



Биологический факультет
Московский государственный университет
Кафедра микологии и альгологии

Биоконверсия сахарной мелассы смешанными культурами дрожжей с делецией гена *BGL2* и микроводорослей

Выпускная квалификационная работа магистра

Выполнила студентка 2 курса магистратуры

Мартысюк Мария Геннадьевна

Научные руководители:

в.н.с., д.б.н. Александрова А.В

н.с., к.б.н. Лукьянов А.А.

Москва, 2026

Химический состав мелассы:

- Сахара: сахароза (50-60%), глюкоза и фруктоза (по 5%)
- Органические кислоты: щавелевая, уксусная, лимонная, молочная, гликолевая и др.
- Минеральные вещества: К, Mg, Ca; сульфаты и фосфаты
- Азотсодержащие соединения: бетаин (до 14%) в свекловичной мелассе; **меланоидины** (их высокая концентрация может ингибировать рост микроорганизмов)

В 2024 году в РФ
было произведено
1,37 млн тонн
мелассы

Существующие пути конверсии мелассы



Наш подход: консорциум



Лишь малая часть перерабатывается таким образом

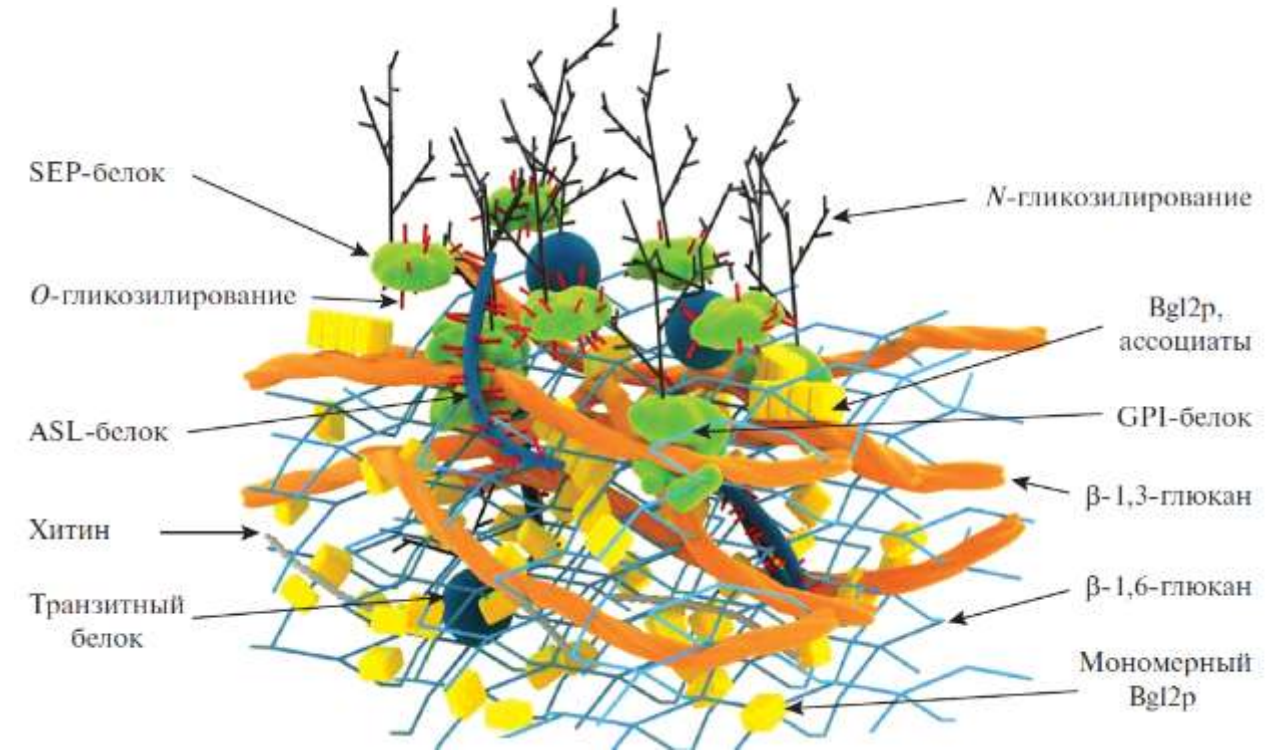
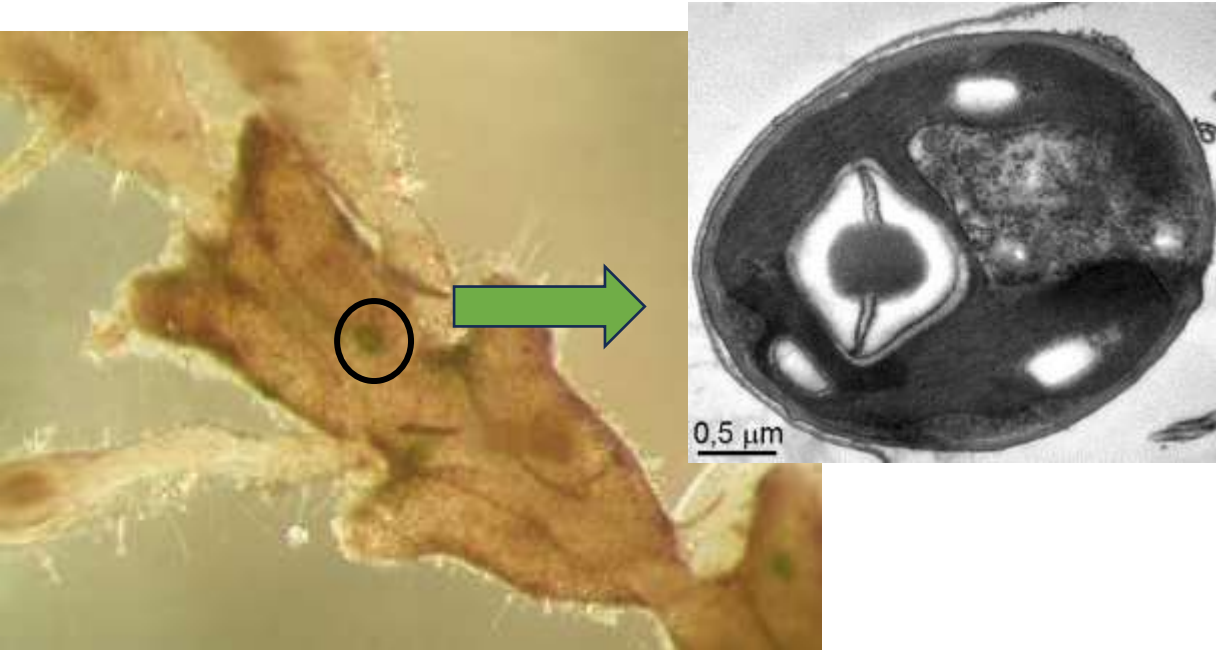
Цель: поиск подходов к эффективной биоконверсии сахарной мелассы смешанными культурами дрожжей с делецией гена *BGL2* и микроводорослей.

Задачи:

- Определить оптимальное разведение мелассы для её засева сокультурой.
- Определить оптимальную с точки зрения продуктивности культуры плотность инокулята дрожжей и микроводорослей для выращивания в разведенной сахарной мелассе.
- Проанализировать зависимость полноты биоизъятия углеводов, способность к генерации белка и развитие микроводорослей в сокультуре от разведения мелассы, использованных штаммов дрожжей и асептики культивирования.
- Изучить изменения таксономического состава микробиома моно- и сокультур дрожжей и микроводорослей на разведенной мелассе, инкубируемых в стерильных (асептических) либо нестерильных (септических) условиях.

Материалы и объекты

- *Saccharomyces cerevisiae* Δ BGL2p (из коллекции каф. молекулярной биологии)
- *Desmodesmus* sp. (IPPAS S-2014) (эндосимбионт гидроидных полипов *Dynamena pumila* Белого моря)
- Свекловичная меласса



Строение клеточной стенки *S. cerevisiae*
(Калёбина с соавт., 2019)

Микрофотография водоросли *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 на полипе *Dynamena pumila* и ТЭМ клетки

Методы исследования

- Стандартные альгологические и микробиологические методы
- Интенсивное культивирование в фотобиореакторе
- Спектрофотометрический анализ: содержание пигментов, остаточных углеводов и суммарного клеточного белка
- ДНК-метабаркодинг микробиома по 16S рРНК (V4, на платформе NGS Illumina)



При культивировании использовались чистые культуры и стерильные среды. При стерильных условиях культивирования в фотобиореакторе использовались фильтры, а в нестерильных повторностях фильтра не было



Схема исследования:

Оценка эффективности биоконверсии мелассы

Монокультура дрожжей Δ BGL2

Сокультура Δ BGL2 и *Desmodesmus sp.*

Подбор оптимальной плотности инокулята и разведения мелассы

Измерение OD на Tecan

Оценка способности к биоизъятию углеводов

Антроновый метод

Оценка физиологического состояния и активности микроводорослей

Экстракция пигментов + спектрофотометр

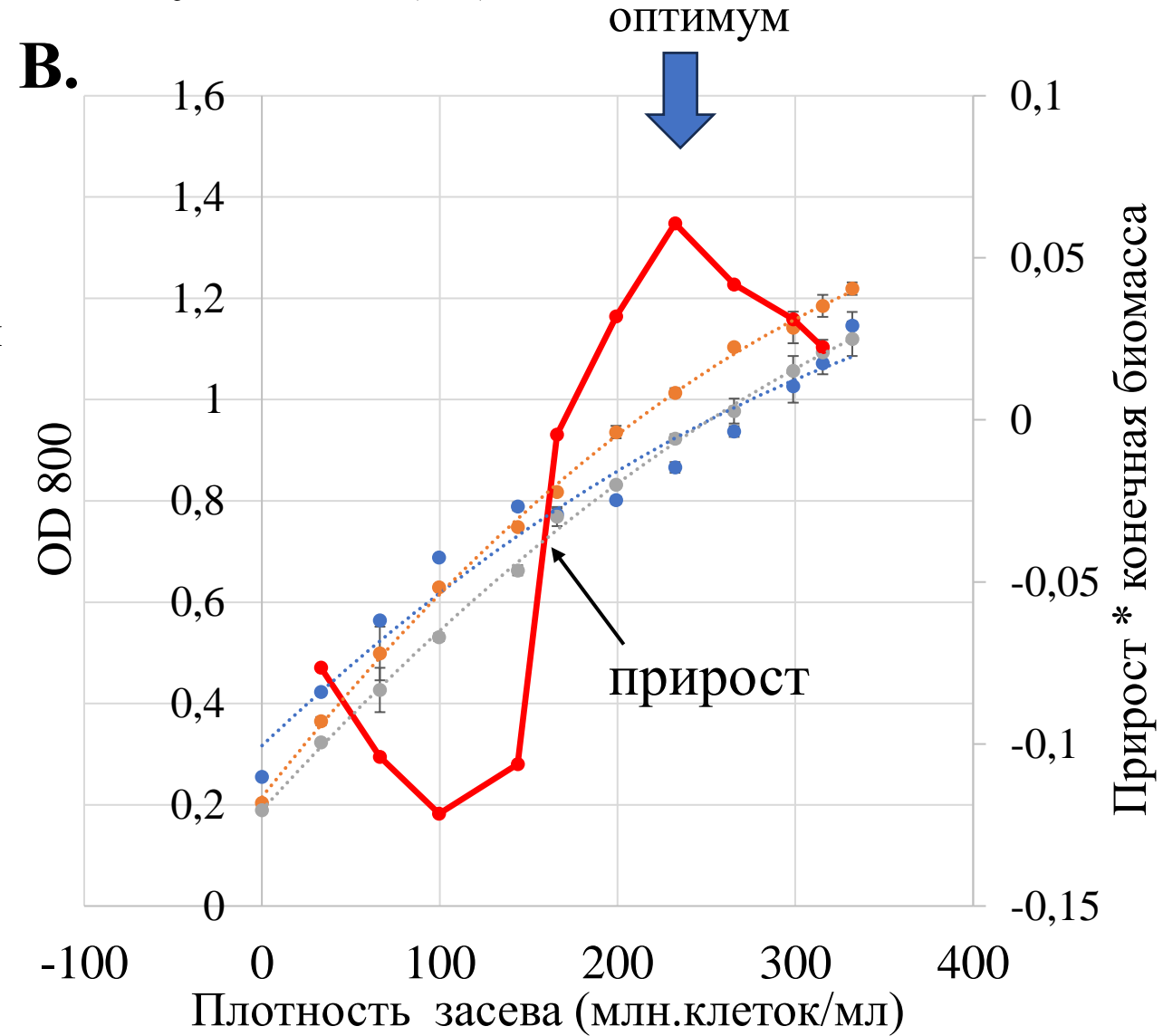
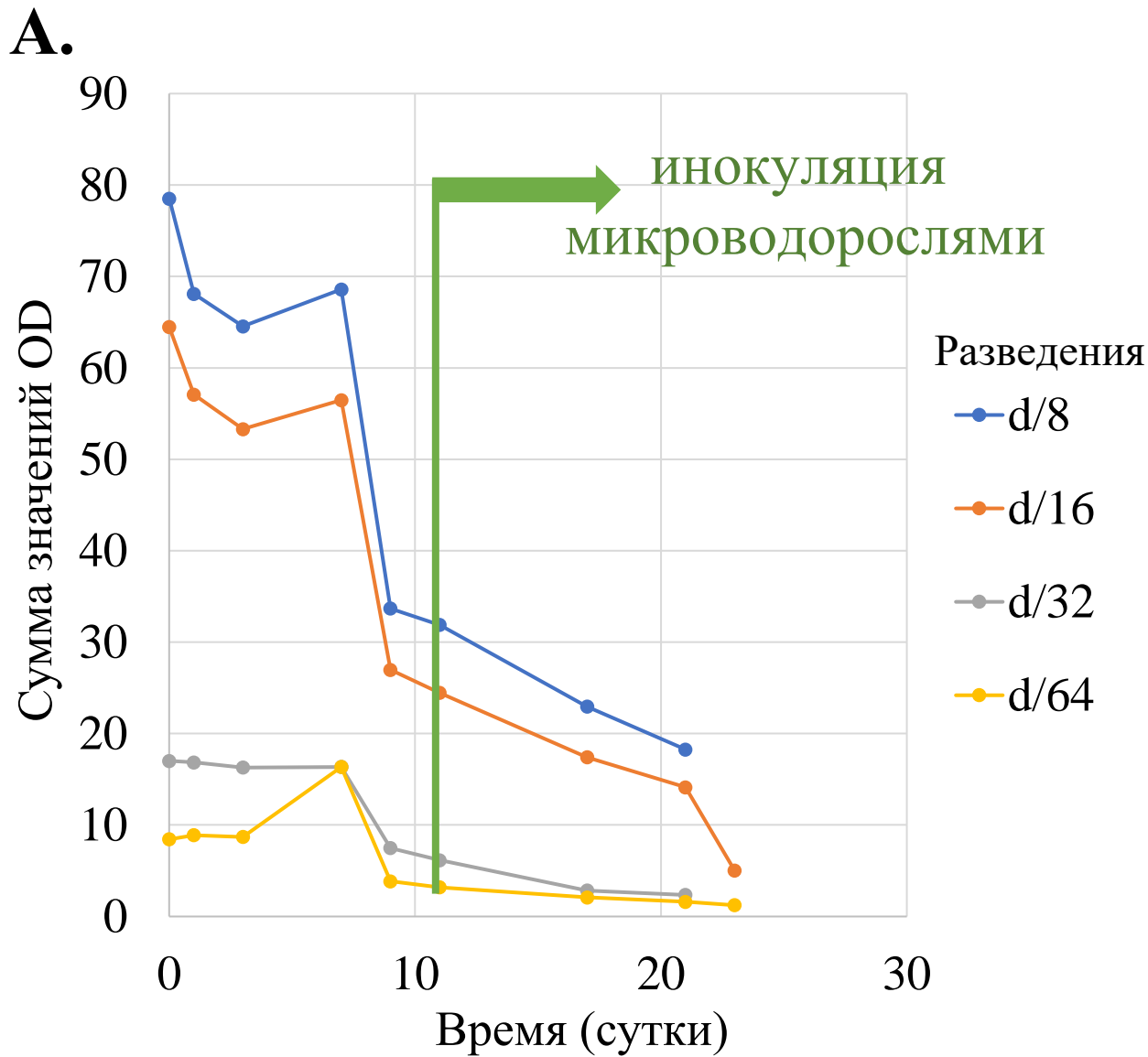
Идентификация сопутствующей микрофлоры

Метабаркодинг 16S рРНК (V4, NGS)

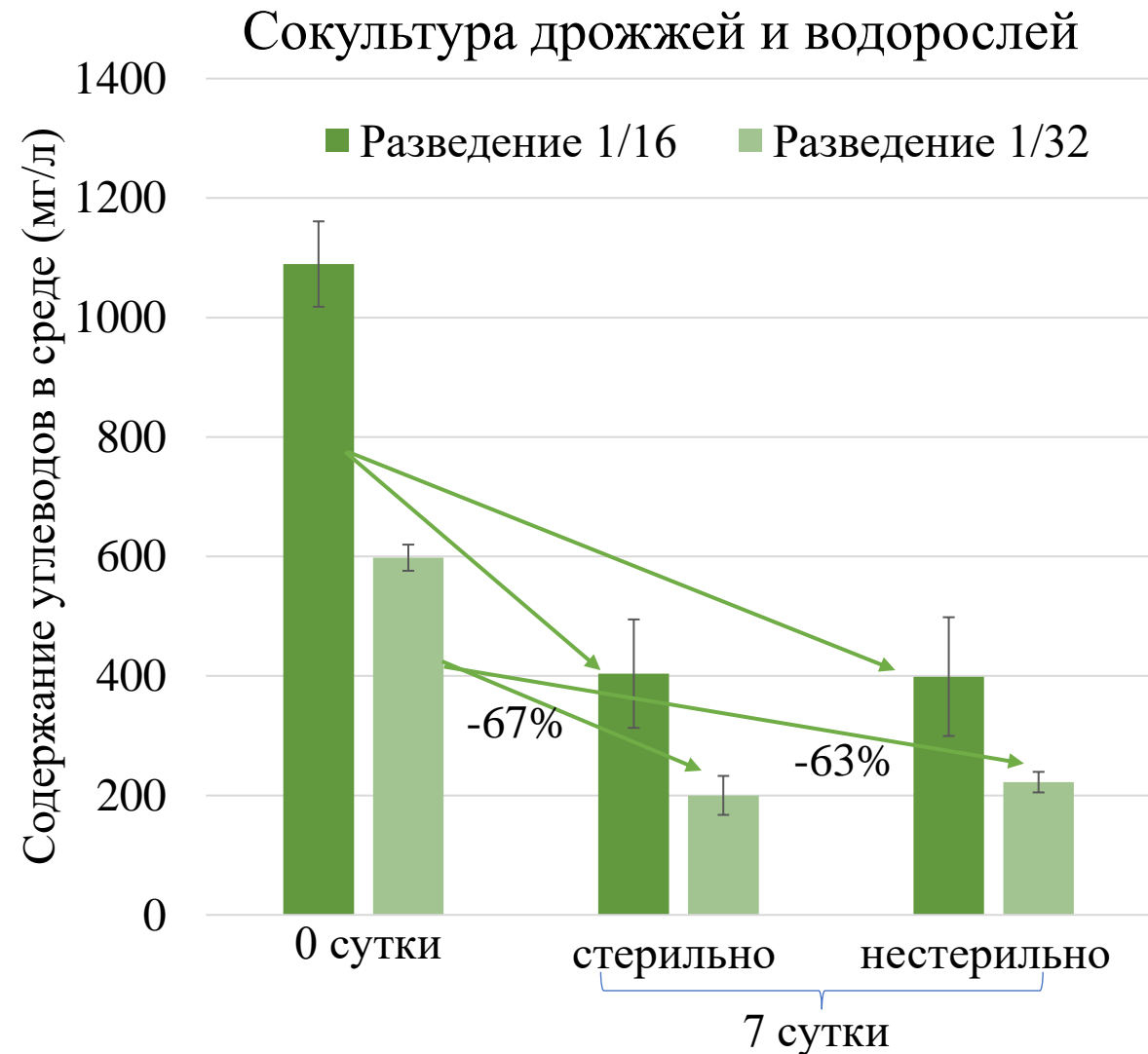
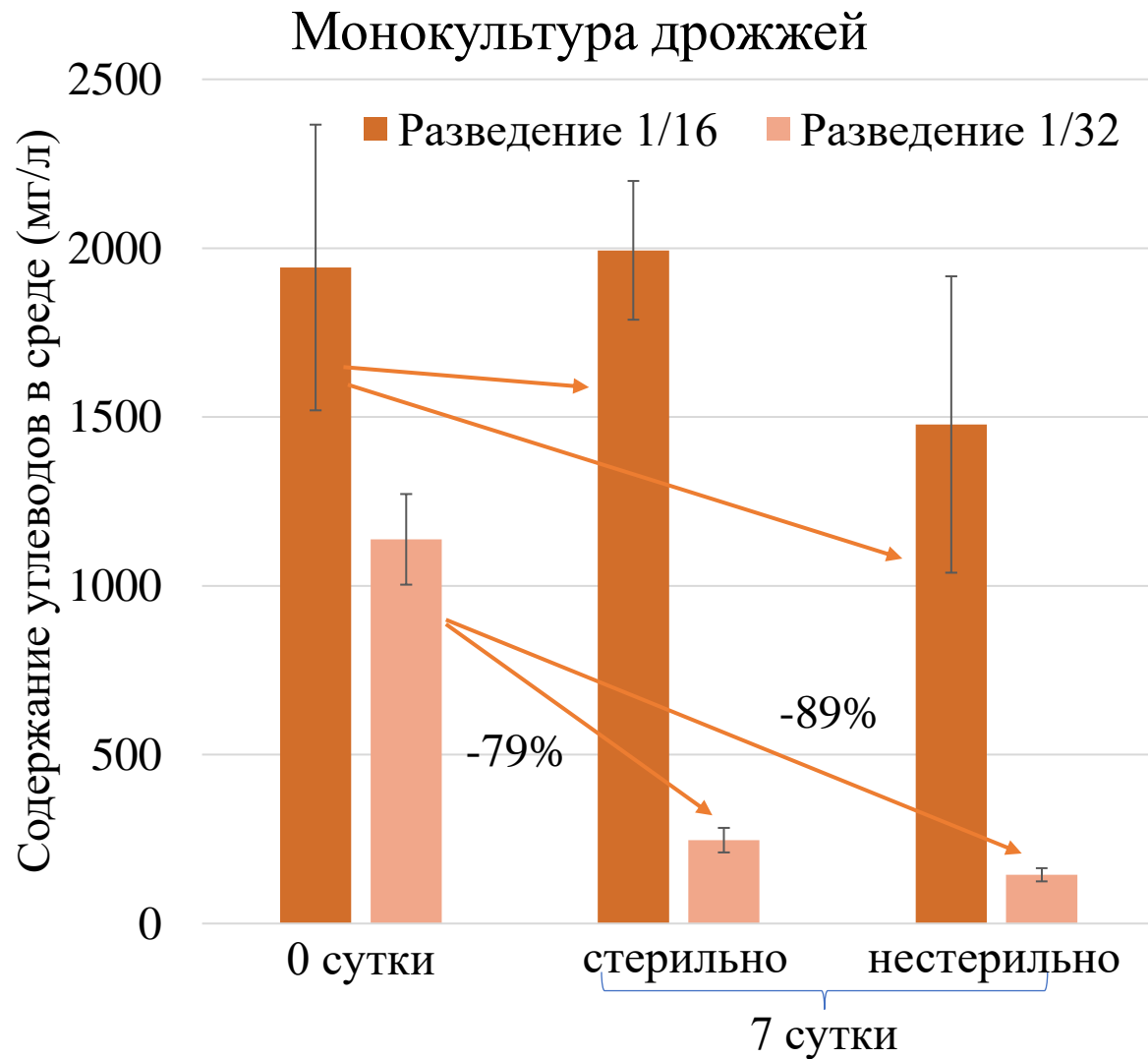
Оценка продуктивности по биомассе (производство белка)

Биуретовый метод

Подбор оптимального разведения мелассы (А) и плотности инокулята (В)

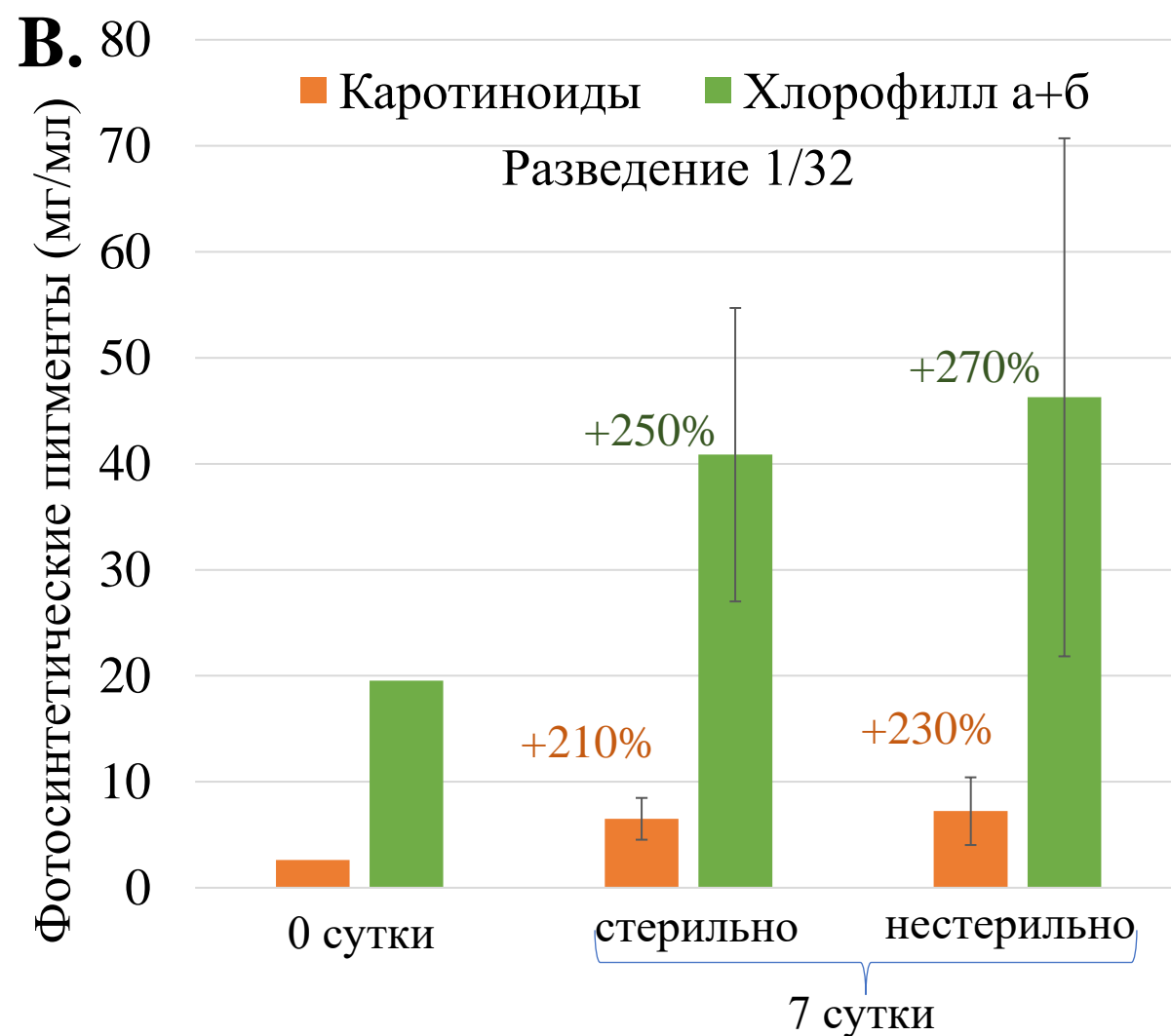
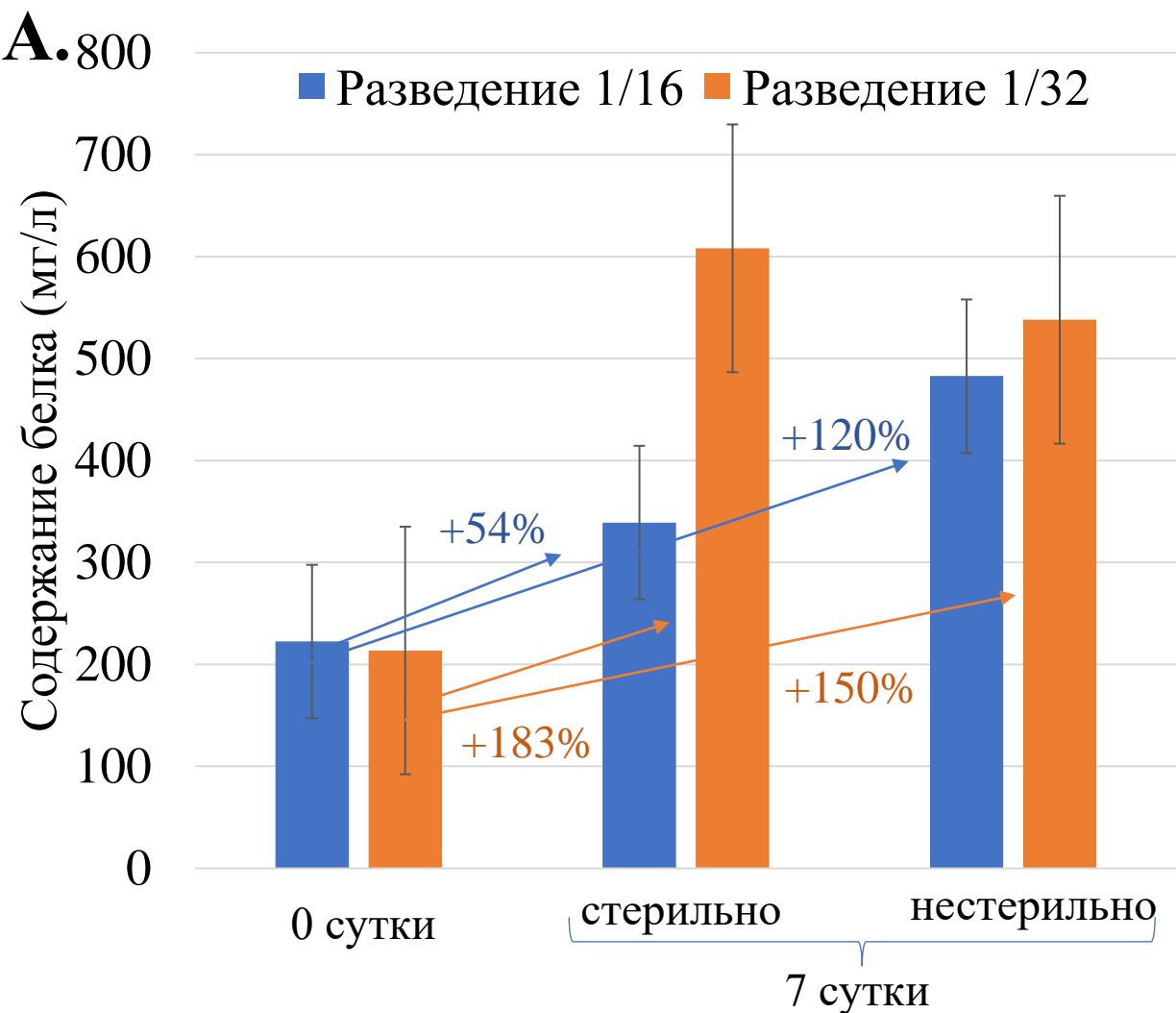


Оценка способности биоизъятия углеводов



При сокультивировании дрожжей и водорослей условия выращивания не влияют на биоизъятие углеводов, результат примерно одинаковый. При инкубировании монокультуры дрожжей разница между стерильным и нестерильным культивированием составляет 10% в пользу нестерильного варианта.

Оценка способности сокультуры к накоплению белка (А) и фотосинтетических пигментов у *Desmodesmus* sp. (В)

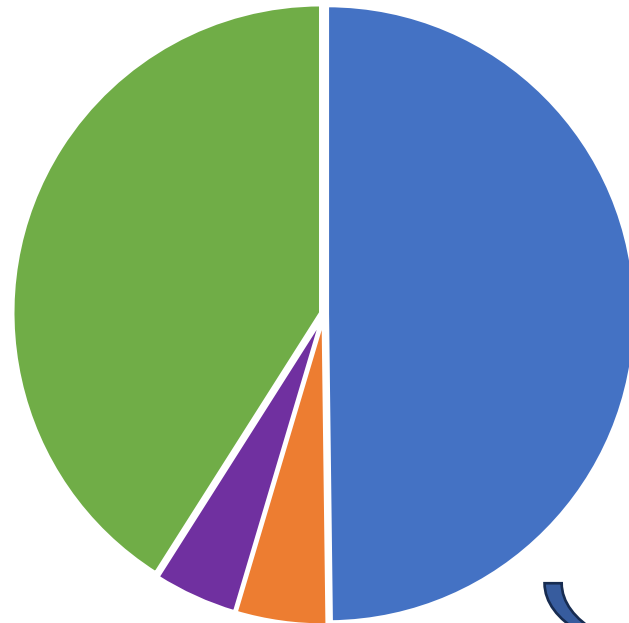


Водоросли вносят значительный вклад в производство белка.
 Нестерильные условия не влияют на состояние водорослей.

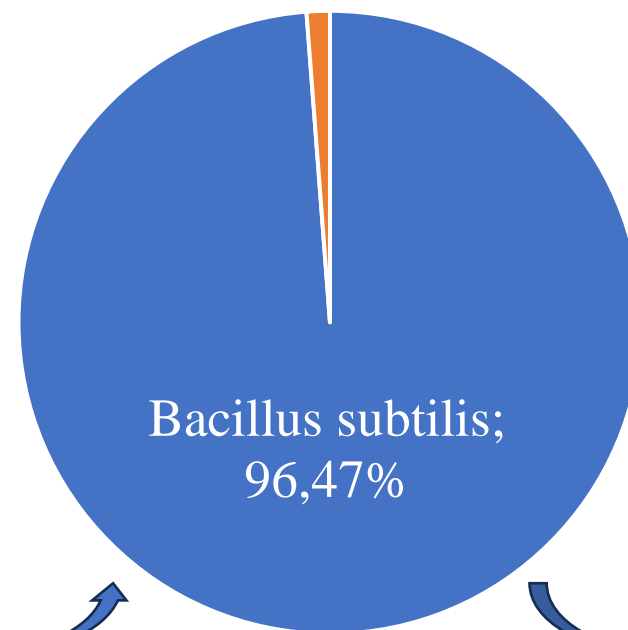
Результаты метабаркодинга по 16sРНК V4, NGS (Illumina)

Монокультура дрожжей

- *Bacillus subtilis*
- *Tsukamurella tyrosinosolvens*
- *Enterococcus faecium*
- Unclassified

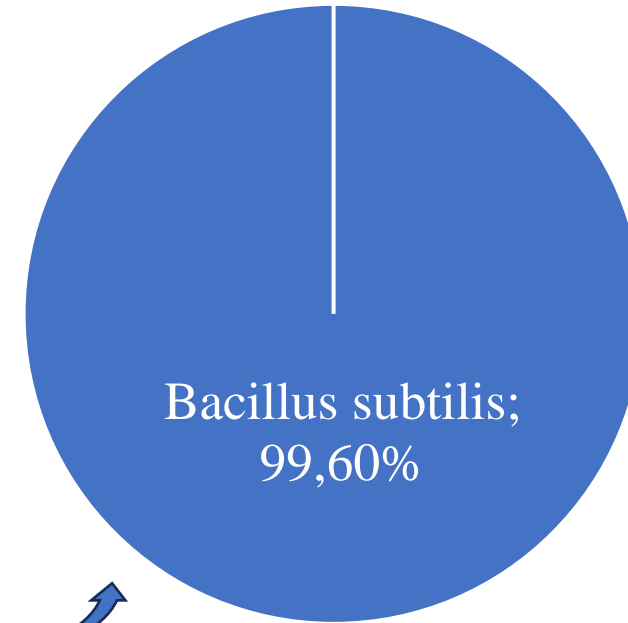


0 сутки



+меласса

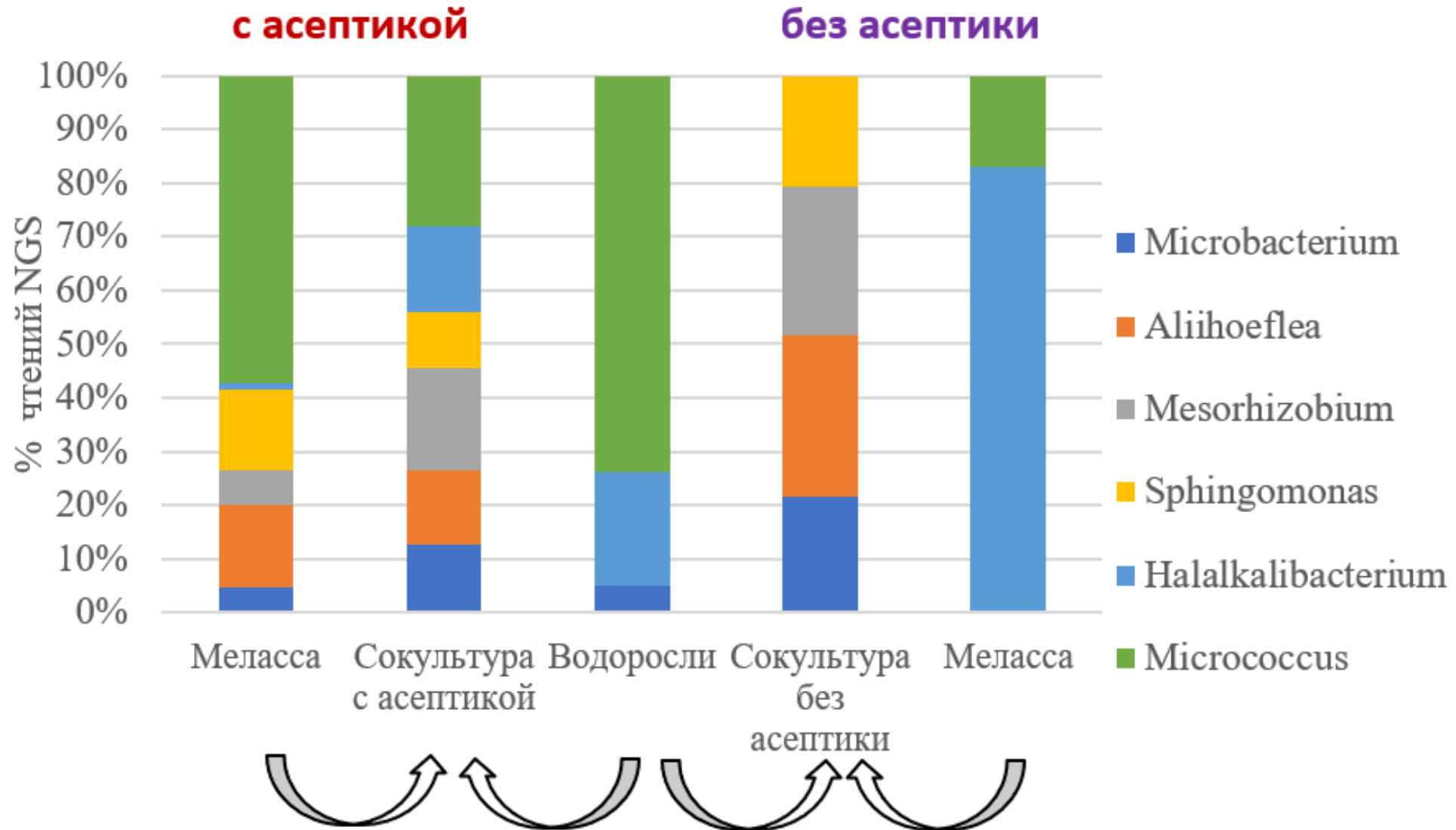
7 сутки



Через 7 суток

В составе сообщества не замечены патогенные бактерии.

Результаты метабаркодирования по 16sРНК



Выводы

- Впервые установлено, что штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ΔBGL2 по ростовым характеристикам на мелассе в разведении 1/32 и 1/16 не уступал дикому типу (wt). Оптимальная для засева мелассы плотность инокулята *Saccharomyces cerevisiae* ΔBGL2 составила 2×10^8 клеток/мл.
- При разведении в соотношении 1/16 меласса ингибировала рост монокультур дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ΔBGL2 и микроводорослей *Desmodesmus* sp., а также рост их сокультуры. Оптимальное разведение мелассы, необходимое для выращивания монокультур и сокультуры, составило 1/32.
- Показана принципиальная возможность выращивания сокультур дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ΔBGL2 и микроводорослей *Desmodesmus* sp. на мелассе в разведении 1/32 без соблюдения условий асептики. Максимальное накопление белка (380-400 мг/л) сокультурами зарегистрировано в нестерильных условиях. Микроводоросли *Desmodesmus* sp. вносили значительный вклад в накопление белка сокультурой.

Выводы

- Сокультуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ΔBGL2 и микроводорослей *Desmodesmus* sp. снижали содержание углеводов в мелассе на 67% (при культивировании с асептикой) либо на 63% (без асептики), что в среднем на 20% выше, чем при выращивании монокультур.
- Микроводоросль *Desmodesmus* sp. IPPAS S-2014 демонстрировала интенсивный рост в сокультуре с дрожжами: содержание хлорофиллов в сокультуре увеличивалось в 2.1-2.4 раза, каротиноидов – в 3.0–3.4 раза.
- Бактерии *Bacillus subtilis* доминировали (на 96–99%) в монокультурах дрожжей, но не выявлялись в сокультурах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ΔBGL2 и микроводорослей *Desmodesmus* sp., где доминировали бактерии родов *Aliihoeflea*, *Mesorhizobium*, *Sphingomonas* и *Micrococcus*. В зависимости от условий септики/асептики бактериальные сообщества складываются разные. *Aliihoeflea* sp. возможно обеспечивает баланс сокультуры, так как выявляется в ней независимо от условий культивирования. При культивировании в данных условиях (и стерильных и нестерильных) патогенных бактерий выявлено не было.

Спасибо за внимание!

Выражаю большую благодарность

Алексею Евгеньевичу Соловченко и Александру Андреевичу Лукьянову за помощь с экспериментами и консультации по всем научным вопросам

Татьяне Александровне Федоренко и Петру Андреевичу Зайцеву за огромную помощь по проведению экспериментов

Татьяне Сергеевне Калечиной за предоставление материала и консультации по объекту исследования

Елене Сергеевне Лобаковой за идею работы и консультации по научным вопросам

Алине Витальевне Александровой за рецензию на обзор литературы