентификация компенсаторных и полукompенсаторных нуклеотидных оснований (СВС и hСВС) используются в таксономии зеленых водорослей для их различий на уровне видов (Coleman 2003). Типичная вторичная структура ITS2 представителей рода *Bracteacoccus* имеет четыре шпильки и раздвоенную шпильку I (Рисунок 3) (Keller, P. J. et al. 2008), (Fučíková, K. et al. 2012).

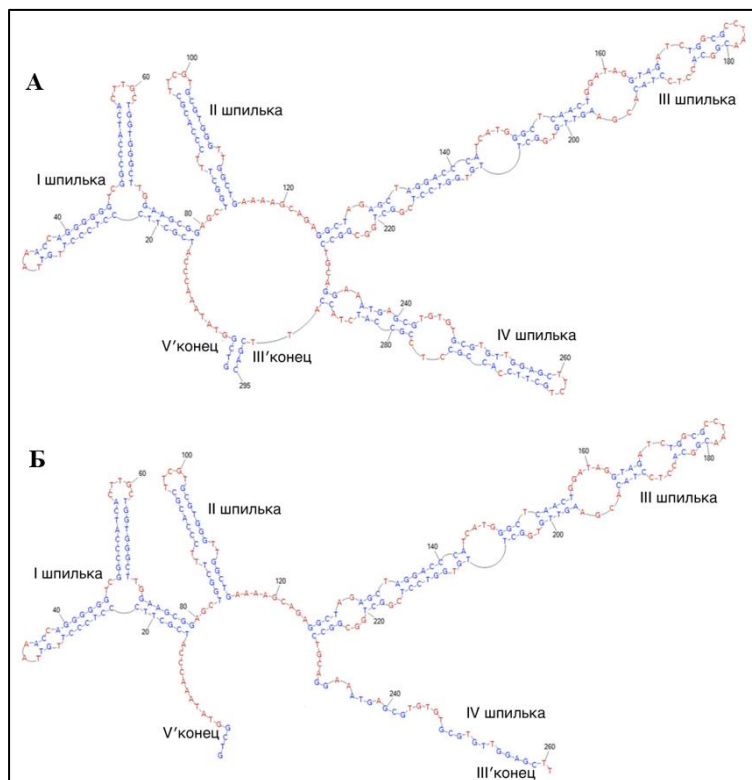


Рисунок 3 - А - Сравнение вторичной структуры ITS2 *Bracteacoccus bullatus* SAG2032 и Б - *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11. Цифрами I-IV пронумерованы отдельные нуклеотидные шпильки (Mamaeva, A. et al. 2018).

Анализ вторичной структуры ITS2 штамма MZ-Ch11 и штамма *B. bullatus* SAG 2032 не выявил СВС в наиболее консервативных областях спиралей 1, 2 и 3 (Рисунок 3). Эти результаты подтверждают принадлежность штамма MZ-Ch11 к виду *B. bullatus*.

3.3 Оптимизация продуктивности штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Для оценки изменений накопления биомассы, содержания липидов, триглицеридов и состава жирных кислот была проведена серия экспериментов по культивированию *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 в условиях отсутствия фосфатов и/или нитратов в среде WC.

Максимальный выход сухой биомассы MZ-Ch11 (2,4 г/л) был достигнут на среде WC*10 при концентрации нитратов 10 мМ и фосфатов 0,5 мМ, спустя 14 дней культивирования (Таблица 2).

Более низкое содержание биомассы (2,1 г/л) отмечено в среде WC*1 с пониженными концентрациями нитрата и фосфата (1,0 и 0,05 мМ, соответственно). В среде с низким содержанием азота (-N) сухой вес составил 1,9 г/л. Высушенная биомасса исследованного штамма MZ-Ch11 при одновременной депривации нитратов и фосфатов составила 1,7 г/л, что на 29 % ниже значений, наблюдаемых во время культивирования на стандартной среде WC*10 (Таблица 2).

Таблица 2 - Результаты культивирования *Bracteacoccus bullatus* MZ-Chll в различных условиях. В средах WC*10 и WC*1, в условиях нитратного голодания (-N), в условиях фосфатного голодания (-P), а также в условиях депривации азота и фосфора (-N-P) (Mamaeva, A. et al. 2018).

	WC*10	WC*1	-N	-P	-N -P
Биомасса/сухой вес (г/л)	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Общие липиды (% от сухого веса)	17 ± 5	59 ± 9	56 ± 8	30 ± 6	49 ± 4
Общие липиды (г/л)	0,4 ± 0,09	1,21 ± 0,19	1,06 ± 0,11	0,68 ± 0,20	0,82 ± 0,12
Жирные кислоты (% от сухого веса)	13,3 ± 1,0	59,0 ± 5,2	62,8 ± 4,9	33,8 ± 2,4	59,7 ± 7,2
ТАГ (% от сухого веса)	1,45 ± 0,18	8,38 ± 0,65	10,10 ± 0,22	10,96 ± 0,25	8,73 ± 0,29
ТАГ (мг/л)	35 ± 3	176 ± 17	192 ± 10	252 ± 22	148 ± 17
ДАГ (% от сухого веса)	5,43 ± 0,53	3,45 ± 0,10	2,76 ± 0,69	3,70 ± 0,29	3,12 ± 0,37
Клетки (млн. шт.)	21,4 ± 0,9	21,2 ± 1,1	11,0 ± 0,6	18,7 ± 0,7	16,6 ± 0,8
НК-положительные клетки (% от числа всех клеток)	14 ± 1	31 ± 4	66 ± 6	61 ± 1	58 ± 7

Как и ожидалось, нитратное и фосфатное голодание (WC*1) стимулировало накопление липидов по сравнению с контрольными условиями. Общее содержание липидов достигало 49 %-59 % сухой биомассы спустя 14 дней культивирования в условиях снижения концентрации азота (Таблица 2). Общее содержание липидов было самым низким в условиях с высокой концентрацией азота (WC*10), составив 17 % от сухого веса (Таблица 2). В условиях депривации фосфатов наблюдалось повышенное содержание общих липидов, составляющее 30 % сухого веса. Были обнаружены статистически значимые ($P < 0,05$) различия в содержании общих липидов в среде с пониженным (WC*1, -N, -N-P) и повышенным содержанием азота (WC*10 и -P). По сравнению со средой WC*10 увеличение накопления общих липидов в клетках, растущих в среде с пониженным содержанием фосфора (-P), было статистически незначимым ($P = 0,45$).

Для оценки внутриклеточного содержания нейтральных липидов проводили окрашивание нильским красным с последующей проточной цитометрией (Таблица 2). Результаты, полученные при окрашивании нильским красным, хорошо коррелируют с гравиметрическим методом и другими методами анализа содержания липидов (Chen, W. et al. 2009). В образцах штаммов, культивируемых в среде WC*1 с недостатком питательных веществ, количество клеток, окрашенных нильским красным, составило 58 % - 66 %. В то же время в условиях с избытком питательных веществ WC*10 аналогичная величина была равна всего 14 %. Кроме того, клетки, выращенные в среде WC*10, демонстрировали самое низкое содержание ТАГ и относительно высокое ДАГ - 1,4 % и 5,4 % сухого веса, соответственно (Таблица 2).

В клетках, выращенных при пониженных концентрациях питательных веществ (WC*1, -N, -P и -N-P), наблюдалось увеличение ТАГ (8,3 % - 10,9 %) за счет снижения количества ДАГ (2,7 % - 3,7 %) (Таблица 2). Моноацилглицериды в исследованных образцах обнаружены не были.

Относительно низкая корреляция содержания ТАГ и общих липидов может быть результатом недостаточной эффективности применяемой методики экстракции ТАГ из биомассы.

3.4 Изучение жирнокислотного профиля штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Преобладающими жирными кислотами штамма MZ-Ch11 в различных условиях культивирования были олеиновая (48 % - 64 %), линолевая (14 % - 24 %) и пальмитиновая (9 % - 13 %) (Таблица 3). В нормальных условиях роста в среде WC*10 в биомассе олеиновая кислота составляла наибольшее количество (48 %), за ней следовали линолевая кислота (24 %) и пальмитиновая кислота (13 %). При культивировании MZ-Ch11 в среде с десятикратным снижением концентрации азота и фосфора содержание олеиновой кислоты увеличивалось до 64 %. Кроме того, депривация азота и фосфора привела к снижению содержания других жирных кислот (C16:0, 16:2 и 18:2).

Таблица 3 - Жирнокислотный профиль *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 при различных условиях культивирования (Мамаева, А. et al. 2018).

МЭЖК	Содержание МЭЖК (% от всех жирных кислот)				
	WC*10	WC*1	-N	-P	-N-P
C16:4	НД	1,32 ^{+0,10} _{-0,09}	1,31 ^{+0,08} _{-0,08}	2,44 ^{+0,13} _{-0,12}	1,51 ^{+0,19} _{-0,17}
C16:2	10,08 ^{+1,5} _{-1,4}	5,10 ^{+0,27} _{-0,25}	4,42 ^{+0,32} _{-0,30}	8,24 ^{+0,77} _{-0,72}	5,38 ^{+0,40} _{-0,36}
C16:1 ω9	4,51 ^{+0,51} _{-0,46}	4,69 ^{+0,30} _{-0,28}	4,82 ^{+0,40} _{-0,37}	8,24 ^{+0,41} _{-0,38}	5,33 ^{+0,66} _{-0,59}
C16:0	13,15 ^{+0,94} _{-0,86}	9,40 ^{+0,61} _{-0,57}	10,22 ^{+0,58} _{-0,54}	10,15 ^{+0,67} _{-0,63}	11,0 ^{+1,5} _{-1,3}
C18:3	НД	НД	0,21 ^{+0,05} _{-0,05}	НД	0,27 ^{+0,06} _{-0,06}
C18:4	НД	НД	0,17 ^{+0,05} _{-0,04}	НД	0,15 ^{+0,05} _{-0,05}
C18:2	23,7 ^{+2,4} _{-2,2}	13,9 ^{+1,6} _{-1,5}	15,41 ^{+0,97} _{-0,90}	17,3 ^{+2,0} _{-1,9}	15,6 ^{+1,3} _{-1,1}
C18:1 ω9	47,8 ^{+4,2} _{-3,9}	63,8 ^{+4,3} _{-4,0}	62,0 ^{+4,5} _{-4,2}	55,3 ^{+3,2} _{-3,0}	59,2 ^{+7,4} _{-6,6}
C18:0	НД	1,43 ^{+0,07} _{-0,07}	1,20 ^{+0,11} _{-0,10}	0,68 ^{+0,07} _{-0,07}	1,26 ^{+0,14} _{-0,12}
C20:1	НД	0,31 ^{+0,07} _{-0,06}	0,24 ^{+0,05} _{-0,05}	0,24 ^{+0,04} _{-0,04}	0,34 ^{+0,05} _{-0,05}

*НД - не детектируется.

В результате было подтверждено, что критичным для накопления биомассы является именно концентрация азота. Так, статистически достоверно показано, что минимальная скорость роста биомассы была в экспериментах со средой с депривацией нитратов (WC*1 - N). Снижение концентрации азота в 10 раз (среда WC*1) или равно как и полное отсутствие фосфатов (WC*1 - P) практически не влияло на скорость роста биомассы.

Зависимость накопления липидов от концентрации нитратов носила обратный характер: снижение концентрации азота вплоть до полной депривации приводило к повышению накопления липидов (Таблица 2). В отличие от общих липидов, содержание ТАГ в значительной степени зависела как от содержания нитратов, так и фосфатов в культуральной среде. В контрольной среде WC*10 содержание ТАГ было минимальным и составляло 1,45 %, в то время как в среде без азота и/или фосфора было в 10 раз больше. Полученные данные подтверждались в экспериментах с нильским красным: количество окрашиваемых клеток при различных типах голодания увеличивалось с 14 % до 61 %.

Показано, что фосфорное голодание снижает содержание общих липидов и жирных кислот при одновременном увеличении ТАГ. Это может быть связано со снижением накопления фосфолипидов в условиях недостатка фосфатов.

В работе (Maltsev, Y., et al., 2018) для штамма *Parietochloris grandis* sp. nov. были получены сходные результаты: депривация нитратов и фосфатов в культуральной среде приводила к 3-х кратному увеличению содержания жирных кислот в биомассе (с 150 мг/г до 443 мг/г сухой биомассы). При этом, однако, наблюдалось снижение выхода сухой биомассы с 2,2 г/л до 1,6 г/л, поэтому для максимизации объемной продуктивности по жирным кислотам целесообразно осуществлять азотную и фосфорную депривацию по окончании фазы экспоненциального роста.

3.5 Определение биотехнологического потенциала штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11

Одним из наиболее важных критериев в промышленной биотехнологии является волюметрическая продуктивность штамма - число грамм целевого метаболита на один литр культуральной среды. Показано, что для штамма MZ-Ch11 в условиях азотного или фосфорного дефицитов объемная концентрация ТАГ составила 190,8 мг/л и 250,9 мг/л, соответственно.

Для определения потенциала использования штамма MZ-Ch11 в промышленных условиях было проведено измерение волюметрической продуктивности в условиях культивирования в среде WC*1 в панельном фотобиореакторе закрытого типа полезной емкостью 260 л. Измеренная объемная продуктивность липидов для штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 составила 80 мг/л/день, что является одним из самых больших значений, зафиксированных при полупромышленном культивировании. В работе (Griffiths, M. J. et al. 2009) на примере 55 видов микроводорослей из различных классов в лабораторных масштабах в среде с нормальным содержанием азота и фосфора была показана волюметрическая продуктивность от 17 до 160 мг/л/день. Несмотря на это, максимальное значение волюметрического выхода липидов при периодическом культивировании штамма *N. gaditana* в колончатом фотобиореакторе на 100 л было значительно меньше и составило 7,2 - 17,8 мг/л/день (Nogueira, N. et al. 2020). А при выращивании в трубчатом фотобиореакторе объемом 340 л была достигнута волюметрическая продуктивность только 50-60 мг/л/день (San Pedro, A. et al. 2014).

3.6 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов фукоксантина

На следующем этапе проводили поиск более маргинальных продуктов, которые, согласно литературным данным, могут быть получены из микроводорослей. Фукоксантин обладает многими полезными свойствами, включая противораковые, антигипертензивные, противовоспалительные эффекты, а также способностью снижать риск возникновения ожирения (Martin, L. J. 2015). Основным источником получения фукоксантина в промышленных масштабах является макроводоросли, такие как *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis*, *Undaria pinnatifida* и *Hijikia fusiformis*.

Было проведено определение параметров роста и содержание пигмента как у депонированных ранее штаммов, так и у семи новых штаммов диатомовых и золотистых микроводорослей, выделенных из разных локаций России и Вьетнама. К числу последних относились *Cyclotella meneghiniana* SBV23, SBV11; *Cyclotella* cf. *cryptica* SBV12, *Nitzschia* sp. SBV25, *Nitzschia* sp. SBV26; *Mallomonas furciva* SBV13, *Paralia longispina* SBV19.

Дополнительно в культуральной среде измеряли содержания нитратов и фосфатов (Рисунок 4).

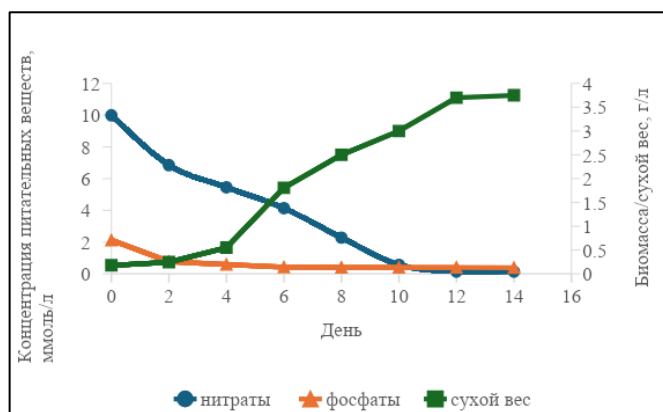


Рисунок 4 - Кривые роста и поглощения нитратов/фосфатов *Mallomonas furtiva* SBV13 (Sorokin, B. et al. 2024).

Результаты, приведенные в таблице 4, свидетельствуют о том, что в обнаруженном штамме *Mallomonas furtiva* SBV13, содержание фукоксантина спустя две недели фототрофного культивирования было значительно больше, чем в других изучаемых образцах микроводорослей и составило 26,6 мг/г сухого веса. Кроме того, было показано, что скорость накопления биомассы в 1,5 раза выше по сравнению с промышленным продуцентом фукоксантина *Phaeodactylum tricornutum* UTEX L642.

Таблица 4 - Скорость роста и содержание фукоксантина у исследуемых штаммов (Petrushkina, M. et al 2017).

Штамм	Биомасса/сухой вес г/л	Содержание фукоксантина, мг/г сухого веса
<i>Mallomonas furtiva</i> SBV13	3,75 ± 0,15	26,6 ± 0,5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX L642	2,4 ± 0,65	10,2 ± 0,6
<i>Nitzschia</i> cf. <i>carinospeciosa</i> SBV25	0,37 ± 0,06	5,5 ± 0,2
<i>Nitzschia</i> cf. <i>carinospeciosa</i> SBV26	0,33 ± 0,02	4,0 ± 0,1
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV11	0,07 ± 0,01	2,0 ± 0,01
<i>Cyclotella meneghiniana</i> SBV23	0,08 ± 0,015	2,3 ± 0,03
<i>Cyclotella</i> cf. <i>cryptica</i> SBV12	0,16 ± 0,03	0,7 ± 0,2
<i>Paralia longispina</i> SBV-19	0,07 ± 0,009	1,4 ± 0,1

Проведенный молекулярно-генетический анализ *Mallomonas furtiva* SBV13 позволяет утверждать, что выделенный новый штамм относится к отделу Heterokontophyta, классу Chrysophyceae, порядку Synurales, семейству Mallomonadaceae рода *Mallomonas* (Рисунок 5).



Рисунок 5 - Байесовское древо штаммов рода *Mallomonas* на основе комбинированного анализа генов 18S рДНК и *rbcL* пластовной ДНК. Значения байесовских апостериорных вероятностей и бутстрепа максимального правдоподобия приведены слева и справа от разделительных линий, соответственно. Масштабная линейка отражает число замен на 1 сайт. Два штамма рода *Synura* и штамм *Neotessella lapponica* использованы в качестве аутгруппы (Petrushkina, M. et al 2017).

Клетки *Mallomonas furtiva* SBV13 имеют удлинённо-эллипсоидную форму размером $18 - 25 \times 8 - 15$ мкм, покрытую овальными кремнеземными чешуйками размером $3,6 - 4,3 \times 2,2-2,5$ мкм. Хлоропласт одиночный, двухлопастной. Клетки с двумя жгутиками, короткий и длинный (виден только длинный). При длительном хранении без пересева клетки становятся неподвижными и образуют скопления в слизи (Рисунок 6).

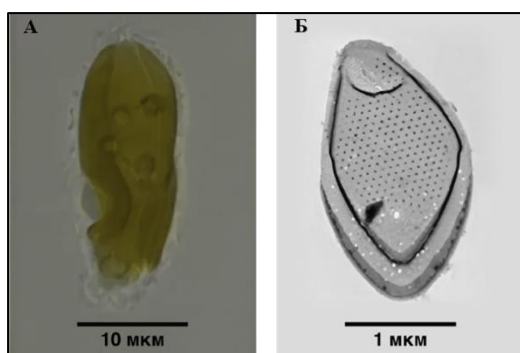


Рисунок 6 - А - Микрофотография вегетативной клетки *Mallomonas furtiva* SBV13 и Б - его кремнеземных чешуек (Petrushkina, M. et al. 2017).

Содержание фукоксантина у *Mallomonas furtiva* SBV13 является самым высоким среди всех изученных штаммов микроводорослей. Ранее максимальное содержание данного пигмента было показано для диатомовой микроводоросли *Odontella aurita* SCCAP K-125 (21,67 мг/г сухого веса) и гаптофитовой микроводоросли *Isochrysis aff. Galbana* CCMP1324 (18,2 мг/г сухого веса). Содержание фукоксантина в сухой биомассе *Phaeodactylum tricornutum* UTEX L642 было значительно ниже (10,2 мг/г), чем в *Mallomonas furtiva* SBV13. Также содержание фукоксантина в биомассе *Phaeodactylum tricornutum* UTEX L642 ниже, чем у другого штамма того же вида из коллекции КММСС *Phaeodactylum tricornutum* B-007 (15,7 мг/г), но сопоставимо с данными для штаммов *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646 (10,3 мг/г) и КММСС-14 (8,55 мг/г).

Показано, что содержание фукоксантина демонстрируют три группы микроводорослей: диатомовые (до 21,67 мг/г), золотистые (до 26,6 мг/г) и примнезиевые (до 18,23 мг/г). Способность накапливать фукоксантин у представителей других групп микроводорослей (Pelagophyceae, Phaeophyceae, Raphidophyceae) значительно ниже (0,02-9,01 мг/г). Следует отметить, что концентрация фукоксантина может существенно варьировать в культурах, относящихся даже к одной таксономической группе, что и было продемонстрировано для группы диатомовых водорослей. В отличие от *Phaeodactylum tricornutum*, *Mallomonas furtiva* SBV13

является пресноводным штаммом. Выращивание пресноводных штаммов, как правило, требует меньших затрат на поддержание инфраструктуры: пресноводные системы могут быть проще в эксплуатации и менее подвержены коррозии.

В условиях полупромышленного культивирования показано, что при интенсивности освещения $120 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, температуре $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, нейтральных pH, в среде WC с десятикратным содержанием нитратов и фосфатов ($0,85 \text{ г/л NaNO}_3$ и $0,114 \text{ г/л K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), волюметрический выход фукоксантина составил $3,7 \text{ мг/л/день}$. При этом скорость роста *Mallomonas furtiva* SBV13 составила 150 мг/л/день . Было проведено сравнение соответствующих биотехнологических параметров с результатами, которые ранее были получены другими научными группами. Так Hugo Pereira (Pereira, H. et al. 2021) в условиях культивирования в 15 м^3 в трубчатом фотобиореакторе при сопоставимой скорости роста биомассы была достигнута объемная продуктивность всего $1,05 \text{ мг/л/день}$ для *Phaeodactylum tricornutum* и $0,54 \text{ мг/л/день}$ для *Tisochrysis lutea*.

В рамках исследования биологического разнообразия и биотехнологического потенциала синуровых микроводорослей (класс Chrysophyceae, порядок Synurales) был разработан новый комбинированный молекулярно-генетический и морфологический инструментарий идентификации штаммов, а также в ходе ревизии рода *Mallomonas* предложены две новые таксономические комбинации: *Mallomonas foveata comb. et stat. nov.* (Gusev, E. S. et al. 2024a) и *Mallomonas gemina comb. et stat. nov.* (Gusev, E. S. et al. 2024b). В работах был использован один из современных методов молекулярной идентификации штаммов микроводорослей, основанный на анализе комбинированных данных секвенирования фрагментов генов 18S рДНК и *rbcL* хлоропластной ДНК. Для важного в биотехнологических исследованиях рода *Mallomonas* известны молекулярно-генетические данные лишь менее, чем для 20% описанных видов, что определяет важность проведённых работ.

В дополнение к молекулярной идентификации был разработан новый подход морфологического анализа синуровых водорослей, основанный на комплексном исследовании строения и структуры кремнезёмных чешуек клеток с помощью просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии. Разработанные подходы позволили актуализировать таксономию рода *Mallomonas*, а также проанализировать географическую распространенность различных штаммов.

3.7 Поиск и характеристика перспективных штаммов-продуцентов эйкозапентаеновой кислоты

Одним из наиболее коммерчески успешных продуктов, выделенных из микроводорослей, является омега-3 полиненасыщенная жирная кислота (эйкозапентаеновая). Эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) способствует снижению уровня триглицеридов в крови, уменьшает воспалительные процессы и может снижать риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Для того чтобы найти новые, эффективные продуценты ЭПК, были изучены параметры роста и продуктивности у штаммов коллекции Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA) (Коллекция живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA). URL: <https://ib.komisc.ru/sykoa>). Преимущественно мы исследовали микроводоросли класса Eustigmatophyceae, для которых в ранних работах была показана способность накапливать различные полиненасыщенные жирные кислоты.

Охарактеризован штамм *Vischeria magna* SBV108, в биомассе которого содержание ЭПК к четырнадцатому дню культивирования составило 46,1 мг/г сухого веса. Скорость накопления биомассы *Vischeria magna* SBV108 на среде 3NBBM составила 4 г/л (сухого веса) (Рисунок 7).

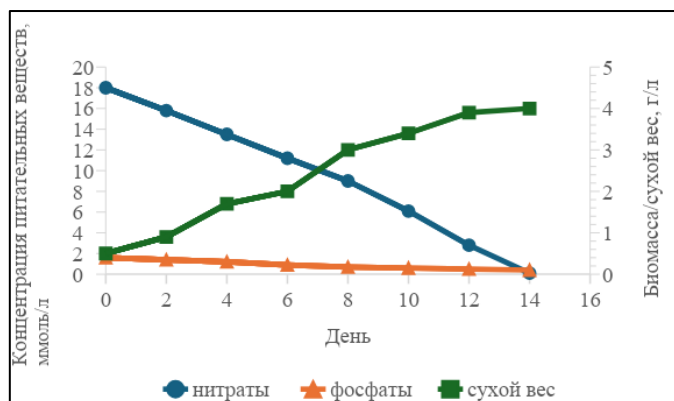


Рисунок 7 - Кривые роста и поглощения нитратов/фосфатов *Vischeria magna* SBV108 (Sorokin, B. et al. 2024).

Штамм *Vischeria magna* SBV108 депонирован в Коллекции живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA) под регистрационным номером SYKOA E-07-09 (SYKOA, Сыктывкар, Россия, (Коллекция живых штаммов микроводорослей Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA). URL: <https://ib.komisc.ru/sykoa>). Детальное описание местообитания, включая химию почвы, представлено в публикации (Patova, E. N. et al 2023).

Согласно проведенному молекулярно-генетическому анализу, *Vischeria magna* SBV108 относится к отделу Heterokontophyta, классу Eustigmatophyceae, порядку Eustigmatales, семейству Chlorobotryaceae, роду *Vischeria*. Сравнение с другими штаммами рода *Vischeria* на основе ITS2 рДНК показало, что штамм относится к кладке *Vischeria magna* SBV108 (Рисунок 8).

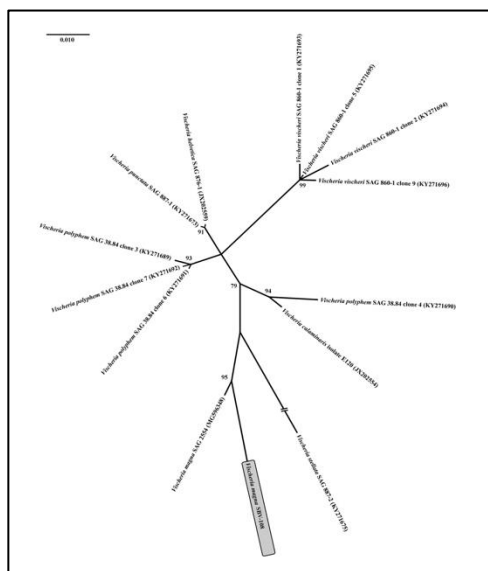


Рисунок 8 - Неукорененное Байесовское древо ITS2 рДНК штаммов рода *Vischeria*. Значения бутстрепа приведены у узлов. Масштабная линейка отражает число замен на 1 сайт (Sorokin, B. et al. 2024).

Клетки *Vischeria magna* SBV108 имеют шаровидную форму, размером 6-14 мкм, диаметром 10-11 мкм; пиреноид полигональный, крупный, угловой, без обкладки и тилакоидов; хроматофор чашевидный, с глубоко вырезанными лопастными краями. Размножение происходит зоо- и автоспорами (по 2-4 шт). Зооспоры имеют один жгутик. При длительном хранении клетки увеличиваются в размерах за счет вакуолизации, цитоплазма гранулируется, происходит обесцвечивание хлоропластов (Рисунок 9).

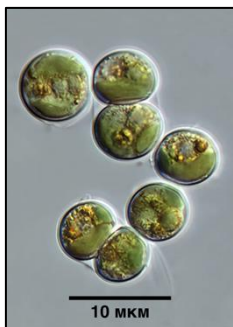


Рисунок 9 - Микрофотография вегетативных клеток *Vischeria magna* SBV108 (Sorokin, B. et al. 2024).

Анализ существующих данных позволяет утверждать, что *Vischeria magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом среди всех почвенных и пресноводных микроводорослей. Содержание ЭПК в биомассе *Vischeria magna* SBV108 составляет 46,1 мг/г. Среди солоноводных штаммов только для *Nannochloropsis oceanica* CY2 показано большее содержание ЭПК - 55,7 мг/г сухого веса (Chen, C.-Y. et al. 2013). Полученные результаты подтверждают ранние наблюдения о перспективности изучения классов Bacillariophyceae, Chrysophyceae и Eustigmatophyceae в качестве источника полиненасыщенных жирных кислот.

В условиях полупромышленного культивирования показано, что при интенсивности освещения 160 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, температуре 28 °С, нейтральных pH - объемный выход ЭПК составил 13,4 мг/л/день. При этом скорость роста *Vischeria magna* SBV108 составила 278 мг/л/день сухой биомассы. Согласно этим данным, волюметрическая продуктивность *Vischeria magna* SBV108 превышает таковую для *Nannochloropsis oceanica* CY2 почти на 30 % (Chen, C.Y. et al. 2018), (Camacho-Rodríguez, J., et al. 2014), в сопоставимых условиях полупромышленного культивирования получена волюметрическая продуктивность ЭПК для штамма *N. gaditana* В-3 - 4,85 мг/л/день. Средняя волюметрическая продуктивность, полученная при культивировании различных штаммов в промышленных условиях (объем более 50 л), не превышала 5,7 мг/л/день.

4. Изучение возможности использования биомассы выделенных штаммов фотосинтезирующих микроорганизмов в аквакультуре

4.1 Фотосинтезирующие микроорганизмы как перспективный корм для аквакультуры

Живые микроводоросли или переработанная микроводорослевая биомасса в замороженном или высушенном виде используется либо для прямого кормления моллюсков, ракообразных и рыбы, либо для обогащения целевым веществом (путем скармливания артемиям и коловраткам) живого корма, который затем служит пищей личинкам и молодняку вышеупомянутых видов.

Микроводоросли являются природным стартовым кормом для многих аквакультурно-значимых видов и содержат биологически-активные вещества, незаменимые для полноценного роста и развития малька. В этой связи добавление биомассы микроводорослей в стартовые корма для аквакультуры представляет собой перспективную биотехнологическую задачу.

Показано, что омега-3 жирные кислоты, в основном эйкозапентаеновая и докозагексаеновая, могут оказывать стимулирующее влияние на рост рыб, особенно на ранних стадиях развития (Watters, C. et al. 2012). Кроме того, добавление ЭПК и ДГК в рацион аквакультуры повышает пищевую ценность рыбного мяса (Sarker, P. K. et al. 2016a).

Многочисленные исследования показывают важность антиоксидантов для здоровья гидробионтов. Фукоксантин - это природный антиоксидант, часто встречающийся в

микроводорослях (в основном у представителей гетероконтных и гаптофитовых водорослей), которые являются естественным кормом для личинок и молоди многих гидробионтов.

4.2 Приготовление тестовых кормов на основе биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов

Биомассу *Vischeria magna* SBV108 и *Mallomonas furciva* SBV13 нарабатывали в фотобиореакторе Lumian AGS 260 согласно полученным ранее протоколам. В течение 14-дневного периода роста обоих штаммов произошло полное потребление азота и фосфора в среде культивирования. Итоговая плотность штамма *Vischeria magna* SBV108 составляла 4 г/л, а *Mallomonas furciva* SBV13 - 2 г/л.

Общий химический состав лиофилизированной биомассы штаммов *Vischeria magna* SBV108 и *Mallomonas furciva* SBV13 приведен в (Таблица 5, 6).

Таблица 5 - Химический состав биомассы *Vischeria magna* SBV108 (Sorokin, B. et al. 2024).

Компонент	Содержание, % сухого веса
Белки	23,2
Всего липидов	38,6
Всего углеводов	28,2
Зола	10,0
Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухого веса
C14:0	2,5
C16:1 (n-7)	50,1
C16:0	12,2
C18:2 (n-6)	13,8
C18:1 (n-9)	9,5
C20:4 (n-6)	6,3
C20:5 (n-3) ЭПК	46,1

Таблица 6 - Химический состав биомассы *Mallomonas furciva* SBV13 (Sorokin, B. et al. 2024).

Компонент	Содержание, % сухого веса
Белки	41,3
Всего липидов	15,4
Всего углеводов	15,7
Зола	25,0
Фукоксантин	2,6
Жирнокислотный профиль	Содержание, мг/г сухого веса
C14:0	19,3
C16:0	7,9
C18:1 (n-9)	29,5
C18:2 (n-6)	12,7
C18:4 (n-3)	10,4
C22:2 (n-6) EPA	2,1

Было приготовлено три тестовых корма: Корм 1, содержащий 10 % масс *Vischeria magna* SBV108; Корм 2, содержащий 10 % масс *Mallomonas furtiva* SBV13; Корм 3, содержащий 5 % масс *Vischeria magna* SBV108 и 5 % масс *Mallomonas furtiva* SBV13. Гомогенизированный корм Supreme-15 использовался в качестве контроля (Таблица 7).

Таблица 7 - Расчетный химический состав тестируемых кормов (Sorokin, B. et al. 2024).

Компонент	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3
<i>Mallomonas furtiva</i> SBV13 биомасса (% от веса)	0	0	10	5
<i>Vischeria magna</i> SBV108 биомасса (% от веса)	0	10	0	5
Белки (% сухого веса)	46,0	43,7	45,8	45,1
Липиды (% сухого веса)	15,0	17,3	15,1	16,2
Углеводы (% сухого веса)	8,0	9,9	8,9	9,3
Общая энергия (кДж/г)	21	22	21	22

Тестируемые Корма 1 и 3 содержали биомассу *Vischeria magna* SBV108, что привело к более высокому конечному содержанию липидов и меньшему содержанию белка. В составе Корма 2, где использовалась только биомасса *Mallomonas furtiva* SBV13, общее содержание белка и липидов почти соответствовало контрольному корму Supreme-15 (Таблица 7).

4.3 Оценка ростовых характеристик и показателей эффективности кормления мальков красной тиляпии

Итоговый вес всех рыб по завершении эксперимента превысил 1 г, что говорит об эффективности исследованных кормов. За время эксперимента не было зафиксировано гибели рыб ни в одном из аквариумов. Лучший результат был получен при использовании Корма 1 (10 % по весу *Vischeria magna* SBV108), конечный вес тиляпии составил 1,27 г, что почти на 25 % выше, чем в контрольной группе (1,03 г) ($p < 0,05$). Конечный вес рыб, которым давали Корм 3 (5 % по весу *Vischeria magna* SBV108 + 5% по весу *Mallomonas furtiva* SBV13) или Корм 2 (10 % по весу *Mallomonas furtiva* SBV13), статистически не отличался от веса рыб в экспериментах с коммерческим кормом. Средние значения абсолютного прироста и абсолютной скорости роста рыб во всех экспериментальных группах превысили показатели контрольной группы, однако только для Корма 1 эта разница была статистически значимой: удельная скорость роста была на 25 % выше. Удельная скорость роста при кормлении Кормом 2 и 3 не отличались от контроля. Обобщенные данные ростовых характеристик приведены в таблице 8.

Таблица 8 - Влияние тестируемых кормов на ростовые характеристики мальков красной тилапии (Sorokin, B. et al. 2024).

Параметры	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-значени е	P-значени е
Начальный вес, г	$0,57 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,01$	1,72	0,167
Финальный вес, г	$1,03 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,07$	$1,08 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,04$	4,56	0,005
Абсолютный прирост, г	$0,46 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,07$	$0,50 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,04$	4,56	0,005
Средняя скорость роста, г/день	$0,03 \pm 0,002$	$0,05 \pm 0,005$	$0,03 \pm 0,003$	$0,04 \pm 0,003$	4,07	0,009
Удельная скорость роста, % /день	$3,97 \pm 0,31$	$5,16 \pm 0,37$	$4,06 \pm 0,32$	$4,81 \pm 0,26$	3,38	0,021
Выживаемость, %	100	100	100	100	-	-

Коэффициент конверсии корма, а также эффективность использования белка и энергии являются важнейшими параметрами кормов. В экспериментах было показано, что Корм 1 статистически значимо превосходит тестируемые Корм 2 и 3, а также коммерческий корм, по следующим параметрам: конверсия корма, прирост на грамм кормового белка, эффективность использования белка и энергии. Показатель эффективности использования белка при добавлении микроводорослей существенно повысился для Корма 1 и Корма 3, 26 % и 20 %, соответственно. Экспериментальные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Влияние тестируемых кормов на эффективность использования мальками красной тилапии энергии и белка (Sorokin, B. et al. 2024).

Параметр	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-значение	P-значение
Конверсия корма	$1,56 \pm 0,17$	$1,07 \pm 0,11$	$1,43 \pm 0,13$	$1,13 \pm 0,09$	3,27	0,024
Прирост на грамм кормового белка	$1,77 \pm 0,14$	$2,84 \pm 0,27$	$1,94 \pm 0,18$	$2,23 \pm 0,14$	5,77	0,001
Эффективность использования белка, %	14 ± 1	26 ± 2	18 ± 1	20 ± 1	13,36	<0,001
Эффективность использования энергии, %	11 ± 1	16 ± 1	12 ± 1	13 ± 1	4,62	0,004

4.4 Химический анализ кормов и мяса красной тилапии

Обобщенные результаты влияния экспериментальных кормов на химический состав мяса рыб приведены в таблице 10. Содержание белка, жира, а также энергетическая ценность мяса рыб увеличилось по сравнению с начальным, что свидетельствует о хорошей усвояемости тестируемых кормов. В то же время, добавление микроводорослей в коммерческий корм Supreme-15 не привело к изменению состава мяса мальков тилапии.

Таблица 10 - Влияние тестируемых кормов на химический состав мяса мальков красной тилапии (Sorokin, B. et al. 2024).

Параметр	Начальное значение	Контроль	Корм 1	Корм 2	Корм 3	F-значение	P-значение
Белок (% сухого веса)	63,1 ± 0,21	66,5 ± 0,25	68,6 ± 0,27	66,3 ± 0,21	67,2 ± 0,35	2,925	0,132
Жиры (% сухого веса)	7,9 ± 0,15	11,6 ± 0,60	11,8 ± 0,46	11,0 ± 0,72	10,9 ± 0,55	1,875	0,253
Углеводы (% сухого веса)	16,6 ± 0,02	7,2 ± 0,05	4,6 ± 0,12	7,9 ± 0,08	7,5 ± 0,07	3,834	0,08
Зола (% сухого веса)	12,4 ± 0,32	14,7 ± 0,25	15 ± 0,15	14,8 ± 0,19	14,4 ± 0,38	1,283	0,396
Энергия (кДж/г мокрого веса)	1,89 ± 0,10	2,11 ± 0,22	2,38 ± 0,03	2,33 ± 0,14	2,34 ± 0,18	2,012	0,231

Микроводоросли являются незаменимым источником питания для молодняка рыб, моллюсков и ракообразных в естественной среде обитания. Многие штаммы содержат биологически-активные вещества (например, полиненасыщенные жирные кислоты), необходимые для успешного развития молоди рыб. Для стартовых аквакультурных кормов особое значение имеет содержание ЭПК и ДГК, так как потребность личинок и мальков рыб в этих соединениях практически вдвое превосходит потребность взрослых особей. Вероятно, это связано с активным неврологическим развитием мальков (Izquierdo, M. et al. 1997). Кроме того, включение омега-3-полиненасыщенных жирных кислот в рацион рыб является основным методом повышения содержания данных соединений в товарном мясе (Stoneham, T. R. et al. 2018). В работе (Ju, Z. Y. et al. 2017) показано, что включение микроводорослей в рацион тилапии приводит к увеличению доли омега-3 ПНЖК, в особенности ДГК, в мясе. Недавние исследования показали, что обогащенная ДГК биомасса микроводоросли *Schizochytrium sp.* является перспективным кандидатом для полного замещения рыбьего жира в кормах для ювенильных стадий Нильской тилапии (Sarker, P. K. et al. 2016).

5. Изучение антимикробных веществ, продуцируемых фотосинтезирующими микроорганизмами

5.1 Проблема устойчивости бактерий к антимикробным препаратам

При сохранении текущей тенденции развития и распространения лекарственной устойчивости к 2050 году суммарные потери мировой экономики превысят 100 трлн долларов США, а суммарные человеческие потери составят 300 млн смертей (Antimicrobial Resistance Collaborators. 2022).

Внутрибольничные инфекции, вызываемые метициллин-резистентным золотистым стафилококком (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA), являются одной из основных причин смертности, продолжительности пребывания в больнице и расходов на лечение. В России доля устойчивых к антибиотикам штаммов MRSA на протяжении последних 10 лет сохраняется в среднем на уровне 40 %. Частота распространения MRSA в некоторых отделениях реанимации, онкологии и гематологии превышает 50 % - 60 %, что создает крайне серьезные проблемы для терапии.

Распространение антибиотикорезистентности делает необходимым поиск антимикробных препаратов с принципиально новыми механизмами действия.

5.2 Поиск антимикробных соединений из фотосинтезирующих микроорганизмов

В целях поиска более высокомаржинальных соединений, ориентированных, прежде всего, на фармацевтический рынок, проводили поиск биологически активных соединений из микроводорослей. В частности, были изучены антимикробные свойства спиртовых, водных экстрактов биомассы микроводорослей. Дополнительно исследовали противомикробную активность культуральной жидкости.

Для культуральной жидкости консорциума микроводоросли *Dunaliella salina* с гетеротрофными микроорганизмами, в том числе нитчатым грибом *Streptomyces* sp., была показана антимикробная активность против различных грамположительных бактерий, в том числе MRSA.

Было выделено вещество 3-[(4-Метил-пиперазин-1-ил)дiazенил]-1H-индол-2-карбоксилат (BX-SI001), относящееся к классу триазеноиндолов, для которых ранее в экспериментах *in vitro* был показан ряд биологических эффектов, в том числе противоопухолевый, противогрибковый и антимикобактериальный (Majorov, K.B. et al. 2020), (Nikonenko, B. V. et al. 2016), (Reddyrajula, R. et al. 2024), (Iyer, K. R. et al. 2023).

5.3 Дизайн и синтез библиотеки соединений-модификаций BX-SI001

На первом этапе была проведена оптимизация свойств исходного соединения BX-SI001. Целью было создание производных оригинальной молекулы, обладающих большей антибактериальной активностью и лучшими фармакокинетическими свойствами триазениндольного ядра. После анализа рассчитанных *in silico* физико-химических характеристик и сопоставления с литературными данными, была отобрана и синтезирована 21 наиболее перспективная модификация вещества BX-SI001.

Синтезированные соединения относились к трем основным группам: замещенные триазеноиндолы, замещенные 6-фтор-3-триазеноиндолы и замещенные 3-триазен-пирролы [2,3]

пиридины. В качестве заместителей у триазеновой группы выступали различные циклические и ациклические вторичные амины. Каждое вещество было синтезировано в количестве 10 мг. Оценка растворимости синтезированных соединений в воде показала хорошую корреляцию с данными анализа *in silico*. Для широкого спектра производных триазеноиндола был разработан простой двухстадийный синтез с использованием четырех соединений-предшественников (Рисунок 10).

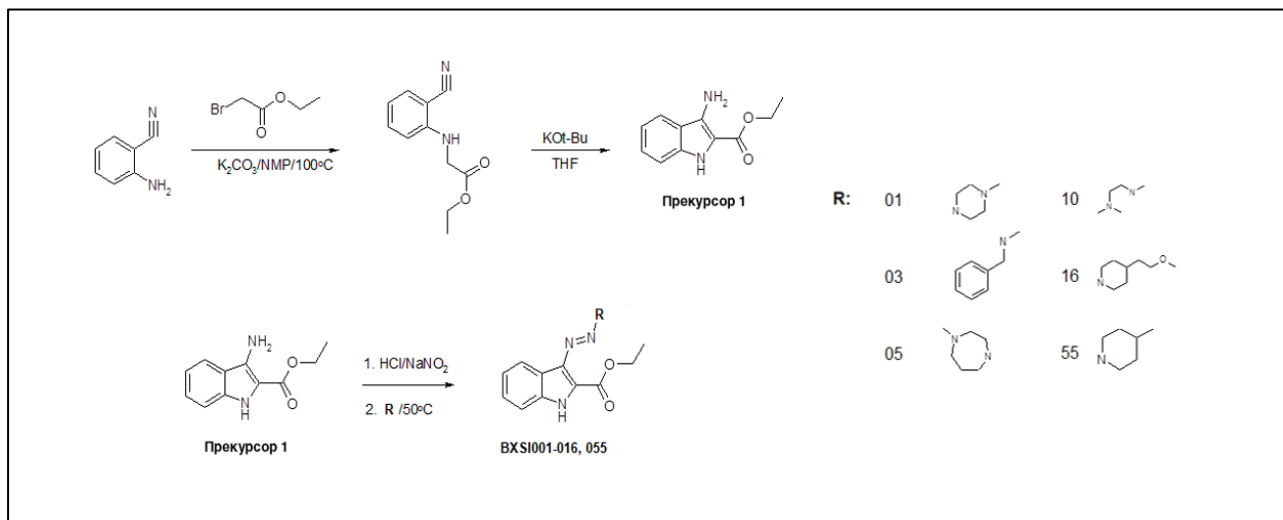


Рисунок 10 - Пример двухстадийной схемы синтеза соединений BX-SI001, 003, 005, 010, 016, 055.

5.4 Определение антимикробной активности и цитотоксичности оригинального соединения BX-SI001 и его модификаций

Антимикробная активность вещества BX-SI001 и его модификаций была изучена на панели 8 клинических изолятов MRSA с наиболее полным профилем резистентности к существующим антибиотикам.

Все 6 наиболее активных соединений относятся к группе замещенных 6-фтор-3-триазеноиндолов (Рисунок 11А) и подавляют рост резистентных штаммов золотистого стафилококка эффективнее по сравнению с применяемыми в клинике препаратами - ванкомицином и линезолидом. Структуры данных веществ были выбраны для включения в патентную заявку (Патент RU2712265C1.2020).

Результаты определения антибактериальной активности 6 наиболее активных соединений приведены на рисунке 11Б. Для этих модификаций значения МИК (Минимальная Ингибирующая Концентрация) было в 2-4 раза ниже, чем у исходной молекулы BX-SI001. Ванкомицин и линезолид приведены в качестве контрольных соединений.

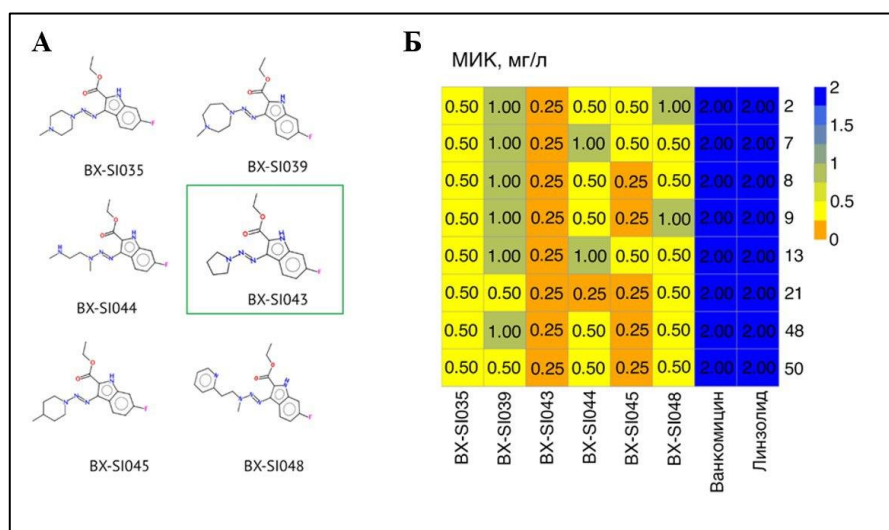


Рисунок 11 - А - Структурные формулы и Б - значения МИК наиболее активных модификаций BX-SI001.

В качестве лидирующего кандидата было выбрано соединение BX-SI043, поскольку для него значения МИК для восьми клинических изолятов MRSA составляли 0,25 мг/л.

Антимикробное действие вещества BX-SI043 было дополнительно изучено на расширенной панели, состоящей из 51 клинического изолята MRSA. Штаммы были получены от НИИ «Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии», г. Смоленск. В качестве контроля профиля резистентности использовали эритромицин.

Было установлено, что почти для всех клинических изолятов значения МИК для вещества BX-SI043 были ниже в 2-4 раза в сравнении со значениями МИК вещества BX-SI001 и составляли 0,125-0,5 мг/л. Параллельно с исследованием антимикробной активности 21 модификаций вещества BX-SI001 проводилась оценка их *in vitro* токсичности на клеточных линиях фибробластов и гепатоцитов. На основании полученных данных для каждого соединения был рассчитан индекс селективности, равный отношению средних значений IC_{50} к средним значениям МИК. Наибольшей селективностью (76) обладало вещество BX-SI043 (Таблица 11).

Таблица 11 - Цитотоксичность и индекс селективности BX-SI001 и его модификаций.

Вещество	IC_{50} , мг/л		Индекс селективности
	HEF	HepG2	
BX-SI001	$19 \pm 0,8$	$22 \pm 1,6$	19
BX-SI035	20 ± 1	$21 \pm 1,4$	41
BX-SI039	$19 \pm 0,8$	$16 \pm 0,6$	20
BX-SI043	$19 \pm 0,7$	$19 \pm 0,8$	76
BX-SI044	$19 \pm 0,8$	$13 \pm 0,4$	27
BX-SI045	$29 \pm 1,4$	$22 \pm 1,5$	74
BX-SI048	$13 \pm 0,5$	$22 \pm 1,6$	28

5.5 Определение фармакокинетических свойств вещества BX-SI043

Соединение BX-SI043 было наработано в количестве 18 г и отправлено на ADME анализ (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion).

В результате исследования было установлено, что субстанция BX-SI043 быстро подвергается метаболизму в микросомальной фракции печени человека и крыс с периодом полураспада 2,7 и 1,3 мин, соответственно. Исследования стабильности в искусственном кишечном и желудочном соке показали, что соединение BX-SI043 нестабильно в кислой среде (желудочном соке, pH 1,2) - $t_{1/2} < 10$ минут, и подвергается метаболизму на 90 % за 4 часа в нейтральной среде (кишечном соке, pH 6,8) - $t_{1/2} = 1$ час.

Исследуемое соединение BX-SI043, либо его метаболиты в микросомах печени человека в концентрации до 10 мкМ не оказывали влияние на изоформы цитохрома CYP450. Исследования стабильности в плазме крови человека и крыс показали, что субстанция BX-SI043 метаболизируется в плазме человека на 97 % за 4 ч инкубации, и 1,7 % субстанции остается через 15 мин инкубации в плазме крови крыс. Вещество BX-SI043 обладает низкой проницаемостью через клеточную мембрану в обоих направлениях - со стороны апикальной мембраны к базолатеральной мембране и наоборот ($P_{app} < 1 \cdot 10^{-6}$ см/с). Также для BX-SI043 характерно низкое значение массового баланса, вероятней всего, по причине нестабильности в клеточной среде.

Для исследуемой субстанции BX-SI043, либо ее метаболитов, характерно слабое ингибирование hERG-зависимых калиевых каналов на 33 % при значении IC_{50} более 50 мкМ.

5.6 Исследование острой токсичности соединения BX-SI043 *in vivo*

На следующем этапе исследовали острую токсичность лидирующего кандидата BX-SI043 *in vivo* при внутрижелудочном введении. Работу проводили совместно с ООО «Институт доклинических исследований». В качестве тестовых организмов брали половозрелых самцов и самок аутбредных крыс. Такие животные успешно используются в токсикологических экспериментах и имеют достаточную массу и площадь поверхности тела с точки зрения возможности введения такого количества исследуемых веществ, которое является необходимым для регистрации токсических эффектов.

Внутрижелудочное введение лекарственных препаратов крысам часто используется для моделирования перорального применения у людей, поскольку ранее была показана высокая корреляция получаемых результатов (Harloff-Helleberg, S. et al. 2017). Общий дизайн эксперимента представлен в таблице 12.

Таблица 12 - Летальные эффекты (пало/всего) после внутрижелудочного введения крысам тестируемого вещества BX-SI043.

Группы	№1	№2	№5	№4	№3
Доза, мг/кг	0	300	600	1000	2000
Контрольная группа, самцы	0/4	-			
Контрольная группа, самки	0/4	-			
Тестируемая субстанция, самцы	-	0/6	0/6	1/6	3/6
Тестируемая субстанция, самки	-	0/6	0/6	1/6	1/6

Гибель животных и признаки интоксикации фиксировали с 3-го по 8-й дни эксперимента. У животных, получивших тестируемую субстанцию в дозах 1000 и 2000 мг/кг, отмечали угнетение поведения, изменение реакции на раздражители. В группе, получившей тестируемую субстанцию в дозе 2000 мг/кг, также наблюдали взъерошенность шерсти и выделения из носа. Начиная с 9-го дня эксперимента, состояние и внешний вид животных, получивших тестируемую субстанцию, не отличалось от состояния контрольной группы.

Масса тела животных до начала эксперимента не различалась между группами. Влияния субстанции на массу тела животных не выявлено. Тестируемая субстанция снизила потребление корма животным, получившим тестируемую субстанцию в дозах 1000 и 2000 мг/кг на второй день эксперимента. Тестируемая субстанция не оказала влияния на потребление воды экспериментальными животными. Отсроченного влияния тестируемой субстанции на индивидуальное поведение экспериментальных животных не обнаружено.

Влияния внутрижелудочного введения тестируемой субстанции на массовые коэффициенты органов животных не установлено. При проведении плановой некропии выявлены патологические изменения в желудке у животных, получивших субстанцию в дозах 600, 1000 и 2000 мг/кг. В ряде случаев обнаружено ороговение эпителия безжелезистой части желудка. Других отклонений при плановой некропии не обнаружено. Полученные результаты свидетельствуют о наличии местно-раздражающего действия у тестируемой субстанции.

Таким образом, по результатам исследования была установлена максимально переносимая доза тестируемой субстанции, которая составила 600 мг/кг.

По параметрам острой токсичности тестируемую субстанцию можно отнести к 3-му классу умеренно опасных веществ по ГОСТ 12.1.007-76 ($151 \text{ мг/кг} < \text{ЛД}_{50} (\text{в/ж}) < 5000 \text{ мг/кг}$).

Фармакокинетические свойства BX-SI043, без дополнительных модификаций молекулы, делают соединение плохо применимым для перорального введения, несмотря на относительно низкую токсичность при внутрижелудочном введении.

В этой связи исследования эффективности соединения BX-SI043 на модели крыс с острой бактериальной инфекцией кожи и кожных структур, вызванной MRSA, при топическом пути введения может стать следующим этапом развития данного направления работы. Важнейшее значения в последующих исследованиях будет иметь определение конкретного механизма, лежащего в основе бактерицидного эффекта соединения BX-SI043.

6. Разработка методов широкомасштабного скрининга экстрактов фотосинтезирующих микроорганизмов для выявления биологически активных молекул

6.1 Проблема существующих подходов к поиску новых противоопухолевых молекул из фотосинтезирующих микроорганизмов

Согласно данным ВОЗ в 2023 г., во всем мире было зарегистрировано 20 млн новых случаев рака и 9,7 млн случаев смерти от онкологических заболеваний. В России онкологические заболевания уносят более 300 тысяч человек в год, рак диагностируется более чем у 600 тысяч граждан РФ ежегодно (Cancer today. URL: <https://gco.iarc.fr/today/en>). Несмотря на развитие и совершенствование традиционных подходов к лечению онкологических заболеваний, проблема лечения большинства форм рака остается чрезвычайно актуальной и весьма далекой от решения.

Микроводоросли представляют собой многообещающий источник противоопухолевых веществ. Исследования показывают, что такие компоненты, как альгинаты, фукоидан, зостерин и уникальные сульфатированные полисахариды и пептиды, содержащиеся в микроводорослях,

обладают активностью против опухолей (Galasso, C. et al. 2019). Водные экстракты различных морских микроводорослей продемонстрировали цитостатическую активность по отношению к клеточным линиям рака человека, включая рак легкого, простаты, желудка, молочной и поджелудочной железы (Somasekharan, S. P. et al. 2016). Противоопухолевые свойства различных неочищенных экстрактов микроводорослей были описаны в экспериментах *in vitro* для целого ряда штаммов (Jabeen, A. et al., 2017).

Большинство исследователей при поиске оригинальных биологически активных соединений придерживаются следующего подхода: 1) сбор биомассы или культуральной жидкости; 2) экстракция согласно протоколам, соответствующим химической природе изучаемого соединения; 3) тестирование экстрактов *in vitro* в различных модельных системах; 4) очистка и описание структуры индивидуальной молекулы (препаративная и высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ЯМР и др.).

Такой подход имеет ряд существенных ограничений, из-за чего значительная часть исследований ограничивается предварительной оценкой/описанием биологической активности. Чаще всего фиксируются свойства неочищенного экстракта, реже - фракции и в исключительных случаях - отдельной молекулы (Savio, S. et al. 2021).

6.2 Технология Онкобокс

В целях оптимизации поиска биологически активных веществ из микроводорослей была использована технология Онкобокс (Патент WO2019168426A1. 2019), позволяющая эффективно оценивать клиническую эффективность существующих таргетных лекарственных средств для индивидуального пациента с пролиферативным или онкологическим заболеванием. Используя результаты мультиомиксного профилирования, платформа Онкобокс вычисляет профили активации внутриклеточных сигнальных путей на основе интегрированной модели сигналом человеческой клетки, а затем оценивает потенциальную эффективность воздействия фармпрепаратов с известным спектром молекулярных мишеней на индивидуального больного (Tkachev et al., 2020), (Zolotovskaia et al., 2022) (Рисунок 12).

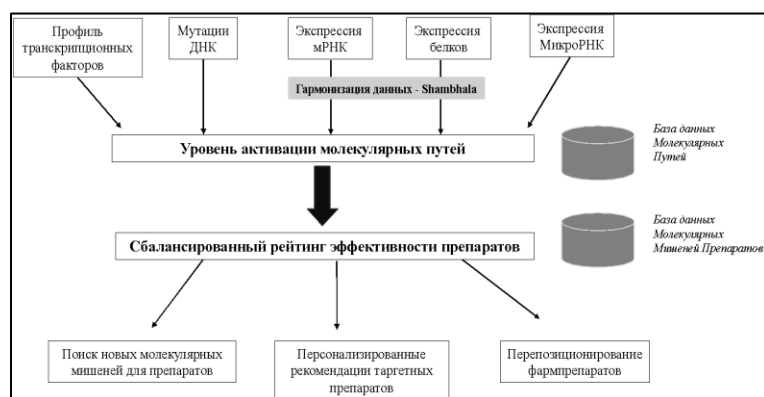


Рисунок 12 - Принципиальная схема технологии Онкобокс.

Профили активации внутриклеточных сигнальных путей или PAL (Pathway Activation Level) (Sorokin, M. et al. 2021) позволяют оценивать совокупное влияние изменения генной экспрессии на состояние активации отдельных молекулярных путей. В терминах PAL можно охарактеризовать любой сигнальный путь, при условии, что известны взаимоотношения между генами в этом пути.

6.3 Моделирование влияния экстрактов фотосинтезирующих микроорганизмов на жизнеспособность клеток опухолевой линии HL-60 на основе транскриптомных данных

Потенциал предиктивной аналитики данной технологии был валидирован в отношении противоопухолевой активности тотальных экстрактов биомассы микроводорослей. В качестве модели была выбрана клеточная линия HL-60 (острый промиелоцитарный лейкоз), АТСС. Изменения профилей активности отдельных генов в ответ на воздействия тысяч различных препаратов были детально каталогизированы в предварительных модельных экспериментах исследовательского консорциума Broad Institute (Subramanian, A. et al. 2017).

Для экспериментального тестирования была отобрана группа из 50 про- и эукариотических микроводорослей различного происхождения, относящихся к следующим 9 классам (Таблица 13) (Namsaraev, Z. et al. 2023).

Таблица 13 - Распределение изучаемых микроводорослей по классам.

Эукариотические микроорганизмы	Число штаммов
Chlorophyceae	10
Zygnemorphyceae	6
Trebouxiophyceae	5
Bacillariophyceae	3
Xanthophyceae	2
Chrysophyceae	1
Eustigmatophyceae	1
Rhodophyceae	1
Прокариотические микроорганизмы	Число штаммов
Cyanobacteria	21

В качестве положительного контроля был выбран β -спилечный антимикробный пептид полифемузин III, выделенный из гемоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus*. Противоопухолевая активность антимикробных пептидов обусловлена нарушением целостности мембраны раковых клеток. Внутримолекулярные мишени полифемузина III, запускающие некроз, были хорошо изучены ранее (Marggraf, M. B. et al. 2018).

Для оценки цитотоксического эффекта изучаемых экстрактов был проведен анализ числа активируемых генов и сигнальных путей, ассоциированных с клеточной гибелью (согласно литературным данным). Результаты показаны в таблице 14.

Таблица 14 - Число активированных сигнальных путей, ассоциированных с клеточной гибелью, в зависимости от типа экстракта.

Название фотосинтезирующего микроорганизма	Число активированных молекулярных сигнальных путей
<i>Nostoc sp.</i>	25
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6
<i>Nanochloropsis oculata</i>	5
<i>Closterium sp.</i>	1
<i>Cosmarium sp.</i>	1
Полифемузин III	3

Согласно данным, полученным при использовании технологии Онкобокс, только 5 из 50 экстрактов вызывали активацию хотя бы одного внутриклеточного сигнального пути, ассоциированного с клеточной гибелью. Можно предположить, что в этих экстрактах содержатся вещества, обладающие цитотоксическим эффектом в отношении клеточной опухолевой линии HL-60.

При этом наибольшую активность (25 активированных путей) при анализе транскриптомных данных проявлял экстракт цианобактерии рода *Nostoc sp.* (Рисунок 13).

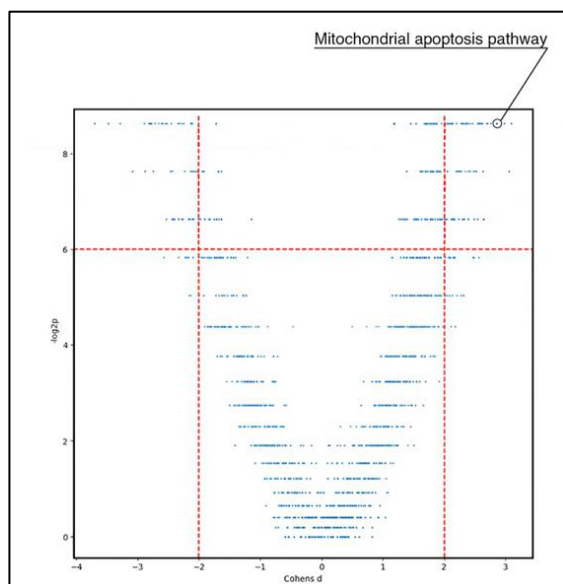


Рисунок 13 - Диаграмма рассеяния для уровней активации 1763 сигнальных путей в клеточной линии HL-60 в ответ на добавление экстракта из *Nostoc sp.* Пунктирными линиями обозначены выбранные границы значимости для путей.

Для представления результатов дифференциальной активации сигнальных путей, по аналогии с классическим анализом дифференциальной экспрессии генов, был использован график рассеяния для большого массива данных (англ. Volcano plot).

Штрихованные линии делят диаграмму рассеяния на шесть частей. Актуальными для анализа являются верхние левые и правые части. В них находятся пути, p -значение которых меньше выбранного порога, а значение Cohen's D (выбранной меры эффекта) - больше. Верхняя правая область соответствует статистически значимым положительным эффектам (после воздействия путь достоверно активируется), верхняя левая - статистически значимым отрицательным эффектам (после воздействия путь достоверно ингибируется).

Как и ожидалось, обработка полифемузином III опухолевых клеток приводила к активации нескольких сигнальных путей, ассоциированных в литературе с клеточной смертью (Рисунок 14).

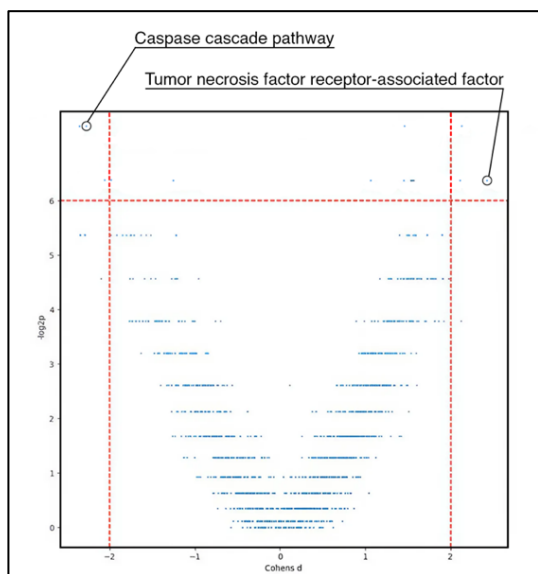


Рисунок 14 - Диаграмма рассеяния для уровней активации 1763 сигнальных путей в клеточной линии HL-60 в ответ на добавление полифемузина III. Пунктирными линиями обозначены выбранные границы значимости для путей.

6.4 Изучение влияния экстрактов на жизнеспособность клеток опухолевой линии HL-60 *in vitro*

На следующем этапе проводили сравнение результатов, полученных при помощи технологии Онкобокс, с результатами прямого измерения цитотоксичности *in vitro*. Для этого проводили изучение влияния экстрактов из микроводорослей на жизнеспособность клеточной линии HL-60 (ATCC) в МТТ-тесте.

МТТ-тест осуществляли с использованием стандартной колориметрической процедуры с рядом изменений (Denizot, F. et al. 1986).

Максимальный объем и состав растворителя для экстрактов (этанол, ДМСО) составил 0,5 % от общего объема среды культивирования клеток.

В таблице 15 приведены основные показатели результатов тестирования экстрактов микроводорослей с оценкой их цитотоксичности, измеренной на клетках линии HL-60.

Для 7 токсичных экстрактов была определена величина полумаксимального ингибирования (IC_{50}). Данные представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Значения цитотоксичности изучаемых экстрактов.

Название фотосинтезирующего микроорганизма	IC_{50} , мкг/мл
<i>Nostoc sp.</i>	$9 \pm 0,57$
<i>Mallomonas sp.</i>	114 ± 5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$280 \pm 55,5$
<i>Closterium sp.</i>	$461 \pm 31,3$
<i>Stichococcus sp.</i>	764 ± 34
<i>Cosmarium sp.</i>	807 ± 7
<i>Phormidium mucicola</i>	828 ± 10

Значение IC_{50} для препарата полифемузина III составило $2,5 \pm 0,1$ мкМ, что хорошо коррелирует с ранее полученными данными (Marggraf, M. B. et al. 2018).

Результаты, основанные на транскриптомных данных, хорошо коррелируют со значениями IC_{50} в случае наиболее токсичного экстракта *Nostoc sp.* Показано совпадение

результатов обоих методов для экстрактов штаммов *Phaeodactylum tricornutum*, *Cosmarium sp.* и *Closterium sp.* Кроме того, в обоих экспериментах был подтвержден эффект положительного контроля - полифемузина III.

Показано, что метод предсказания цитотоксичности, разработанный с использованием технологии Онкобокс, дал результаты, совпавшие с результатами классического МТТ-теста на 92 %. Расхождения двух методов было отмечено лишь для 4 из 50 экстрактов.

На следующем этапе были изучены конкретные сигнальные пути и молекулярные мишени, которые могут быть затронуты в ответ на воздействие на клетки HL-60 экстрактов биомассы *Nostoc sp.* Согласно проведенному статистическому анализу, одними из наиболее сильно измененных сигнальных путей оказались пути, ассоциированные с клеточной гибелью. Значение активации молекулярного пути Mitochondrial apoptosis pathway составило 17,3, при норме - ноль. Для полифемузина III наиболее меняющимися сигнальными путями, оказались связанные с апоптозом Caspase cascade pathway (PAL = - 20,36) и некрозом Tumor necrosis factor receptor-associated factor (PAL = 18,6).

6.5 Изучение цитотоксического эффекта экстракта биомассы *Nostoc sp.*

На следующем этапе, в ходе фракционирования и очистки методами ТФЭ, ВЭЖХ и масс-спектрометрии с последующей идентификацией структуры ЯМР было выявлено, что действующим веществом экстракта биомассы *Nostoc sp.* является цианобактериальный пептидный токсин криптофицин-1 (Рисунок 15). Концентрация в активных фракциях составляла 0,01 %.

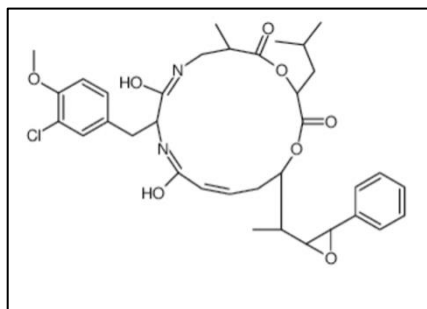


Рисунок 15 - Структура криптофицина -1.

Криптофицины - это основные представители класса макроциклических депсипептидов. Впервые криптофицин был выделен еще в 1990 г. из сине-зеленых водорослей (цианобактерий) рода *Nostoc* (GSV 224) (Shwartz, R. E. et al. 1990). Он оказывал фунгицидное воздействие на грибы и дрожжи семейства *Cryptococcus*, которое и дало название этому классу соединений. Было показано, что большинство криптофицинов проявляют противоопухолевую активность (Jones, M. R. et al. 2021). Предположительный механизм цитотоксического эффекта криптофицинов - деполяризация микротрубочек, вызывающая арест митоза в фазе G1/M. На сегодняшний день открыто множество различных криптофицинов, получены их синтетические аналоги, часть которых проходит клинические испытания в качестве противоопухолевых агентов (Bolatkhan, K. et al. 2017).

Результаты, полученные при помощи технологии Онкобокс, хорошо согласуются с литературными данными, описывающие свойства криптофицина-1.

В экспериментах с использованием технологии Онкобокс был предсказан высокий цитотоксический эффект экстракта из *Nostoc sp.*: статистически значимо оказались изменены 25 молекулярных сигнальных путей, ассоциированных с клеточной гибелью. Более того, анализ отдельных путей показал, что соединения, содержащиеся в экстрактах *Nostoc sp.*, наиболее значимо затрагивают два пути: Mitochondrial apoptosis pathway (Рисунок 16) и Integrin-linked kinase signaling pathway actin polymerization cytoskeletal reorganization.

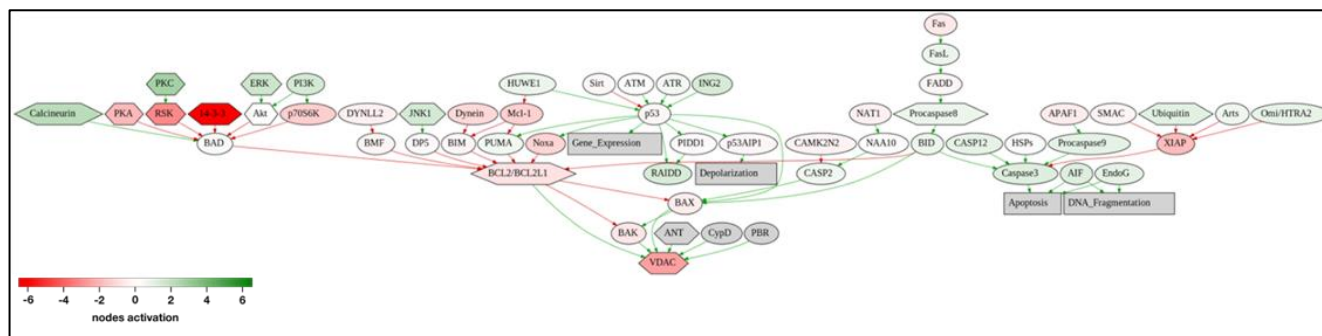


Рисунок 16 - Визуализация узлов сигнального пути Mitochondrial apoptosis pathway клеточной линии HL-60 в ответ на добавление экстракта из *Nostoc sp.* Стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла.

Как видно из рисунка 17, происходит повышение накопление миозина, с одновременным снижением актина.

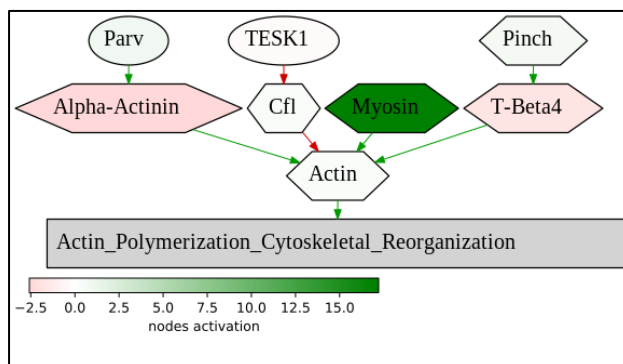


Рисунок 17 - Визуализация узлов сигнального пути Integrin-linked kinase signaling pathway actin polymerization cytoskeletal reorganization клеточной линии HL-60 в ответ на добавление экстракта из *Nostoc sp.* Стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла.

Перестроение цитоскелета в целом может быть следствием разрушения микротрубочек, вызванного добавлением криптофицина-1 (Petrásek, J. et al. 2009). Значение PAL в этом эксперименте составило 18, что указывает на высокий уровень подавления соответствующих сигнальных путей в клетках, обработанных экстрактом *Nostoc sp.*

Ряд исследований указывают на то, что криптофицин-1 способен индуцировать гиперфосфорилирование белка Bcl-2, что ингибирует его антиапоптотические функции (Lu, K. et al. 2001), (Adams, C. P. et al. 2006), (Bule, M. H. et al. 2018). В исследуемых образцах, обработанных экстрактом *Nostoc sp.*, было отмечено изменение митохондриального апоптотического пути (PAL = 17,3), в частности за счет снижения содержания белка Bcl-2.

В случае полифемузина III ранее было показано наиболее значимое воздействие на сигнальные пути, ассоциированные с некрозом/некроптозом. Эти данные хорошо согласуются с описанным ранее механизмом цитотоксического эффекта антимикробных пептидов (Marggraf, M. B. et al. 2018). При этом путь, ассоциированный с апоптозом, был подавлен: PAL = - 20.36 (Рисунок 18).

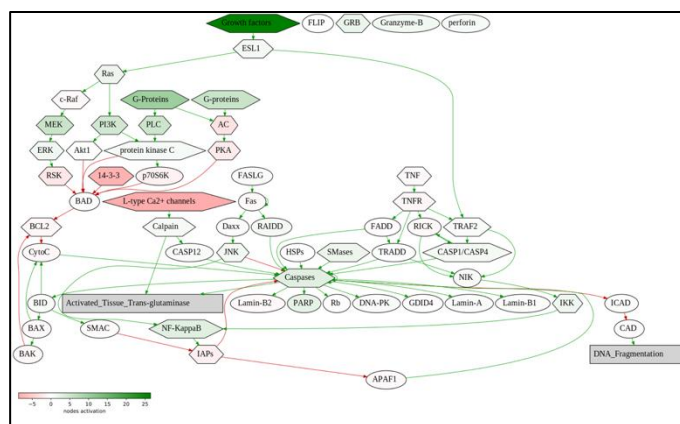


Рисунок 18 - Визуализация узлов сигнального пути Caspase cascade pathway клеточной линии HL-60 в ответ на добавление полифемузина III. Стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла (Marggraf, M. B. et al. 2018).

По результатам данного эксперимента дополнительно была отмечена активация пути синтеза гиалуроновой кислоты: PAL = 21,7 (Рисунок 19), что может быть объяснено защитной ролью этой молекулы в предотвращении клеточной гибели (Dogné, S. et al. 2020).

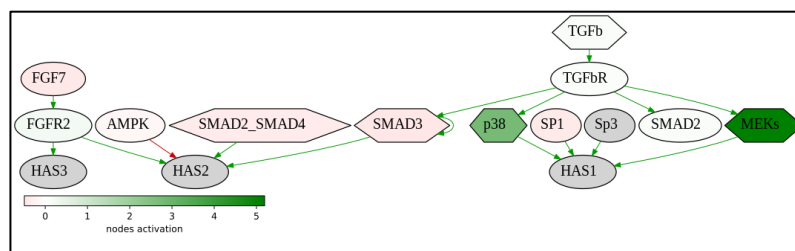


Рисунок 19 - Визуализация узлов сигнального пути Hyaluronic acid pathway клеточной линии HL-60 в ответ на добавление полифемузина III. Стрелки соответствуют активации, красные - ингибированию. Глубина цвета каждого узла графа соответствует логарифмам отношения частоты в эксперименте к норме для каждого узла.

На основании полученных результатов можно утверждать, что использование технологии Онкобокс позволяет с высокой достоверностью предсказать наличие биологически активных молекул, влияющих на жизнеспособность клеток человека, в биомассе микроводорослей.

В контексте поиска новых фармацевтических молекул из микроводорослей, технология Онкобокс позволяет на самых ранних этапах предположить механизм, лежащий в основе того или иного функционального эффекта изучаемой молекулы. Эти данные крайне важны для оценки терапевтического потенциала.

По-видимому, представленная методика может быть применена не только для поиска противоопухолевых соединений. Дифференциальная активация внутриклеточных сигнальных путей, установленная экспериментальным путем, может быть сопоставлена с аннотированными ранее профилями внутриклеточных путей, полученными в ответ на воздействие на клетку тех или иных препаратов (Connectopedia: The CLUE Knowledge Base. URL: <https://clue.io/connectopedia/>).

Таким образом, использование омиксных технологий для количественной оценки уровня активации внутриклеточных молекулярных путей позволяет ускорить выделение новых биологически активных веществ из биомассы микроводорослей.

7. Разработка интегральной платформы для изучения биотехнологического потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов

На основании проведенного анализа существующих подходов к изучению биотехнологического потенциала фотосинтезирующих микроорганизмов предложен новый обобщенный подход, в основе которого лежит платформенное решение (Рисунок 20).

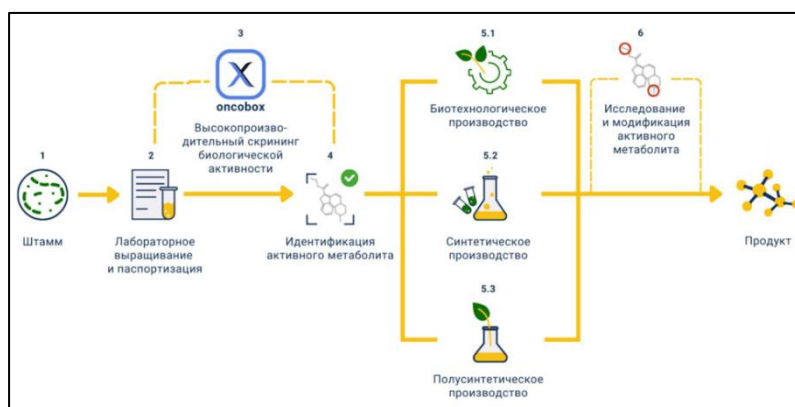


Рисунок 20 - Принципиальная схема биотехнологической платформы.

Суть предлагаемого решения заключается в реализации последовательных этапов: 1) описание новых видов с выделением моноклональных штаммов, их морфологическое, молекулярно-генетическое изучение и биохимический скрининг; 2) изучение ключевых биотехнологических параметров в лабораторных условиях; 3) предсказательная аналитика содержания биологически активных соединений в экстрактах биомассы изучаемых штаммов при помощи технологии Онкобокс; 4) выделение и идентификация активных метаболитов; 5) биотехнологическое/синтетическое и полусинтетическое получение в полупромышленном масштабе ценных молекул; 6) оптимизация физико-химических свойств метаболитов с целью улучшения их свойств.

Биотехнологическая платформа - это набор подходов и протоколов для систематического получения новых продуктов. Предложенная модель позволяет пройти путь от идентификации нового штамма до выделения оригинального соединения, имеющего практическую ценность и промышленные перспективы.

В данной работе был исследован биотехнологический потенциал более 200 штаммов эукариотических и прокариотических фототрофных микроорганизмов. Среди них были штаммы, активно используемые в промышленности, такие как *Phaeodactylum tricornutum* (UTEX L642) и *Nanochloropsis oculata* (CCMP525), а также оригинальные штаммы, выделенные нами из различных источников.

Так, на первом этапе был выделен и охарактеризован *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 - новый высокоэффективный продуцент липидов. Была проведена успешная оптимизация условий культивирования *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11. В условиях азотного и/или фосфорного голодания происходило увеличение содержания липидов с 17 % до 59 % от сухого веса. В

условиях полупромышленного культивирования объемная продуктивность липидов для штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 составила 80 мг/л/день.

При таком подходе, были задействованы следующие элементы платформы: 1, 2, 4, 5.1 (Рисунок 20). В этом случае исследование носило характер «неизвестный штамм - известный продукт», а на последующей стадии оптимизации - «известный штамм - известный продукт».

Затем был применен подход «неизвестный штамм - известный продукт». Обнаружен и охарактеризован новый штамм-продуцент коммерчески значимого антиоксиданта фукоксантина *Mallomonas furcivora* SBV13, определены оптимальные условия культивирования, позволяющие достичь содержания фукоксантина 26,6 мг/г сухой биомассы. Волуметрический выход фукоксантина в условиях полупромышленного культивирования составил 3,7 мг/л/день. Снова были задействованы элементы 1, 2, 4, 5.1 платформы (Рисунок 20).

Далее известный штамм *Vischeria magna* SBV108 из коллекции Института Биологии Коми НЦ УРО РАН (SYKOA) был исследован как потенциальный продуцент липидов и ПНЖК. Содержание эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК) в биомассе *Vischeria magna* SBV108 составило 46,1 мг/г сухого веса. Волуметрический выход ЭПК в условиях полупромышленного культивирования составил 13,4 мг/л/день. Задействованы элементы 1, 2, 4, 5.1 платформы (Рисунок 20).

Последовательное прохождение элементов 1, 2, 4, 5.1 позволило выделить из культуральной жидкости микроводорослей новый антибиотик, активный против MRSA.

Кроме того, была разработана методика химического синтеза (стадия 5.2) исходной молекулы, проведена hit-to-lead оптимизация (стадия 6) и доклинические исследования лучшего производного BX-SI043.

Наконец, анализ активации внутриклеточных путей, ассоциированных с клеточной гибелью, позволил предсказать наличие мощного цитотоксического соединения в биомассе одного из штаммов. Действующее вещество было выделено и охарактеризовано. Им оказался макроциклический депептид криптофицин-1, синтезируемый цианобактерией рода *Nostoc*. На этом этапе работы были последовательно использованы элементы платформы 1, 2, 3, 4, 5.1.

Как уже говорилось ранее, ключевыми особенностями платформы являются многофункциональность, инновационность, гибкость и междисциплинарность.

Многофункциональность платформы подтверждается линейкой продуктов, полученных в ходе работы: липиды, ПНЖК, пигменты, антибиотики, цитотоксические агенты. С точки зрения инновационности, платформа включает в себя не только традиционные элементы - морфологическое описание отдельных штаммов (1) - но и передовые методы использования больших данных и машинного обучения (3). Платформа позволяет работать с широким спектром фотосинтезирующих микроорганизмов - исследовано более 200 видов, покрывающих 14 классов микроводорослей. Представленная биотехнологическая платформа интегрирует различные дисциплины: микробиология, биохимия, биоинформатика и др. Отдельные блоки платформы могут быть дополнены и модифицированы (5.1). К примеру, система промышленного культивирования может быть подобрана исходя из ростовых характеристик штамма. Это могут быть как открытые, так и закрытые системы, трубчатые или панельные фотобиореакторы и т.д.

Согласно другой концепции, важнейшими свойствами платформенных решений являются наличие дифференцированной технологии и возможности масштабирования (Deep-dive into platform biotech companies: phenotypes, business models, destinations. URL: <https://biodraft.substack.com/p/deep-dive-into-platform-biotech-companies>). Одной из таких технологий является Онкобокс, позволяющая проводить высокопроизводительную

предсказательную аналитику биологически активных веществ в биомассе микроводорослей. Данная технология позволит быстро, качественно оценить ценность вторичных метаболитов при моделировании стрессовых условий культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов. При этом входная воронка может быть увеличена до сотен и даже тысяч штаммов. Сопоставление результатов, получаемых для конкретных экстрактов микроводорослей, с данными, описанными в (Connectopedia: The CLUE Knowledge Base. URL: <https://clue.io/connectopedia/>), позволит вести поиск молекул с различными биологическими эффектами. Тем самым возможно решение проблемы создания универсальной тест-системы для использования на предварительных этапах массового скрининга. Технологические этапы 3, 4, 5.1/5.2/5.3 и 6 могут значительно снизить риски, связанные с идентификацией конкретного соединения и масштабированием производства конечного продукта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше результаты отражают разработку единой платформы для поиска штаммов микроводорослей и цианобактерий, обладающих биотехнологическим потенциалом. Описанный подход позволяет пройти полный цикл от выделения новых моноклональных штаммов и проведения их биохимического скрининга до идентификации отдельных биологически активных молекул с последующим синтетическим или биотехнологическим производством в полупромышленном масштабе.

С помощью данного подхода было проанализировано более 200 различных штаммов микроводорослей, представляющих 14 классов. Обнаружены три оригинальных штамма микроводорослей, имеющих исключительное биотехнологическое значение в качестве источника липидов, фукоксантина и ЭПК. В полупромышленных реакторах для этих штаммов была изучена предельная объемная продуктивность целевых метаболитов, что позволило оценить биотехнологическую перспективность микроорганизмов. Важно отметить, что предложенная платформа обладает высокой степенью универсальности как с точки зрения объекта исследования, так и с точки зрения искомого соединения.

Разработанный алгоритм позволил последовательно выделить из культуральной жидкости антибиотическое соединение, провести его идентификацию, улучшить физико-химические свойства, разработать оптимальную схему синтеза *de novo*.

Предсказательная аналитика на основе технологического блока Онкобокс может сократить сроки и риски фармацевтической разработки препаратов из фотосинтезирующих микроорганизмов. Метод был успешно апробирован в рамках изучения экстракта биомассы цианобактерий, содержащих криптофицин-1.

Внедрение методов машинного обучения и использование омиксных технологий на одном из этапов позволит осуществлять воспроизводительный скрининг штаммов микроводорослей на предмет накопления биологически активных молекул высокой добавленной стоимости.

Созданное платформенное решение генерирует объекты интеллектуальной собственности на каждом отдельном этапе. Платформа также является модульной, гибкой и открытой для интеграции передовых методов и инструментов, от аналитической химии до генетического редактирования. Полученные результаты играют важнейшую роль в разработке новых интегральных подходов к раскрытию биотехнологического потенциала микроводорослей и цианобактерий.

Продемонстрирована принципиальная продуктовая логика, повышающая экономическую целесообразность использования биомассы микроводорослей в промышленности. От более низкомаржинальных продуктов, таких как биотопливо и компоненты функциональных добавок, к соединениям с высокой добавленной стоимостью, таких как антибиотики и противоопухолевые препараты.

ВЫВОДЫ

1. Выделен и охарактеризован новый высокоэффективный продуцент липидов *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11. В условиях азотного и фосфорного голодания происходило увеличение содержания липидов с 17 % до 59 % сухой биомассы. Высокая объемная продуктивность (80 мг/л/день) и сбалансированный состав жирных кислот, наряду с относительно высокой скоростью накопления биомассы (2,1 г/л), позволяют предположить, что *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 может быть интересен с точки зрения производства биодизельного топлива. Поиск быстрорастущих штаммов, продуктивных в конкретных климатических условиях, имеет критическое значение для промышленного применения микроводорослей, особенно когда речь идет об относительно низкомаржинальных продуктах, таких как биодизельное топливо.

2. Обнаруженный и охарактеризованный новый штамм *Mallomonas furtiva* SBV13 содержит наибольшее количество фукоксантина в сухой биомассе (26,6 мг/г) среди известных на сегодняшний день природных штаммов микроводорослей при фотоавтотрофном выращивании. Высокая объемная продуктивность (3,7 мг/л/день), наряду с относительно высокой скоростью накопления биомассы (2 г/л), позволяет рассматривать *Mallomonas furtiva* SBV13 в качестве перспективного промышленного продуцента коммерчески значимого пигмента фукоксантина.

3. Охарактеризован новый пресноводный штамм-продуцент омега-3 эйкозапентаеновой кислотой (ЭПК) - *Vischeria magna* SBV108. Штамм *Vischeria magna* SBV108 является наиболее эффективным продуцентом ЭПК среди всех почвенных и пресноводных микроводорослей. Удельное содержание ЭПК в биомассе *Vischeria magna* SBV108 составляет 46,1 мг/г сухого веса. Волюметрическая продуктивность ЭПК в условиях полупромышленного культивирования *Vischeria magna* SBV108 составляет 13,4 мг/л/день, что сопоставимо с лучшими промышленными штаммами-продуцентами. Пресноводность *Vischeria magna* SBV108 является существенным биотехнологическим преимуществом, так как позволяет снизить затраты на культивирование штамма за счет более низкой стоимости питательных сред и отсутствия издержек, связанных с повышенной коррозионной нагрузкой на оборудование.

4. Добавление 10 % по весу биомассы *Vischeria magna* SBV108, богатой омега-3 эйкозапентаеновой кислотой, в рацион питания мальков красной тилляпии (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*) улучшает конверсию корма, ростовые характеристики мальков, эффективность использования ими белка и энергии более чем на 20 %. Добавление биомассы микроводоросли *Mallomonas furtiva* SBV13, содержащей фукоксантин, не привело к значительным изменениям в показателях эффективности корма. Биомасса *Vischeria magna* SBV108 может быть рассмотрена в качестве прототипа одного из важнейших компонентов стартерного корма для мальков красной тилляпии.

5. Из культуральной жидкости консорциума микроводоросли *Dunaliella salina* с гетеротрофными микроорганизмами, в том числе нитчатым грибом *Streptomyces* sp., выделено оригинальное антибиотическое соединение - триазеноиндол (BX-SI001). Создана библиотека из 21 модификации исходной молекулы. Лидирующий кандидат BX-SI043 показал активность и селективность в 4 раза выше исходной молекулы. Для BX-SI043 были проведены *in vitro* фармакокинетические исследования и определена острая токсичность в экспериментах на модельных животных при внутрижелудочном способе введения. Максимально переносимая концентрация для BX-SI043 при внутрижелудочном способе введения крысам составила 600 мг/кг, что позволяет отнести соединение к веществам третьего класса опасности.

6. Впервые для поиска противоопухолевых соединений из биомассы микроводорослей была применена технология Онкобокс. Потенциал предиктивной аналитики данной технологии был валидирован в отношении цитотоксической активности тотальных экстрактов биомассы микроводорослей. Анализ активации внутриклеточных путей, ассоциированных с клеточной гибелью, предсказал наличие мощного цитотоксического соединения в биомассе одного из штаммов. Выделено действующее вещество - макроциклический депсипептид криптофицин-1, синтезируемый цианобактерией рода *Nostoc*. Полученные данные по биологической активности криптофицина-1 хорошо согласуются с описанными ранее в литературе. Результаты эксперимента позволяют рассматривать технологию Онкобокс как перспективный подход для высокопроизводительной предсказательной аналитики содержания биологически активных веществ в микроводорослях.

7. Предложена оригинальная биотехнологическая платформа, отвечающая ключевым критериям: многофункциональность, инновационность, гибкость и междисциплинарность. Ключевым элементом платформы является технология Онкобокс, позволяющая проводить высокопроизводительную аналитику содержания ценных соединений в биомассе микроорганизмов. Использование отдельных элементов представленной платформы позволило получить линейку биотехнологических продуктов различной маржинальности: липиды, ЭПК, фукоксантин, корм для аквакультуры и др.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Gusev, E. S., Martynenko, N. A., Podunay, Y. A., **Kuzmin, D. V.** Morphology, phylogenetic position and distribution of *Mallomonas mangofera* and *Mallomonas foveata* comb. et stat. nov. (Synurales, Chrysophyceae) // Phytotaxa. – 2024. – Vol. 662. – P. 224-2338. (a)
2. Gusev, E. S., Podunay, Y. A., Martynenko, N. A., Tran, H., **Kuzmin, D. V.** *Mallomonas gemina* comb. et stat. nov. (Synurales, Chrysophyceae) – a new combination based on molecular studies // Phytotaxa. – 2024. – Vol. 665. – P. 221-232. (b)
3. Maltsev, Y., Gusev, E., Maltseva, I., Kulikovskiy, M., Namsaraev, Z., Petrushkina, M., Filimonova, A., Sorokin, B., Golubeva, A., Butaeva, G., Khrushchev, A., Zotko, N., **Kuzmin D.** Description of a new species of soil algae, *Parietochloris grandis* sp. nov., and study of its fatty acid profiles under different culturing condition // Algal Research. – 2018. – Vol. 33. – P. 358368.
4. Mamaeva, A., Namsaraev, Z., Maltsev, Y., Gusev, E., Kulikovskiy, M., Petrushkina, M., Filimonova, A., Sorokin, B., Zotko, N., Vinokurov, V., Kopitsyn, D., Petrova, D., Novikov, A., **Kuzmin, D.** Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations // Journal of Applied Phycology. – 2018. – Vol. 30. – P. 2237-2246.
5. Marggraf, M. B., Panteleev, P. V., Emelianova, A. A., Sorokin, M. I., Bolosov, I. A., Buzdin, A. A., **Kuzmin, D. V.**, Ovchinnikova, T. V. Cytotoxic Potential of the Novel Horseshoe Crab Peptide Polyphemusin III // Marine Drugs. – 2018. – Vol. 16. – P. 466.
6. Namsaraev, Z., Kozlova, A., Tuzov, F., Krylova, A., Izotova, A., Makarov, I., Bezgreshnov, A., Melnikova, A., Trofimova, A., **Kuzmin, D.**, Patrushev, M., Toshchakov, S. Biogeographic Analysis Suggests Two Types of Planktonic Prokaryote Communities in the Barents Sea // Biology. – 2023. – Vol. 12. – P. 1310.
7. Petrushkina, M., Gusev, E., Sorokin, B., Zotko, N., Mamaeva, A., Filimonova, A., Kulikovskiy, M., Maltsev, E., Yampolsky, I., Guglya, E., Vinokurov, V., Namsaraev, Z., **Kuzmin, D.** Fucoxanthin production by heterokont microalgae // Algal Research. – 2017. – Vol. 24. – P. 387-393.
8. Rozenberg, J. M., Sorokin, B. A., Mukhambetova, A. N., Emelianova, A. A., Belogurova-Ovchinnikova, O. Y., **Kuzmin, D. V.** Recent advances and fundamentals of microalgae cultivation technology // Biotechnology Journal. – 2024. – Vol. 19. – P. e2300725.
9. Sorokin, B., Gusev, E., Namsaraev, Z., Emelianova, A., Patova, E., Novakovskaya, I., Vinokurov, V., **Kuzmin, D.** Effect of microalgae feed supplementation on growth performance and feeding efficiency of tilapia fry // Journal of Applied Phycology. – 2024. – Vol. 36. – P. 1767-1780.

Патенты на изобретения

1. Патент № 2644260. Штамм одноклеточной микроводоросли *Mallomonas kalinae* - продуцент каротиноида фукоксантина / Кузьмин, Д. В., Гусев, Е. С., Петрушкина, М. А.; заявитель, патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «СОЛИКСАНТ»; заявл. 25.04.2017; опубл. 08.02.2018.
2. Патент № 2712265. Применение 6-фтор-3-триазеноиндолов для терапии инфекций, вызванных MR SA / Кузьмин, Д. В., Сорокин, Б. А., Филимонова, А. В., Емельянова, А. А., Ершова, О. А.; заявитель, патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «ВИРИДИАС»; заявл. 22.02.2019; опубл. 28.01.2020.

3. Патент № 266111. Штамм одноклеточной микроводоросли *Eustigmatos magnus* - продуцент эйкозопентаеновой кислоты / Кузьмин, Д. В., Гусев, Е. С., Петрушкина, М. А., Патова, Е. Н., Новаковская, И. В.; заявитель, патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «СОЛИКСАНТ»; заявл. 13.12.2017; опубл. 11.07.2018.