

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой



Т.Г. Волова

подпись

инициалы, фамилия

« ____ » _____ 20 __ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Синтез полигидроксиалканоатов на различных сахарах в качестве
единственного источника углерода, исследование методов выделения
биополимера из биомассы бактерий

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель _____

доцент, к.т.н. Е.Г. Киселев

Выпускник



О. Д. Петровская

Рецензент



доцент, к.т.н. Н.Ю. Демиденко

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Синтез полигидроксиалканоатов на различных сахарах в качестве единственного источника углерода, исследование методов выделения биополимера из биомассы бактерий» содержит 66 страниц текстового документа, 15 иллюстрации, 6 таблиц, 98 использованных источника.

Ключевые слова: экстракция, полигидроксиалканоаты, полимер, биомасса бактерий, детергенты, *Cupriavidus necator B-10646*, культивирование.

Цель работы: Снизить себестоимость производства ПГА за счет удешевления углеродного субстрата и уменьшения затрат на процесс экстракции

Задачи:

1. Исследовать процесс культивирования бактерий *Cupriavidus necator B-10646* на различных углеродных субстратах. Определить целесообразность использования мелассы в качестве недорогого углеродного субстрата.

2. Исследовать методы экстракции ПГА из биомассы бактерий *Cupriavidus necator B-10646*. Определить эффективность использования гипохлорита натрия в процессе экстракции.

3. Предложить схему экстракции биомассы для снижения затрат растворителей и получения ПГА с наименьшим содержанием примесей.

Производство полигидроксиалканоатов (ПГА) является дорогостоящим по сравнению с продукцией синтетических и нефтехимических полимеров. Несмотря на то что технология культивирования и процесс экстракции ПГА с каждым годом совершенствуется, в промышленном масштабе ПГА пока не может соревноваться с синтетическими пластиками. С каждым годом все большее значение приобретают продукты микробиологического синтеза (биополимеры). В тоже время объём выпуска синтетических и

нефтехимических полимеров увеличивается, не смотря на их аккумуляцию в окружающей среде.

Решающим для расширения масштабов производства и сфер применения биополимеров, в частности полигидроксиалканоатов (ПГА), является снижение их себестоимости. Использование дешевых углеродных субстратов для биосинтеза и реагентов для процесса экстракции поможет снизить стоимость производства ПГА.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 Обзор литературы	8
1.1 Полигидроксиалканоаты: структура и свойства	8
1.2 Источники углерода для синтеза ПГА	11
1.3 Методы экстракции ПГА	18
1.3.2 Энзиматическая экстракция	22
1.3.3 Экстракция поверхностно-активными веществами	23
1.3.4 Применение сверхкритических флюидов	25
1.3.5 Применение гидроксида натрия и гидроксида калия	26
1.3.6 Физические методы экстракции	26
2.2 Экстракция ПГА с первичной обработкой гипохлорита натрия	33
2.2.1 Свойства гипохлорита натрия	33
2.2.2 Экстракция ПГА из биомассы бактерий	34
2.2.3 Исследование чистоты полимера	35
2.2.4 Исследование молекулярно-массовых характеристики образцов полимера	36
3 Результаты исследования	36
3.1 Культивирование бактерий на различных субстратах	36
3.2 Экстракция ПГА с первичной обработкой биомассы гипохлоритом натрия	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.1 Результаты выхода полимера	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.2 Характеристики ПГА	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.3 Сравнительная характеристика методов экстракции	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	38

ВВЕДЕНИЕ

Полимеры, сделанные из ископаемого горючего и природный газа используются изо дня в день. Они легки, долговечны, недороги, из них легко изготавливаются различные изделия, имеют продолжительный срок службы, который сделал их настолько популярными. Когда ископаемые ресурсы будут в конечном итоге истощены, необходимо разработать альтернативные процессы для производства будущих пластмасс. Климатические изменения и другие экологические проблемы также предупреждают нас о необходимости разработать более устойчивые способы производства пластмассы [1].

Полимерные материалы все чаще используются во многих отечественных и промышленных целях. Их использование тесно связано с повышением качества жизни людей. Мировое производство пластиковых материалов достигла 299 миллионов тонн в 2013 году, где 98% от общего объема производства [2]. Более того, глобальное производство пластмасс представляет растущую тенденцию с увеличением на 4% в производстве пластиковых материалов в 2016 году [3]. Даже с политикой утилизации и осведомленности, ситуация показывает благоприятный сценарий поиска альтернативных технологий, независимо от нефтяных пластмасс, которая может удовлетворить потенциальный спрос пластиковых материалов [4]. Поиск новых материалов для замены ископаемых видов топлива на основе пластмасс сосредоточены на биополимерах с похожими физико-химическими свойствами. Биополимеры представляют собой пластмассовые материалы, которые могут быть получены из возобновляемых источников или отходов, позволяющие уменьшить расход топлива [5]. Кроме того, биополимеры могут уменьшить воздействие на окружающую среду, возникающее в результате утилизации пластиковых отходов в связи с тем, что время биodeградации биополимеров на поверхности земли под влиянием стандартных условий

составляют примерно два месяца [6].

Экологическим проблемам развития человеческого общества в настоящее время уделяется большое внимание такими организациями, как ООН, ЮНЕСКО, Российским обществом защиты прав потребителя и др. Одной из важнейших экологических проблем является утилизация твердых синтетических полимерных отходов, которые считаются наиболее токсичными, а, следовательно, экологически опасными. Синтетические пластмассовые отходы чрезвычайно медленно разлагаются и ассимилируются в естественных условиях (до 80 лет), являясь серьезным фактором загрязнения окружающей среды. Особую опасность представляет пластмассовая тара разового использования, сельскохозяйственные пленки различного назначения и упаковочные материалы, которые обычно не попадают в общую систему сбора, составляя так называемый пластмассовый мусор [7].

К таким производствам полимеров относятся биопластики, синтезируемые бактериями, которые являются экологически чистыми пластиками, биоразлагаемые и не несущие особую опасность при их использовании. Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода. *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha*) считают одним из наиболее исследуемых видов бактерий среди ПГА-продуцирующих микроорганизмов[8].

Масштабы использования полигидроксиалканоатов в настоящее время тормозится достаточно большой стоимостью (практически на порядок более высокой по сравнению с полиолефинами). Однако усиливающиеся требования к охране окружающей среды и имеющиеся перспективы снижения стоимости биополимеров за счет увеличения эффективности

производства делают ПГА, как одним из перспективных материалов XXI века[9].

Производство полигидроксиалканоатов в будущем сыграет огромную роль в развитии медицины (использование биополимера в качестве биорезорбируемого материала для создания транспортной системы доставки лекарств), сельского хозяйства в качестве депонированной формы удобрений, пестицидов, гербицидов в виде гранулированных, прессованных и пленочных форм. Также, его использование в промышленных предприятиях позволит создавать биodeградируемый упаковочный материал, одноразовую посуду и прочие полимерные изделия, не создающие угрозу экологии и разрушающиеся в природных условиях [10].

При выборе метода выделения ПГА из биомассы необходимо учитывать стоимость реагентов, количество образующихся отходов, эффективность извлечения полимера, степень его чистоты [11]. Также учитывая, что до 30% от себестоимости ПГА приходится на стоимость углеродного субстрата, и для решения данной проблемы необходимо выявить более подходящие источники углерода для синтеза ПГА пригодного для его дальнейшего использования в медицине.

1 Обзор литературы

1.1 Полигидроксиалканоаты: структура и свойства

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются перспективными полиэфирами, вырабатываемые бактериями посредством аэробной ферментации различных источников углерода [12]. Одним из ключевых членов этого класса, поли-3-гидроксибутират, впервые был обнаружен в бактериальных клетках Lemoigne в 1925 году [13].

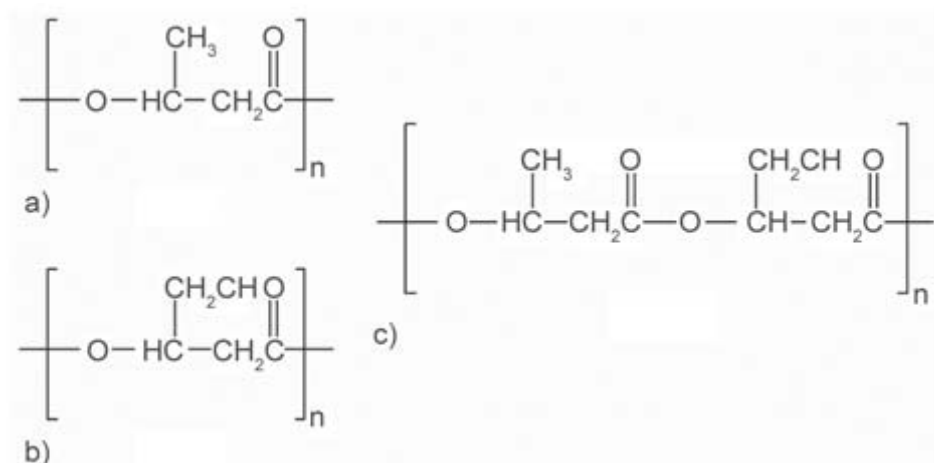


Рисунок 1- Структурные формулы некоторых полигидроксиалканоатов, а) ПЗГБ, б)ПГВ, в)ПГБВ[6].

У бактерий полимер накапливается при избытке источника углерода в сочетании с лишением питательных веществ, таких как азот. Все обменные источники углерода могут быть использованы для производства ПГА, в том числе жирные кислоты и углеводы. ПГА накапливаются в качестве внутриклеточных включений в бактерии родов *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Necator*, *Rhodobacter*, *Ralstonia* и *Cupriavidus* [14][15].

В бактерии, синтез полигидроксиалканоатов из сахаров, как правило, начинается с гликолиза и образованием пирувата. Последний преобразуется в ацетил-КоА по пути окисления пируватдегидрогеназы (PDH). Затем две

молекулы ацетил-КоА конденсируются и образуют ацетоацетил-Коа под действием фермента б-кетотиолазы. Ацетоацетил-Коа под действием ацетоацетил-КоА-редуктазы (ФАБ) превращается в (Р)-3-гидроксил-Коа, строительный блок ПГА. Фермент ПГА синтаза (phaC) окончательно полимеризует мономеры в ПГА [16].

Кроме того, из-за различных типов мономеров (около 150 различных конструкций), возможно изготовление сополимеров ПГА, имеющие широкий спектр свойств. Различные ПГА мономеры могут быть классифицированы на основе числа атомов углерода:

- короткоцепочечные (shortchainlength, HA_{SCL}) – имеют в своем составе 3-5 атомов углерода;

 - К ним относятся поли-(3-гидроксibuтират) и поли-(3-гидроксивалерат).

- среднецепочечные (mediumchainlength, HA_{MCL}) – содержат от 6 до 14 углеродных атомов;

 - К среднецепочечным относятся 3-гидроксигексонат, 3-октанат ,3-гидроксидеканат.

- длинноцепочечные (longchainlength, HA_{LCL}) – цепи состоят из 17-18 атомов углерода [17].

Полигидроксиалканоаты как высокомолекулярные соединения характеризуются комплексом физико-химических и механических свойств, обусловленных высокой молекулярной массой полимеров, цепным строением и гибкостью макромолекул, главные из которых это:

- способность образовывать высокопрочные высокоориентированные волокна и пленки;

 - способность к большим длительно развивающимся деформациям;

 - способность к набуханию и растворению [18];

- биосовместимость и, следовательно, подходит для медицинских целей;

 - растворим в хлороформе и других хлорированных углеводородах;

-тонет в воде, что облегчает его анаэробной биодegradации в отложениях;

-нетоксичен [19].

ПГА являются перспективной альтернативой нефтехимическим полимерам в качестве быстроразлагаемых изделий, применяемых в сельском хозяйстве и здравоохранении в виде одноразовых упаковок, нитей и шовных материалов [20].

Высокая себестоимость производства биопластика, включая выделение полимера и очистку биомассы от липидов после ферментации, является основным препятствием для их широкого признания на рынке. В зависимости от вида, источника углерода, питательных веществ и условий культивирования, средняя молекулярная масса ПГА лежит в диапазоне от 1000 до 2000 кД. Содержание полимера находится в пределах от 20 до 80% от сухой массы клетки. В гидрофобных включениях, взвешенных в клеточной цитоплазме, которые аморфны в своем большинстве, содержится около 5-10% воды от массы клетки. Каждая гранула ПГА окружена мембраной фосфолипидного слоя, которая содержит в себе белки, ПГА-синтазы и деполимеразы. Мембрана также содержит другие белки (фазины), которые предположительно участвуют в стабилизации аморфных гранул. Хотя высушенный “пластик” клеточной массы с высоким содержанием ПГА может быть непосредственно использован для формовки материалов, только очищенные ПГА полимеры имеют необходимый комплекс механических свойств для применения в различных областях. Компромисс между чистотой ПГА, выходом полимера и размером молекул производится путем регулирования дозы реагентов, времени реакции и условий обработки. Анионные поверхностно-активные вещества, такие как додецилсульфат натрия в какой-то степени может помочь в разложении клеточной биомассы без полимера [20]. ПАВ не может дать высокую чистоту ПГА (>97%), поэтому также вместе с ним необходимо использовать и другие реагенты, такие как гипохлорит и гидроксид натрия. Кроме того, большая концентрация (5% от

массы ПГА) ПАВ часто используется для достижения высокой степени очистки полимера (>95%), которая не только повышает стоимость работ по выделению, но и вызывает проблемы в очистке сточных вод и повторного использования [21].

1.2 Источники углерода для синтеза ПГА

Одной из основных причин низкого производства полигидроксиалканоатов (ПГА) являются высокие производственные затраты. Поэтому выбор источника углерода является одним из ключевых факторов определяющий его экономическую целесообразность при крупносерийном производстве.

Цена источника углерода составляет до 80% от общей себестоимости синтеза ПГА. Углеродные источники, такие как глюкоза и фруктоза, а также жирные кислоты уже давно успешно используются для синтеза ПГА различными бактериальными штаммами [22],[23],[24],[25]. Основными дорогостоящими субстратами для синтеза ПГА являются простые и чистые от примесей сахара, такие как глюкоза и фруктоза, сахароза и другие сахара [26]. Используя глюкозу в качестве единственного источника углерода *Bacillus cereus* FA11 способен накапливать ПГА в клетках до 80,58% [25]. Используя фруктозу в качестве углеродного субстрата для культивирования *C. necator* H16 способен накапливать ПГА до 76% в клетке [27]. При использовании глюкозы и фруктозы в одинаковых концентрациях, после начала 2й фазы производства наблюдается более выраженное потребление глюкозы по сравнению с фруктозой. Согласно работе *Grousseau C. necator* DSM 545 превращение субстрата в клетке происходит благодаря пути Энтера-Дудорова. На этом метаболическом пути, D-фруктоза превращается в глюкозо-6-фосфат перед его превращением в пируват, который оправдал бы разницу в потреблении глюкозы и фруктозы. В обоих случаях, предпочтение глюкозы на этапе производства практически истощается в конце

культивирования, в то время как значительные количества фруктозы (около 10 г/л^{-1}) остается в среде [28]. Через протеомный и транскриптомный анализ подтверждено, что ферменты в биосинтезе ПГА были значительно повышены у *C. necator*, когда глюкоза использовалась в качестве субстрата в сравнение с фруктозой [29].

Моно- и полиароматические углеводороды также выбраны в качестве источников углерода для синтеза поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ) с использованием штамма бактерии *Vacillus sp. CYR1*. Штамм CYR1 показал рост на органических соединений с различной токсичностью. Штамм CYR1 показал наибольшую продукцию ПГБ с фенолом ($51 \pm 5\%$), нафталином ($42 \pm 4\%$), 4-хлорфенолом ($32 \pm 3\%$) и 4-нонилфенолом ($29 \pm 3\%$) с концентрациями биомассы до $1,5 \text{ г/л}$ [30].

В качестве источника углерода для культивирования ПГА - продуцентов широко используются органические кислоты и спирты. Специально разработанная стратегия культивирования с использованием INFORS HT Multifors bioreactor system с подпиткой необходима для снижения токсического воздействия органических кислот в культурах *R. eutropha*. Техника pH-stat с использованием органических кислот ацетата, пропионата и бутирата в качестве основных источников углерода, принята в сочетании с дополнительной pO_2 -зависимой подачей для доставки кислой соли. Разработанная стратегия показывает высокую производительность более $2 \text{ г ПГА} / \text{л} / \text{ч}$. После 44 ч ферментации сухой вес клеток составлял $112,4 \pm 2,3 \text{ г} / \text{л}$ (CDW) с $83,3 \pm 1,1\% \text{ P (HV-co-HV)} / \text{CDW}$ содержащие $5,6 \pm 0,4 \text{ мол.}\%$ 3-гидроксивалерата (3HV) [31].

Множество работ посвящено использованию глицерина для синтеза ПГА ([32], [33],[34]). При использовании глицерина для культивирования штамм *Salinivibrio sp.* способен накапливать ПГА в клетках до 60% , урожай биомассы составлял $69,1 \text{ г} / \text{л}$ после 78 ч периодического культивирования.

Также получение ПГА возможно при культивировании метанотрофов. Выход ПГА составляет от $20\text{-}70\%$ в зависимости от выбранного штамма. В

основном используются гибридные штаммы родов *Methlocystis*, *Methylosinus* и *Methylobacterium* [35].

Использование в качестве углеродного субстрата пищевых отходов, отходов пищевой промышленности и муниципальных отходов помогает решить экономическую проблему производства ПГА. В настоящее время большое внимание исследователей привлекает использование гидролизированных отходов пищевой и сельскохозяйственной промышленности. Существующая целлюлозно-бумажная инфраструктура позволяет производить альтернативные поставки сахара в виде гидролизатов древесины. Культивирование *Paraburkholderia sacchari* IPT 101 с использованием гидролизата твердой древесины голоцеллюлозы позволяет достичь содержание ПГА в клетках до 75 % [36]. Рекомбинантная бактерия *Ralstonia eutropha* способна расти на гидролизатах стебля подсолнечника, накапливая до 72% ПГА в клетках [37]. Различные лигниноцеллюлозные гидролизаты (биомассы ячменя, мискантуса, сосны), оценены как потенциальные источники углерода для культивирования бактерий *Ralstonia eutropha* 5119, способные накапливать в клетках до 63% ПГА [38]. Агроотходы, такие как фруктовая кожура и жмых злаковых растений, являются для бактерий *Halomonas campisalis* МСМ В-1027 перспективным углеродным субстратом для синтеза ПГА, с содержанием его в клетках бактерий до 50% [39]. Также выявлена способность *Bacillus cereus suaeda* В-001 накапливать ПГБ до 56% с использованием гидролизата пустой плодовой связки масличной пальмы (ОРЕФВ) [40]. Использование гидролизатов пшеничной соломы [41], рисовой соломы [42] и рисовой шелухи [43] для культивирования бактерий *Cupriavidus necator* и *Ralstonia eutropha* в качестве источников углерода для синтеза ПГА позволяет получить от 30 до 60 % его содержание в клетках.

Сточные воды пивоваренного завода содержат мальтозу, которая может использоваться в качестве легкодоступного дешевого и эффективного источника углерода для бактерий, продуцирующих биополимер [44].

Мальтоза содержится в прорастающих семенах ячменя, образовываясь когда ферменты амилазы расщепляют крахмал с эффективностью до 80%. Промышленная мальтоза подвергается гидролизу в процессе ферментации из-за снижения pH культуральной среды и в конечном итоге превращается в глюкозу, которая потребляется бактерией. Таким образом, это исследование направлено на использование сточных вод из пивоваренного завода (Behnoush) в Иране для производства ПГБ используя штамм *S. necator* и обеспечивая оптимальные условия для максимизации производства ПГБ путем манипулирования условиями роста и источника углерода [45]. При использовании мальтозы с концентрацией 40 г/л максимальная концентрация биомассы составила 2,7 г/л а максимальное содержание ПГА 1,2 г/л (44%). При использовании данного субстрата авторы отмечают задержку роста до 45 часов, концентрация биомассы оставалась неизменной и не превышала 0,5 г/л.

Арабиноза, как субстрат для синтеза ПГА мало изучена. В основном арабиноза вместе с глюкозой и ксилозой входит в состав субстратов для культивирования ПГА-продуцентов, к ним относятся гидролизаты гемицеллюлозных фракций древесины [46], гидролизаты растений, обогащенные маннитом [47], гидролизаты рисовой шелухи [48].

В литературе так же отмечается низкое содержание ПГА при культивировании ПГА-продуцентов на арабинозе в качестве единственного источника углерода. В работе Li, M. (2019) [46] автор отмечает, что для синтеза ПГА на арабинозе необходимо поддерживать высокое соотношение C:N равное 75, для продукции 3,81 г/л ПГА необходимо 25,5 г/л арабинозы для культуры *B. sacchari* DSM 17165. В другом исследовании Dietrich D. (2013) [36] бактерии *P. pseudoflava* и *B. ceracia* способны накапливать 25 % и 33% ПГА и достигают максимальной концентрации биомассы бактерий 2 и 3 г/л соответственно при культивировании на арабинозе.

Однако данные альтернативные источники углерода зачастую не доступны в достаточном количестве и требует интенсивной предварительной

обработки. Такие требования к обработке не так приемлемы для тростниковой и свекловичной мелассы, в виду того что ее можно обеспечить в больших количествах [49]. Также методы для гидролиза дисахаров мелассы просты и доступны [50]. За последние годы большинство работ сосредоточено на использовании мелассы как недорогого субстрата для синтеза ПГА бактериями. Большое распространение мелассы, как субстрата для культивирования, произошло в связи с изменением квот на производство сахара. Европейский Союз является крупнейшим в мире производителем свекловичного сахара, годовой объем производства составляет около 17 млн. тонн. Однако свекловичный сахар составляет лишь 20% мирового производства сахара, в то время как остальные 80% производятся из сахарного тростника. На 30 сентября 2017 года была прекращена европейская система квот на производство сахара. Как следствие упала цена на сахар из-за перепроизводства. [51]. Меласса, остаток кристаллизации сахара при переработке тростника, имеет высокую концентрацию сбраживаемого углерода, широко используемая в биотехнологических процессах, как субстрат роста бактерий и синтеза ПГА [52]. Первые работы по данной тематике датируются 2001 годом, культивируя природный штамм бактерий *Bacillus megaterium* на 3% мелассе, удалось достичь содержания полимера до 46% в клетке [53]. Существуют методы культивирования бактерий ПГА-продуцентов, как на чистой мелассе так и на гидролизованной. Бактерия *Ralstonia eutropha* не имеет ферментов сахарозы, которые способны гидролизовать сахарозу и другие дисахара, содержащиеся в мелассе, поэтому предварительная обработка мелассы необходима для гидролиза сахарозы до ее мономеров [54]. В проделанных работах с мелассой сообщается, что гидролиз сахарозы может быть проведен с использованием химических (кислота, щелочь) или ферментных (сахароза, инвертаза) реагентов [55]. В данной работе сообщили, что гидролиз сахарозы катализируемый кислотой имеет преимущества для снижения себестоимости продукции в отличие от использования фермента. Тем не менее минус данного метода гидролиза это

загрязнение окружающей среды, связанное с выделением токсичным побочным продуктом, таким как гидроксиметилфурфурол (НМФ) образование которого должно быть учтено при проведении кислотно-катализируемого гидролиза сахарозы [55]. Микроволновое нагревание и гидротермальная предварительная обработка применялись в помощь кислотному гидролизу сахарозы. Микроволновый нагрев выделяют как быструю форму диэлектрического нагрева, при которой тепло генерируется в полярной молекуле во время воздействия высокочастотного электрического поля. Процесс теплообмена, при микроволновом нагреве включает, в себя энергетическое взаимодействие на молекулярном уровне. Кроме того, микроволновое нагревание уменьшает энергию активации и ускоряет скорость химических реакций и физико-химические процессы, которые, в свою очередь, дают более высокие урожаи биомассы и снижают образование токсичных побочных продуктов [50]. По этим причинам использование микроволновой печи для предварительной обработки привлекла большое внимание в последние годы [56]. Большим преимуществом ферментативных методов является использование зеленых катализаторов и мягкие условия гидролиза. Тем не менее, возможным недостатком инвертазного метода является цена фермента [57]. Гидротермальная (термическая) предварительная обработка дает преимущества не только для снижения образование побочных продуктов-ингибиторов, но также для сокращения использования химических веществ [50]. Гидролизированный сахар, полученный из гидротермальных предварительно обработанных остатков кожуры картофеля (PPR) ($57,8 \pm 2,1$), в 3,12 раза выше, чем PPR без предварительной обработки ($18,5 \pm 0,5$) [58]. При контрольном культивировании (с использованием смеси глюкозы и фруктоза), что соответствует значению количества мелассы, обработанной ферментом, скорость роста равняется $0,19 \text{ ч}^{-1}$, что указывает на отсутствие ингибирующих эффектов. Присутствие небольших количеств азота в мелассе, при условии ограниченного роста клеток, способствует накоплению ПГБ до

56% [57]. После гидролиза мелассы доступных компонентов углеродного сырья стало больше и вследствие чего стало причиной большего накопления полимера и биомассы по сравнению с негидролизованной мелассой. После гидролиза каждая молекула сахарозы даст эквивалент одного молекула глюкозы и молекула фруктозы. Основываясь на предыдущих исследованиях, гидролиз сахарозы может быть выполнен с помощью кислоты, щелочи, инвертазы, докритической воды и катионообменной смолы [59].

В работе M.G.E.Albuquerque (2010) продемонстрирована возможность использования мелассы для двухстадийного процесса ферментации в периодических реакторах с использованием смешанной культуры, где содержание ПГА в клетках бактерий достигла 61 % [60]. Используется также ферментированная меласса в аэробных условиях культивирования, помимо мономеров, эта культура также продуцировала до 23 мол.% среднецепочечные мономеры 3-гидроксигексаноата, общее содержание ПГА составило 31% при культивировании бактерий в периодическом реакторе [61]. При использовании обработанной мелассы (серной кислотой, трикальцийфосфатом) наблюдается наибольший урожай биомассы сухих клеток 10,98 г/л и содержание ПГА 54% при 96-часовом культивировании в среде с использованием 6 и 8% мелассы для *B. subtilis* и *E. coli* [62]. Известно исследование, где разработан трехстадийный процесс ферментации в периодическом ферментере в рабочем объеме 1 литр используемый для получения полигидроксиалканоатов (ПГА) из патоки сахарного тростника. Выход полимера (с ферментированной мелассой, полученной при pH 5) составил 0,22 г ПГА / г мелассы, объемная производительность - 0,43 г ПГА / л час [63]. На данный момент уже оптимизированно производство биополимеров с использованием данного субстрата, после оптимизации производства накопление ПГА достигло до 80%, данная производительность наблюдалось в средах с 3% мелассой с использованием рекомбинантного штамма *Enterobacter sp. SEL2* [64]. В работе Albuquerque M. (2007) наблюдал продукцию P (3HV-со-3HV) 30,0% (вес / вес) с самой высокой

концентрацией клеток 3,5 г / л из смешанной бактериальной культуры с использованием в качестве субстрата мелассу сахарного тростника. Хотя источники углерода, такие как сахароза, глюкоза, меласса и глицерин, использовались культурой для культивирования, но содержание ПГБ, полученный со всеми этими источниками, зафиксировано в меньшем количестве по сравнению с тем, который получен с мелассой [63]. Максимальное содержание ПГА при использовании природных штаммов на примере *Bacillus megaterium* составляет 60% с концентрации биомассы 19,52 г / л и 20% концентрации мелассы [65]. Известно исследование где, осветленная тростниковая меласса использовалась в качестве единственного источника углерода, содержание ПГА составляло 63%, урожай биомассы составил 6,3г/л при 60 часовом культивировании почвенного штамма *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2948. Периодическое культивирование проводили при 37 ° С в ферментере 7,5 л BioFlo / Celligen 115 [66].

По физико-механическим свойствам средневзвешенные молекулярные массы полимеров, полученных из мелассы, были аналогичны средним молекулярным массам, полученным из обычно используемых пластиков культивируемые на чистых субстратах, равняются $(3,5-4,3) \times 10^5$ г / моль, с узким распределением массы (PDI 1,8–2,1), несмотря на наличие смеси микроорганизмов. Температура стеклования (-14 °С до 4,8 °С), температура плавления (89 °С-174 °С) и энтальпия плавления (0-82.1 Дж / г) контролировались в широких пределах составом мономера, который предполагает, что ПГА, произведенный из отходов или промышленных побочных продуктов открытой смешанной культурой, может быть универсальным в отношении тепловых свойств. Температуры разложения находятся между 277,2 °С и 294,9 °С, что указывает на широкие возможности термической обработки полимеров [67].

1.3 Методы экстракции ПГА

Выделение и очистка ПГА полимеров является важным шагом для их анализа и характеристики. Существует большинство различных методов, используемых для извлечения ПГА из клеток [68]. Существует множество методов экстракции, которые делятся на несколько типов: энзиматическая экстракция (с помощью ферментов, физическая, механическая и химическая (или экстракция с помощью растворителей).

1.3.1 Экстракция с помощью растворителей

Подбор методов экстракции ПГА обуславливается выделением ПГА с низким содержанием липосахаридов в самом полимере. Липосахариды являются эндотоксинами и их высокое содержание в полимере ограничивает их применение в медицинских целях [69]. Клеточная стенка препятствует полному выходу полимера и при экстракции без первичного разрушения и удаления клеточной стенки полимер будет содержать в себе остатки липосахаридов. Но с другой стороны при первичной обработке биомассы бактерий возможно разрушение полимера, и в следствие чего уменьшение его молекулярной массы. Также возможно, что вещества разрушающие клеточную стенку могут остаться в полимере после его экстрагирования из биомассы. Чаще всего используется обработка детергентами. Обработка биомассы *Alcaligenes eutrophus*, содержащий 50% ПГБ, тритоном X-100 в соотношении 1:1 приводила к выделению полимера с чистотой 87%. Увеличение чистоты достигалось последующей промывкой гипохлоритом натрия [70].

Экстракция растворителем является наиболее широко применяемым методом извлечения ПГА из клеточной биомассы. Этот метод также регулярно используется в лабораториях из-за его простоты и быстроты. В нем участвуют две основные стадии: во-первых, это изменение проницаемости клеточной мембраны, что позволяет высвободить и

солюбилизировать ПГА. Затем следует осаждение ПГА [71]. Большинство процессов, разработанных для выделения ПГА из микробной биомассы, основаны на экстракции органическими растворителями, включая галогенированные углеводородные растворители, такие как хлороформ и дихлорметан [72]. Основным недостатком этих методов является наличие большого количества этих растворителей, что в свою очередь повышает стоимость производства и требует утилизации во избежание загрязнения окружающей среды [73].

Два основных шага для получения полимера, это, во-первых, изменение проницаемости клеточных мембран, что позволит высвободить и растворить молекулы ПГА. Затем следует осаждение полимера в виде осадка и его фильтрация. Извлечение полимера с помощью растворителей проходит без потери его качества за счет повышения проницаемости клеточной мембраны и последующей солюбилизации ПГА. Биомассу лиофилизируют до извлечения полимера растворителем, например хлороформом. Далее, используется холодный метанол для осаждения полимера после экстракции хлороформом. Кроме того, свежесконцентрированная пастообразная биомасса может быть промыта ацетоном и высушена под вакуумом при температуре окружающей среды до экстракции растворителем [74]. Добавление к хлороформу или дихлорметану этилового спирта и проведение трёхкратной экстракции с нагреванием повышает выход ПЗГБ до 92 %, однако при последующем добавлении гексана для осаждения полимера, образуется азеотропная смесь гексан-этанол. Полученные образцы содержали остаточные липиды и жирные кислоты в количестве 2 %. Молекулярная масса (M_w) образцов составила 1850 Kd , коэффициент полидисперсности (D) ($3,3 \pm 0,5$). Применение предварительной обработки биомассы щелочным спиртом с последующей обработкой ацетоном позволило повысить выход и чистоту полимера, однако имело значительное падение молекулярной массы полимера от 1850 до 980 [20].

Широко используются методы экстракции с использованием органических растворителей. Лиофилизированную биомассу (100 мг, предварительно обработанную или нет) экстрагировали диметилкарбонатом (4мл, 1 ч при 90 ° C), пропиленкарбонатом (ПК, 4 мл, 4 ч при 140 ° C) или дихлорметаном (CH₂Cl₂, 4 мл, 4 ч при 50 ° C) в закрытой пробирке. Затем растворы центрифугировали при 4000 об / мин в течение 1 мин и фильтровали через полипропиленовые мембранные фильтры 0,45 мкм пористости. Полимер извлекали выпариванием растворителя и затем сушили при 60 °C под вакуумом в течение ночи. Каждое извлечение было выполнено в четырех экземплярах. Экстракцию в аппарате соклеста проводили с помощью диметилкарбонатом (осуществляли путем помещения биомассы (300 мг) в наперсток для экстракции целлюлозы, который был покрыт ватой и вставлен в экстрактор Soxhlet. Экстракцию проводили с помощью (150 мл) в течение 24 часов. полимер выделяли выпариванием растворителя и затем сушили при 60 °C в вакууме. Была также проведена серия экспериментов путем сочетания дальнейшей обработки остаточная биомасса после первоначальной обработки диметилкарбонатом (ДМК). Эти эксперименты были проведены в два пути:

1) путем сбора остаточной микробной биомассы после экстракции ДМК и ее экстракции снова с ДМК (4 мл, 1 ч при 90 ° C). Этот раствор затем обрабатывали как ранее описано.

2) путем сбора остаточной микробной биомассы после экстракции ДМК и ее обработки с NaClO (15 мин, к.т. или 100 °C); этот раствор центрифугировали при 4000 об / мин в течение 10 мин, чтобы удалить водную фазу и получить суспензию, которую дважды промыли водой (10 мл). Суспензию снова подвергали экстракции ДМК (4 мл, 1 час при 90 °C) для восстановления полимера[75].

Основой первичной экстракции является разрушение клеточной стенки и удаление остатков липидов. Для удаления липидов биомассу высушивали лиофилизацией и обезжиривали с помощью экстракции в

течение ночи с помощью ацетона. Эта биомасса была подвергнута трем различным процессам экстракции РНА:(а) «Классическая» экстракция хлороформом (перемешивание в течение ночи с хлороформом); (б) Ночная экстракция хлороформом с обратным холодильником (Soxhlet); (в) Экстракция под высоким давлением ацетоном выше температуры кипения растворителей.

«Классическая» экстракция хлороформом предполагает следующие манипуляции. Двадцать один грамм биомассы непрерывно перемешивали в течение 12 часов в 500 мл хлороформа при температуре окружающей среды. Систему хранили в темноте, покрывая алюминиевой фольгой для предотвращения образования свободных радикалов из хлороформа. Также существует новый метод с использованием ацетона под давлением[76].

Выделение ПГА с использованием гипохлорита (Ramsayetal., 1994) вызывает деструкцию эфирных связей в полимере и снижает величину молекулярной массы. При распылении хлороформа и раствора гипохлорита натрия (Nahnetal., 1994) достигается высокая эффективность очистки с незначительным повреждением полимера. Кроме того, на стадии экстракции большие сложности связаны с проникновением растворителя через клеточные мембраны, особенно это заметно при экстракции влажной биомассы. Растворители, не смешивающиеся с водой, весьма ограниченно проникают в клетку из-за находящейся там влаги. Для облегчения проникновения растворителя на стадии экстракции появляется дополнительная стадия обработки биомассы: подсушивание биомассы в дисковом сепараторе (патент ФРГ № 4036067), сушка биомассы потоком газа при температуре 100°C, лиофильная сушка биомассы или её замораживание вместе с метанолом (патент US4391766, US4310684), предварительная обработка сырой биомассы спиртом[77].

1.3.2 Энзиматическая экстракция

Для гидролиза структуры клеточной стенки бактерий *S. necator* были проведены эксперименты со следующими коммерческими ферментными продуктами, предоставленными производителями: Alcalase V R от Novozymes (Бразилия); Corolase V R L10, Corolase V R 7089, Rohalase V R Barley и Rohament V R CL от AB Enzymes (Германия); и Celumax V R BC и Protemax V R FC от Prozyn BioSolutions (Бразилия). После размораживания биомассы, из каждой культуры готовили суспензии в 250 мл раствора Эрленмейера с 2% (мас. / Об.) клеток в 100 мл буфера при конкретном pH для каждого типа фермента.. Ферментативный гидролиз проводили в термостате с перемешиванием при 100 об / мин в течение 1,5 ч при 60 ° C. Используемые в этом эксперименте клетки содержали 75% (мас. / Об.) Полимера, который экстрагировали ферментом Celumax V R BC в концентрации 0,02% (вес / вес). Выделение полимера осуществляли с помощью 1 мл хлороформа[78]. Сравнение энзиматических и химических методов экстракции ПГА показало практически одинаковые результаты по выходу ПГА (92-97%) [79].

1.3.3 Экстракция поверхностно-активными веществами

Поверхностно-активные вещества, такие как анионный додецилсульфат натрия (ДДС- Na), разрушить клетки путем включения в липидной мембраны бислоя. Действие ДДС-Na основано на его солюбилизующей способности. Целью данной обработки являлось удаление липидных и белковых фракций из биомассы и получение гранул ПЗГБ. Обработку проводили в течение часа при различной температуре. Принимая во внимание, что в результате такой обработки ПЗГБ не растворяется, а в раствор переходят из биомассы липиды и вещества белковой природы, в качестве критерия оценки эффективности обработки выбирают чистоту полимера[80]. Додесульфат натрия проникает в мембраны для увеличения объема клеточной оболочки, пока он не насыщается. При

дальнейшем добавлении мембрана клетки разрывается, в результате образуются мицеллы ПАВ и мембран фосфолипидов, это приводит к высвобождению П(ЗГБ) в раствор, окруженного клеточными остатками. Другая функция сурфактанта заключается в солюбилизации. Сурфактант солюбилизирует не только белки, но и другие клеточные соединения [81].

Некоторые поверхностно-активные вещества, такие как синтетические пальмитоил карнитин, широко распространенный природный сурфактант, лизирует *R. eutropha* и *A. latus*. Уровень лизиса *R. eutropha* составляет 70%, тогда как у *A. latus* более 85% (1 м Мальтоиноилкарнитин в буфере 0,1 М Трис-НСl, рН 7,0, 30 ° С, 60 мин). Преимущество этого метода исходит из того, что ПАВ лизирует клетки без разрушения полимерных гранул. Другой метод состоит в восстановлении П(ЗГБ) непосредственно из культуральной жидкости с высокой плотностью клеток, без предварительной обработки, путем добавления ДДС-На, встряхивания, нагревания и промывки. В экспериментах на *R. Eutropha* было получено, чистота П(ЗГБ) более 95% и полнота извлечения > 90% с отношением ДДС-На / биомассы выше, чем 0,4. Одним из основных преимуществ этого метода является тот факт, что он позволил восстановить ПГА непосредственно из высоких плотностей клеток: 50-300 г сухой клетки. Использование только поверхностно-активного вещества не может обеспечить высокую чистоту ПГА (> 97%) [17].

После обработки биомассы *Ralstonia eutropha* растворами додецилсульфата натрия различной концентрации и нагревания суспензии до 121 °С удалось выделить гранулы полимера, содержащие только 3-4 % примесей [23]. Также, ранее проведено исследование, в котором получены образцы полимера с низким остаточным содержанием липидов (0,4 – 0,6 %), однако в полимере помимо липидов и жирных кислот, зафиксировано наличие белковых веществ в концентрации до 6 %. С целью повышения полноты извлечения полимера и снижения количества примесей в нем исследован комбинированный метод, при котором биомассу предварительно обрабатывали раствором 5 %-го додецилсульфата натрия в течение часа при

60 °С, затем центрифугировали и отмывали водой. Далее проводили очистку дихлорметаном с последующим осаждением ПЗГБ гексаном. Для этого полимер, полученный на первой стадии, трёхкратно экстрагировали равными порциями дихлорметана в соотношении 1:10 при нагревании. В полученных образцах примеси отсутствовали. Степень извлечения ПЗГБ составила 98 – 99 %. Молекулярная масса составила от $6,2 \cdot 10^5$ - $6,8 \cdot 10^5$ г/моль, коэффициент полидисперсности для образцов лежал в пределах 2,9 – 3,2. Найдены оптимальные параметры процесса: концентрация ДДС-На 5 %; температура 60 °С, время обработки 40 мин [82].

Метод также имеет свои недостатки: низкая чистота извлекаемого полимера и высокая стоимость детергентов. Кроме того, метод требует большого количества детергентов на грамм ПГА для извлечения полимера и большого количества воды, чтобы произвести промывку биомассы [83]. Однако, есть и преимущества использования мыльных растворов: метод может быть применен для сырой биомассы непосредственно после культивирования, что исключает необходимость сушки полимера до экстракции [84].

1.3.4 Применение сверхкритических флюидов

Сверхкритические жидкости обладают уникальными физико-химических свойств, таких как высокой плотностью и низкой вязкостью, что делает их пригодными в качестве растворителей для экстракции. Для этой цели, CO₂ является наиболее широко используется из-за его низкой токсичности и реактивность, умеренный критической температуры и давления (31°С и 73 атм), доступностью, дешёвизной и негорючестью[85]. Этот метод является весьма подходящим методом для частичного извлечения компонентов из биомассы и внутриклеточных метаболитов из-за возможной модификации системы по физическим параметрам и растворителям для селективного извлечения соединений

различной полярности и гидрофильности, без каких-либо загрязнений [86].Сверхкритический CO₂ также использовали в качестве антирастворителя для получения микросфер ПГА в качестве систем доставки лекарств [87].

1.3.5 Применение гидроксида натрия и гидроксида калия

Гидроксид натрия (NaOH) и гидроксид калия (KOH) оказались хорошими веществами для первичной обработки биомассы с последующим экстрагированием ПГА, поскольку они дешевы и эффективны, также приводящие к высокому выходу ПГА и его чистоте. Кроме того, количество используемого NaOH и KOH взято гораздо меньше, чтобы получить аналогичную эффективность извлечения. Очищенный ПГА, полученный методом с применением NaOH является более подходящим для биомедицинских целях, так как это может уменьшить количество эндотоксина в полимере. Тем не менее, щелочи могут изменить физические и механические свойства ПГА, что обусловлено значительным гидролизом полимера и его снижение молекулярной массы. ПГА с чистотой 91-92% и выходом 90-93% получали из рекомбинантной *E. coli*, содержащей ПГА ген *S. necator* с использованием 0,1 М раствора NaOH или KOH при 30 °С в течение 1 ч. Однако потери ПГА и снижение молекулярной массы наблюдалось в сильно щелочном растворе. Было подсчитано, что использование NaOH на 25% снижает стоимость экстракции, чем метод расщепления поверхностно-активным веществом [88].

1.3.6 Физические методы экстракции

Физические методы переработки биомассы микроорганизмов направлены на разрушение структуры клетки: экструзия биомассы на Френч

прессе, ультразвуковая обработка, встряхивание в шейкере со стеклянными бусами, замораживание-оттаивание, высушивание [89,90].

Выделение ПГА из биомассы бактерий *Pseudomonas putida* может осуществляться методом селективной флотации. Чистота процесса зависит, главным образом, от селективности процесса агрегации и воздействия неселективного транспорта воды для создания пузырьков воздуха, растворенного в воде. Наблюдаемую агрегацию частиц смеси можно объяснить с помощью расширенной ДЛФО теории (Ван-дер-Ваальсовых, электростатических и гидрофобных взаимодействий). Эта дополнительная сила отталкивания, скорее всего, играет решающую роль в предотвращении агрегации при определенных условиях. Агрегаты, образовавшиеся вблизи изоэлектрической точки клеточных отходов и включений в ПГА, обеспечили высокую чистоту полимера. С этими агрегатами чистота в 86% была получена в трех последовательных сериях флотации, где вклад неселективного транспорта в жидкой фазе был существенным. Показано, что без неселективного транспорта чистота полимера в этом процессе будет достигать до 95%. Количество выделенного полимера, в основном, зависит от фракции полимерных включений, которые не объединяются и слишком малы по своим размерам для эффективной флотации [91].

Гомогенизация под высоким давлением (НРН), одна из большей части широко известный метод крупномасштабного разрушения клеток. Гомогенизатор состоит из пневматического поршневого насоса, который распыливает суспензию клеток через 2 параллельных шлица ($\approx 100 \text{ м}$) под высоким давлением. Полученные параллельные потоки жидкости, попадают на вертикальную плиту, направляясь навстречу друг другу, рекомбинируются и вытесняются. Гомогенизация проходит при температуре 25 °С, которая поддерживается путем погружения камеры гомогенизации и линии выхода в лед в течение всего процесса. Производительность гомогенизатора зависит от биомассы сосредоточенной в процессе. сверх того, гомогенизатор часто останавливается засорениями, которые сделали

процесс трудным. Максимальный выход и чистота (98% и 95%) были получены при рабочем давлении 400 кг / см^{-2} после двух циклов [92].

Исходя из литературных данных можно сказать, что культивирование на различных субстратах и каждый процесс экстракции имеет свои недостатки и универсальной методики культивирования и экстракции под каждый штамм не определена. Это и определило направление исследований данной работы.

2 Материалы и методы

2.1 Биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646

Технологический цикл процесса синтеза полимеров (ПГА) состоит из следующих операций и стадий представлен на рисунке 2.

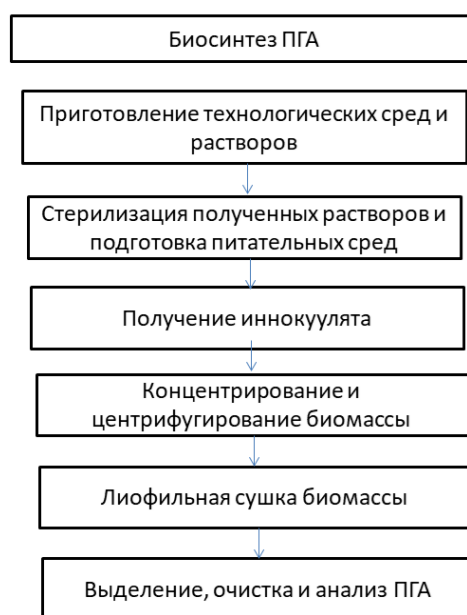


Рисунок 2 – Технологический цикл процесса синтеза ПГА [93].

2.1.1 Приготовление питательных растворов и их стерилизация

Следующие стадии технологического цикла:

- стадия приготовления маточных растворов;
- стадия стерилизации.

Вся посуда (колбы, пробирки) предварительно должна быть простерилизована в автоклаве насыщенным водяным паром при давлении 0,1013 МПа. Для приготовления маточных растворов берут

соответствующие навески сухих солей и растворяют дистиллированной водой при комнатной температуре. В качестве минеральной среды используется смесь из четырёх маточных растворов: А, Б, В, Г. Растворы готовятся из расчёта на производственную программу.

Раствор А – расчётное количество фосфата калия и фосфата натрия растворяют в дистиллированной воде при перемешивании.

Раствор Б – навеску сульфата магния растворяют в дистиллированной воде.

Раствор В - навеску железа лимоннокислого вносят в ёмкость, дистиллированной водой и кипятят до полного растворения. Затем раствор доводят водой до метки.

Раствор Г – в ёмкость вносят поочередно навески солей, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают до полного растворения.

Растворы: А; Б; В; Г; стерилизуются при температуре плюс 120°C, давлении 0,11 МПа в течение 45 минут.

Раствор глюкозы готовят с концентрацией 500 г/л. Полученный раствор насосом перекачивают в ёмкость через предфильтр и стерилизующий фильтр [94].

Гидролиз мелассы проводили 4 методами. Первый способ – автакловирование мелассы при 1 атм в течении 20 минут. Второй способ- термическая обработка мелассы при температуре кипение в течении 2 часов. Третий способ- кислотный гидролиз 1 Н серой кислотой в соотношении 1:5 кислота:меласса. Четвертый способ- щелочной гидролиз гидроксидом калия 1 М в соотношении 1:5 кислота:меласса.

2.1.2 Получение инокулята из музейной культуры

После стерилизации в колбах готовят среду и вносят культуру *S. eutrophus* В-10646 [34]. Музейную культуру, хранящуюся на скошенной

агаризованной среде в холодильнике, смывают с поверхности среды (4 пробирки) в стерильную коническую колбу ёмкостью 2 л с 1 л полной средой Шлегеля. Оптическая плотность исходного инокулята (без разведения), не менее 0,1 (440 нм). Все работы ведутся с соблюдением асептики. После чего колбы устанавливаются в шейкер-инкубатор Innova 44 и инкубируются в течение 20–22 ч при 30 °С. Инкубирование проводится до получения оптической плотности не менее $0,2 \pm 0,02$ [94].

2.1.3 Культивирование бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 в колбах

Бактерии выращивали в периодическом двухстадийном режиме, разработанном ранее для синтеза ПГА. Для выращивания бактерий за основу была принята минеральная среда Шлегеля следующего состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -9,1; KH_2PO_4 -1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,025, NH_4Cl -1,0 (г/л) и раствор микроэлементов (H_3BO_3 -0,288; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,030; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,008; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,176; NaMoO_4 -0,050; NiCl_2 -0,008 (г/л)).

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5 л, заполненных культурой на 40% объема на термостатируемом шейкере-инкубаторе («NewBrunswickScientific», США) при 30°С в течение 48-72 часов. В качестве углеродных субстратов использовали моно- и дисахара (глюкоза, фруктоза, манноза, ксилоза, галактоза, сорбит, маннит, арабиноза, сахароза, мальтоза, лактоза) и свекловичная меласса. Ранее данные субстраты (кроме глюкозы и фруктозы) не использовались для культивирования бактерий. Данные субстраты выбраны для культивирования так как эти ди- и моносахара входят в состав многих гидролизатов – альтернативных источников углерода, которые широко изучаются и уже используются в промышленном культивировании микроорганизмов.

2.1.4 Измерение параметров процесса культивирования

В ходе культивирования периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на фотоколориметре, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм).

Урожай биомассы бактерий в культуре регистрировали весовым способом. Для этого 20 мл бактериальной суспензии центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин (центрифуга «Eppendorf», Германия). Затем дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение 24 ч, охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах 4-го класса точности (Mettler Toledo, Швейцария). Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом пустого бюкса.

Содержание сахаров определяли по модифицированному методу Бертрана. В коническую колбу объемом 200 мл отмеривают 10 мл фугата и доводят объем колбы до метки водой. Для проведения анализа в коническую колбу объемом 250 мл отмеривают пипеткой 50 мл разбавленного фугата и добавляют 25 мл 0,1М раствора йода, 3 мл 1 М раствора гидроксида натрия, содержимое колбы перемешивают и оставляют на 15 минут в темном месте. Ровно через 15 минут в колбу добавляют 4,5 мл 1 М раствора серной кислоты и оттитровывают избыток йода 0,1 М раствором тиосульфата натрия до появления соломенно-желтого цвета, затем вносят 1 мл индикатора 1% раствора крахмала. Когда раствор приобретет синий цвет продолжаем титрование до исчезновения синей окраски. Концентрацию рассчитывали из калибровочной кривой.

2.1.5 Концентрирование, центрифугирование и лиофильная сушка сгущенной бактериальной культуры

После процесса ферментации полученная культуральная жидкость сливается в сборник, откуда далее поступает в вакуум-выпарную установку, где концентрируется до 300 – 350 г/л, а затем перистальтическим насосом Ismatec Flowmaster FMT300 подается в сборник упаренной суспензии [94].

Бактериальную биомассу в виде сырой пасты с влажностью 50-60 % высушивают лиофильно в сублимационной установке IlshinBioBase (Корея). Бактериальная паста загружается в подносы-лотки, и проходит лиофилизацию в лиофильной сушилке для получения сухой биомассы. Далее высушенная биомасса используется для выделения полимера. Получают биомассу с влажностью не более 0,5 %. [95].

2.2 Экстракция ПГА с первичной обработкой гипохлорита натрия

2.2.1 Свойства гипохлорита натрия

Гипохлорит натрия - NaClO , получают хлорированием водного раствора едкого натра (NaOH) молекулярным хлором (Cl_2) или же электролизом раствора поваренной соли (NaCl). Безводный гипохлорит натрия (ГПХН) представляет собой неустойчивое бесцветное кристаллическое вещество. Элементный состав: *Na* (натрий) (30,9 %), *Cl* (хлор) (47,6 %), *O* (кислород) (21,5%). Молекулярная масса NaClO (по международным атомным массам 1971 г.) -74,44. Хорошо растворим в воде: 53,4 г гипохлорита натрия растворяется в 100 граммах воды при 20°C (или 130 г в 100 г воды при 50°C). Растворимость NaClO представлена в таблице 1.

У гипохлорита натрия известно три кристаллогидрата:

-моногидрат $\text{NaOCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ – крайне неустойчив, разлагается выше 60°C , при более высоких температурах со взрывом.

-кристаллогидрат $\text{NaOCl}\cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ – более устойчив, чем моногидрат, плавится при $57,5^\circ\text{C}$.

-пентагидрат $\text{NaOCl}\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ – наиболее устойчивая форма, представляет собой белые или бледно-зелёные ромбические кристаллы. Негигроскопичен, хорошо растворим в воде. В воздухе расплывается, переходя в жидкое состояние, из-за быстрого разложения. Температура плавления: $18 - 24,4^\circ\text{C}$. При нагревании до температуры $30 - 50^\circ\text{C}$ разлагается.

Отбеливающие свойства гипохлорита натрия основаны на образовании ряда активных частиц (радикалов) и, в частности, синглетного кислорода, обладающего высоким биоцидным и окислительным действием, образующегося при разложении гипохлорита:



2.2.2 Экстракция ПГА из биомассы бактерий

Схема проведения экстракции представлена на рисунке 3, масштабирование экстракции представлено на рисунке 4.

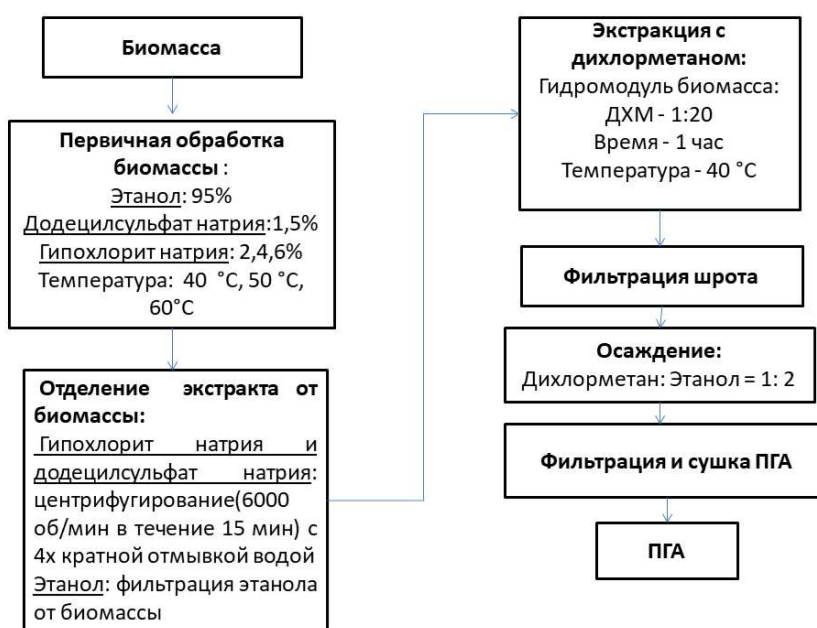


Рисунок 3 – Схема экстракции ПГА из биомассы бактерии *Cupriavidus necator*

B10646.



Рисунок 4- Масштабирование процесса экстракции гипохлоритом натрия.

2.2.3 Исследование чистоты полимера

Для определения чистоты полимера 4 мгр подвергали метанолизу для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Для проведения метанолиза потребуются:

- Обратные холодильники
- Штатив с лапками
- Колбочки
- Тонкие резинки
- Воронки (маленькая, делительная)
- Вата
- Пипетка на 1 мл
- Хлороформ (CHCl_3)
- Метанол (CH_3OH)
- Серная кислота концентрированная ($\text{H}_2\text{SO}_{4\text{концен}}$)

К пробе необходимо добавить 0,8 мл метанола, 0,14 мл конц. серной кислоты и 1 мл хлороформа, затем пробы поместить под обратный холодильник и зафиксировать резинками. После того как начнет капать

сконденсированный хлороформ засечь время и кипятить 3 ч. По истечении времени, поднять холодильники для охлаждения пробы и добавить по 3 мл дист. воды, пробы хорошо взболтать и поставить отслаиваться в холодильник минимум на пару часов. Проба готова к хроматографированию. Далее исследование состава жирных кислот производилось на газовом хроматографе (AgilentTechnologies).

2.2.4 Исследование молекулярно-массовых характеристики образцов полимера

Для исследования молекулярно-массовых характеристик, образцы полимера навеской 20 мг растворили в 2 мл хлороформа и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исследовали с использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов AgilentPS-HEasiVial. Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность (D). Расчет проводился в программе AgilentChemStationforLCSytem. Работа на хроматографе проводилась согласно инструкции производителя.

3 Результаты исследования

3.1 Культивирование бактерий на различных субстратах

Результаты культивирование бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 представлены в таблице 1.

Таблица 1- Рост бактерий *Cupriavidus necator* B10646 на различных субстратах («+»- рост бактерий, «-»- роста бактерий не наблюдалось)

Субстраты	Рост бактерии (+/-)
Галактоза	-
Арабиноза	-

ВЫВОДЫ

1. Исследован рост бактерий *C. necator* В-10646 и синтез полигидроксиалканоатов на различных сахаросодержащих субстратах. На нативной мелассе урожай биомассы составил 1,8 г/л, содержание ПГА 58%. Гидролиз мелассы кислотой увеличивает концентрацию доступных сахаров в субстрате, концентрация биомассы составила 5,8 г/л, содержание ПГА 60%. Использование мелассы для культивирования бактерий сократит затраты на субстрат в 4 раза.

2. Исследовано влияние технологических параметров обработки биомассы гипохлоритом натрия на полноту извлечения ПГА. Использование гипохлорита натрия с концентрацией 4 % в при температуре экстракции 40°C обеспечивает выход 98 % ПГА. Уравнение

$Y = 89,7222 - 6,0 \cdot X_1 + 4,5 \cdot X_2$ дает представление о количественном влиянии каждого фактора на выход ПГА в процессе экстракции и показывает возможное управление этим процессом.

3. Предложена перспективная схема процесса экстракции ПГА. Использование гипохлорита натрия для первичной обработки биомассы позволит сократить затраты на экстракцию до 20%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee Gi Na Future of microbial polyesters Microbial Cell Factories/ Gi Na Lee and Na Jonguk //Microbial Cell Factories. – 2013. – Vol.12. – P.54.
2. Możejko-Ciesielska, J. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?/ J.Możejko-Ciesielska, R. Kiewisz, // Microbiological Research. – 2016. –V.192. – P. 271–282.
3. Muhammadi, S. Bacterial polyhydroxyalkanoates-ecofriendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications/ S. Muhammadi, M.Afzal, S. Hameed, // Green Chem. Lett. Rev. – 2015. – V.8. – P.56-77.
4. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements/ A. Anjum, M. Zuber, K.M. Zia, A. Noreen, M.N. Anjum, S.Tabasum, // Int. J. Biol. Macromol. – 2016. – V. 89. – P. 161-174.
5. Pittmann, T. Potential for polyhydroxyalkanoate production on German or European municipal waste water treatment plants/ T. Pittmann, H. Steinmetz, //Bioresour. Technol. – 2016. – V.214, – P. 9-15.
6. Hassan M.A Sustainable production of polyhydroxyalkanoates from renewable oil-palm biomass/ M.A. Hassan, L.N. Yee, P.L. Yee, H. Ariffin, A.R. Raha, Y.Shirai, , K.Sudesh// Biomass Bioener. – 2013. – V.50, – P.1-9.
- 7 .Ольхов А. А. Структура и механические свойства экструзионных смесевых пленок на основе полиэтилена и полигидроксibuтирата / А. А. Ольхов, В. С. Маркин, Р. Ю. Косенко, М. А. Гольдштрах, Г. Е. Заиков, С. В. Власов, А. Л. Иорданский // Вестник Казанского технологического университета. –2015. –№3. –Т.18. – С. 121-12
8. ЖилаН.О. ХарактеристикакультурыCupriaviduseutrophusB-10646, синтезирующейполигидроксиалканоатыприростенасахарахилипидныхсубстратах/ Н.О. Жила, Т.Г. Волова, Г.С. Калачева // Журнал сибирского

Федерального Университета. Биология. –2014. –Т. 2.–С.161-173.

9. Волова Т.Г. Полиоксиданканоаты (ПОА) - биоразрушаемые полимеры для медицины/ Т.Г.Волова, В.И. Севастьянов., Е.И. Шишацкая– Новосибирск, Издательство СО РАН. – 2003. – С. 330.

10. Шершнева А. М. и др. Конструирование микрочастиц на основе резорбируемых полимеров Биопластотан с применением метода распылительной сушки. – 2014.

11. Волова Т. Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : метод. указания по лаб. работам / Т. Г. Волова, Н. А. Войнов, Е. И. Шишацкая, Г. С. Калачева//– Красноярск : ИПК СФУ. –2008.

12. Samorì Chiara Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery/Chiara Samorì, Federica Abbondanzi, Paola Galletti, Loris Giorgini, Laura Mazzocchetti, Cristian Torri, Emilio Tagliavini //Bioresource Technology. –2015. –Vol.189. –P.195-202.

13. Hejazi P. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(3-hydroxybutyrate) recovery / P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani, Y. Yamini // Biotechnology Progress. – 2003. – №19. – P. 1519–1523.

14. Gumel A. M. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates / A. M. Gumel, M. S. M. Annuar, Y. Chisti //Polym Environ. –2012. –Vol. 21. – P. 580–605.

15. Koller Martin Strategies for recovery and purification of poly[(R) -3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass/Martin Koller, Horst Niebelschütz, Gerhart Braunegg// Eng. LifeSci. – 2013. – V.13. – P.549–562.

16. Gumel A. M. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates /A. M. Gumel, M. S. M. Annuar, Y. Chisti //J Polym Environ –2012. –Vol. 21. –P.580–605.

17. B.Kunasundari Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B.Kunasundari, K. Sudesh //eXPRESS Polymer Letters. – Vol.5.–№7 .–2011.–P.620–634.

18. Вайнберг Р. Ш. Теплофизические проблемы и практические результаты повышения энергоэффективности извлечения и термообработки высокомолекулярных биополимеров/Вайнберг Р. Ш. и др. //Промышленная теплотехника. – 2007 . – С. 163.

19. Bugnicourt E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez // eXPRESS Polymer Letters –Vol.8.–№.11. – 2014.– P.791-808.

20. Chen Y. Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactantchelate aqueous system/ Y. Chen, Q. Xu, H. Yang, G. Gu, // *Process Biochem.* –2001. – Vol.36. –P.773-779.

21. Holmes P. A.; Lim G. B. Separation process. U.S. Patent 4,910, P. 145-1990.

22. Ray S. Co-metabolism of substrates by *Bacillus thuringiensis* regulates polyhydroxyalkanoate co-polymer composition/ S. Ray, V.C. Kalia // *Bioresour Technol.* –2017. –V.224. –P. 743–747.

23. Kumar P. Production of co-polymers of polyhydroxyalkanoates by regulating the hydrolysis of biowastes / P.Kumar, S.Ray, V.C. Kalia // *Bioresour Technol.* –2016. –V. 200. –P.413–419.

24. Masood F. Polyhydroxyalkanoates— what are the uses? Current challenges and perspectives/ F. Masood, T. Yasin, A. Hameed // *Crit Rev Biotechnol.* –2015. –V.35. –P.514–521.

25. Masood F. Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by *Bacillus cereus* FA11/ F. Masood, M. Abdul-Salam, T. Yasin, A. Hameed, // *3 Biotech.* –2017. – V.7.

26. Park S. J. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose/ S. J.Park, Y.-A.Jang, W. Noh, Y. H. Oh, H. Lee, Y. David, S. Y. Lee // *Biotechnology and Bioengineering.* –2014.

–V.112. –№3. –P.638–643.

27. Flores-Sánchez A. Synthesis of Poly-(R-hydroxyalkanoates) by *Cupriavidus necator* ATCC 17699 Using Mexican Avocado (*Persea americana*) Oil as a Carbon Source/ A. Flores-Sánchez, M. del R. López-Cuellar, F. Pérez-Guevara, U. Figueroa López, J. M. Martín-Bufájer, B. Vergara-Porras // International Journal of Polymer Science. –2017. – P. 1–10.

28. Raberg M. Proteomic and transcriptomic elucidation of the Mutant *Ralstonia eutropha* g+1 with regard to glucose utilization/ M. Raberg, K. Peplinski, S. Heiss, A. Ehrenreich, B. Voigt, C. Döring // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V.77. – P.2058–2070

29 . Sen K.Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source/ K.Y. Sen, M.H. Hussin, S. Baidurah // Biocatal. Agric. Biotechnol. – 2019. – V.17. – P.51–59.

30. Reddy Venkateswar M. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from alkylphenols, mono and poly-aromatic hydrocarbons using *Bacillus* sp. CYR1: A new strategy for wealth from waste/ Venkateswar M. Reddy, Y. Mawatari, Y. Yajima, C. Seki, T. Hoshino, Y.-C. Chang // Bioresource Technology. – 2015. – V.192. – P.711–717.

31. Huschner F. Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts / F. Huschner, E. Grousseau, C. J. Brigham, J. Plassmeier, M. Popovic, C. Rha, A. J. Sinskey // Process Biochemistry. – 2015. – V 50. – P.165–172.

32. Ray S. Optimization and characterization of PHA from isolate *Pannonibacter phragmitetus* ERC8 using glycerol waste/ S. Ray, V. Prajapati, K. Patel, U. Trivedi // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – V.86. – P.741–749.

33. Kumar P. Co-production of polyhydroxyalkanoates and carotenoids through bioconversion of glycerol by *Paracoccus* sp. strain LL1/ P. Kumar, H.-B. Jun, B. S. Kim // International Journal of Biological Macromolecules. –2018. –

V.107. – P.2552–2558.

34. Burniol-Figols A. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented crude glycerol: Study on the conversion of 1,3-propanediol to PHA in mixed microbial consortia/ A. Burniol-Figols, C. Varrone, A. E. Daugaard, S. B. Le, I. V. Skiadas, H. N. Gavala // *Water Research*. –2018. –V.128. –P. 255–266.

35. Strong P. The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane / P. Strong, B. Laycock, S. Mahamud, P. Jensen, P. Lant, G. Tyson, S. Pratt // *Microorganisms*. –2016. – V.4. –P.11.

36. Dietrich D. Differential sensitivity of polyhydroxyalkanoate producing bacteria to fermentation inhibitors and comparison of polyhydroxybutyrate production from *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas pseudoflava*/ D. Dietrich, B. Illman, C.Crooks, // *BMC Res Notes*. –2013. –V.6. – P. 219.

37. Kim Recombinant *Ralstonia eutropha* engineered to utilize xylose and its use for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from sunflower stalk hydrolysate solution/ *Microb Cell Fact*. –2016.

38. Bhatia S.K. Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119/ S.K. Bhatia, R. Gurav, T-R. Choi, H-R. Jung, S-Y. Yang, Y-M. Moon, H-S. Song, J-M. Jeon, K-Y. Choi, Y-H. Yang// *Bioresource Technology*. –2018. –V.271. –P.306-315.

39. Kulkarni S.O. Production of copolymer, poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes/ S.O. Kulkarni , P.P. Kanekar , J.P. Jog , S.S. Sarnaik, S.S. Nilegaonkar // *International Journal of Biological Macromolecules*. –2014. –V.72. –P.784-789.

40. Yustinaha Production of polyhydroxybutyrate from oil palm empty fruit bunch (OPEFB) hydrolysates by *Bacillus cereus* suaeda B-001/ Yustinaha , Nurul Hidayata , Rizal Alamsyahc , Ahmad Muhaimin Rosland , Heri Hermansyaha , Misri Gozana// *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* . –2019. –V.18. – P.1878-1881.

41. Soto L.R. Hydrogen and polyhydroxybutyrate production from wheat

straw hydrolysate using *Caldicellulosiruptor species* and *Ralstonia eutropha* in a coupled/ L.R. Soto, E. Byrne, E.W.J. van Niel, M. Sayed, C.C. Villanueva, R. Hatti-Kaul // *Process Bioresource Technology*. –2018. –V.272. –P.259-256.

42. Ahn J. Effect of acid-digested rice straw waste feeding methods on the 3HV fraction of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production/ J. Ahn, E. H. Jho, K. Nam // *Process Biochemistry*. –2016. –V.51. –P.2119–2126.

43. Varavut Tanamool Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by newly bacterial isolates using non-detoxified rice husk hydrolysate / Tanamool Varavut, Soemphol Wichai // *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*. –2016. –V.21. –P.404-410.

44. R. O'Rourke The effects of *Parachlorella kessleri* cultivation on brewery wastewater / R. O'Rourke, M. Gaffney, R. Murphy // *Water Sci. Technol.* –2015. –V.73. –P. 1401-1408.

45. Malihe Amini Production of the polyhydroxyalkanoate biopolymer by *Cupriavidus necator* using beer brewery wastewater containing maltose as a primary carbon source/ Amini Malihe, Yousefi-Massumabad Hassan, Younesi Habibollah, Abyar Hajar, Bahramifar Nader // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. –2020. –V. 8.

46. Li M.. Optimization of polyhydroxybutyrate production by experimental design of combined ternary mixture (glucose, xylose and arabinose) and process variables (sugar concentration, molar C:N ratio)/ M. Li, K. M. Eskridge, M. R. Wilkins // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. –2019. –V.42. –P.1495-1506.

47. Cerrone F. Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation/ F. Cerrone, R. Davis, S. T. Kenny, T. Woods, A. O'Donovan, V. K. Gupta, K. O'Connor // *Bioresource Technology*. –2015. –V. 191. –P.45–52.

48. Heng King Sern Conversion of rice husks to polyhydroxyalkanoates (PHA) via a three-step process: optimized alkaline pretreatment, enzymatic hydrolysis, and biosynthesis by *Burkholderia cepacia* USM/ King-Sern Heng, Rajni Hatti-Kaul, Farook Adam, Toshiaki Fukui, Kumar Sudesh// (JCM 15050). –2017. –V.92. –P.100-108.

49. Schmid M. T. Utilization of desugarized sugar beet molasses for the production of poly(3-hydroxybutyrate) by halophilic *Bacillus megaterium* uyuni S29/ M. T. Schmid, H. Song, M. Raschbauer, F. Emerstorfer, M. Omann, F. Stelzer, M. Neureiter// Process Biochemistry. –2019. –V. 86. –P.9-15.

50. Khok Yong Sen Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source/ Sen Khok Yong, Hussin M. Hazwan, Baidurah Siti // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. –2018.

51. Schmida Maximilian T. Utilization of desugarized sugar beet molasses for the production of poly(3-hydroxybutyrate) by halophilic *Bacillus megaterium* uyuni S29/, Hyunjeong Songa, Michaela Raschbauer, Florian Emerstorferb, Markus Omannb, Franz Stelzerc, Markus Neureiter// Process Biochemistry. –2019. –V.86. –P. 9-15.

52. Sahu Omprakash Assessment of sugarcane industry: Suitability for production, consumption, and utilization / Omprakash Sahu //Annals of Agrarian –2018. –V.16. – P. 389-395.

53. Mona K. Gouda Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources/ K. Gouda Mona, Azza E. Swellam, Sanaa H. // –2001. –V.156. –P.201–207.

54. Park Si Jae Metabolic Engineering of *Ralstonia eutropha* for the Production of Polyhydroxyalkanoates From Sucrose/ Si Jae Park, Young-Ah Jang, Won Noh, Young Hoon Oh, Hyuk Lee, Yokimiko David, Mary Grace Baylon,

Jihoon Shin, Jung Eun Yang, So Young Choi, Seung Hwan Lee, Sang Yup Lee//
Biotechnol. Bioeng. –2014. –V.9999. –P.1–6.

55. Tomotani E.J. Inverted sugar syrup attained from sucrose hydrolysis using a membrane reactor/ E.J.Tomotani, M. Vitolo // Brazilian J. Pharm. Sci. – 2010. –V.46. –P. 571-577.

56. Nomanbhay S.M. Microwave-Assisted Alkaline Pretreatment and Microwave Assisted Enzymatic Saccharification of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber for Enhanced Fermentable Sugar Yield. J. Sustain/ S.M. Nomanbhay, R. Hussain, K. Palanisamy // Bioenergy Syst. –2013. –V.3. –P.7-17.

57. Dalsasso R. R. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate/ R. R. Dalsasso, F. A. Pavan, S. E. Bordignon, G. M. F. de Aragão, P. Poletto // Process Biochemistry. –2019. –V.85. –P.12-18.

58. Taher Ben Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues/ Ben I. Taher, P. Fickers, S. Chniti, M. Hassouna, // Biotechnol. Prog. –2017. –V.33. – P.397-406.

59. Khajavi, S.H., Kimura, Y., Oomori, T., Matsuno, R., Adachi, S., Kinetics on sucrose decomposition in subcritical water/ S.H. Khajavi, Y. Kimura, T. Oomori, R. Matsuno, S. Adachi // LWT - Food Sci. Technol. –2005. –V.38. – P.297-302.

60. Albuquerque M. G. E. Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: The use of a 2-stage CSTR system for culture selection/ M. G. E. Albuquerque, S. Concas, S. Bengtsson, M. A. M. Reis // Bioresource Technology. –2010. –V. 101. –P.7112–7122.

61. Bengtsson S. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms / S. Bengtsson, A. R. Pisco, M. A. M. Reis, P. C. Lemos // Journal of Biotechnology. –2010. –V.145. –P. 253–263.

62. Goma E. Z. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol / Goma E. Z. // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. –2014. –V.57. –P 145–154.

63. Albuquerque M. G. E. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses/ M. G. E. Albuquerque, M. Eiroa, C. Torres, B. R. Nunes, M. A. M. Reis, // *Journal of Biotechnology*. –2007. –V.130. –P.411–421.

64. Naheed N. Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in *Enterobacter* sp. SEL2/ N. Naheed, N. Jamil // *Brazilian Journal of Microbiology*. –2014. –V.45. –P.417–426.

65. Mascarenhas Joyline Production and characterization of polyhydroxyalkanoates (pha) by *Bacillus megaterium* strain pha using inexpensive agro-industrial wastes/ Joyline Mascarenhas, K Aruna // *International Journal of Recent Scientific Research*. –2019. –V. 10. –P. 33359-33374.

66. Tripathi A. D. Utilizing of Sugar Refinery Waste (Cane Molasses) for Production of Bio-Plastic Under Submerged Fermentation Process/ A. D. Tripathi, A. Yadav, A. Jha, S. K Srivastava // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2011. –V.20. –P.446–453.

67. Bengtsson S. Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures/ S. Bengtsson, A. R. Pisco, P. Johansson, P. C. Lemos, M. A. M. Reis // *Journal of Biotechnology*. –2010. –V.147. –P. 172–179.

68. Khosravi-Darani K. Application of Supercritical Fluid Extraction in Biotechnology/ K. Khosravi-Darani , E. Vasheghani-Farahani // *Journal Crit Rev Biotechnol*. –2005. –V.25. –P. 231.

69. Lee Sang Yup Removal of Endotoxin during Purification of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Gram-Negative Bacteria /Lee Sang Yup , Jong-il Choi,

Kyuboem Han, Ji Yong Song// *Appl Environ Microbiol.* –1999. –V.65. –P. 2762–2764.

70. Ramsay J.A., Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment /J.A.Ramsay, E. Berger, B. A. Ramsay* anU C. Chavarie // *Biotechnology Techniques.* –1990. –V.4.-No. 4. –P. 221-226.

71 Koller M. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure / M. Koller, R. Bona, E. Chiellini, G. Braunegg // *Biotechnology Letters.* –2013. – P. 1023–1028.

72 Choi J Efficient and economical recovery of poly-3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals/ J. Choi, S. Y. Lee // *Biotechnology and bioengineering.* – 1999.– №. 5. – P. 546-553

73 Choi. J. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation / J.C hoi, S.Y. Lee // *Bioprocess Eng.* – 1997. – Vol. 17. – P. 335–342.

74 Gumel A. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates / A. M. Gumel, M. S. M. Anuar, Y.Chisti // *Journal of Polymers and the Environment.* – 2013. – V. 21. – P. 580-605.

75.Samori Chiara Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery/Chiara Samori, Federica Abbondanzi, Paola Galletti, Loris Giorgini, Laura Mazzocchetti, Cristian Torri, Emilio Tagliavini // *Bioresource Technology.* –2015. –Vol. 189 –P. 195-202.

76.Koller Martin Extraction of short-chain-length poly[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure/Martin Koller, Rodolfo Bona , Emo Chiellini, Gerhart Braunegg // *Biotechnol Lett.* –2013. –Vol. 35. –P.1023–1028.

77.Киселев Е.Г.Технико-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов /Е.Г. Киселев, О.Н. Шишацкий, Э.Дж. Сински // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 3. –2012. –Vol.

5. –P. 300-310.

78. Andre ´ia Neves Use of Enzymes in Extraction of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator*/Andre ´ia Neves, Jose ´ Muler // *Biotechnol. Prog.* – 2012. –Vol.28. –P.1575-1580.

79. Harrison S.T.L. The lysis of Gram-negative *Alcaligenes eutrophus* by enzymes from cytophaga// *Biotechnol. Tech.*-1991.-V.5-.P.115-120

80. Киселев Е.Г. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий/ Е.Г. Киселев, А.В. Демиденко // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 2. –2014. –Vol. 7. – P.148-160.

81. Jong-il Choi Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals / Jong-il Choi, Sang Yup Lee // *Biotechnology and Bioengineering* – 1999. –Vol . 62. – P. 546–553.

82. Киселев Е. Г. Техничко-технологические основы биосинтеза резервных полигидроксиалканоатов водородными бактериями. – 2012.

83. Jian Yu. // *US Patent 7514525.* – 2009.

84. Thakor N. Application of the BPEC pathway for large scale biotechnological production of poly(3–mercaptopropionate) by recombinant *Escherichia coli* including a novel in situ isolation method/ N.Thakor, T.Lütke–Eversloh, A. Steinbüchel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – P. 835–846.

85. Sathiyarayanan G. A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus subtilis* MSBN17 /, G. Saibaba, G. Seghal Kiran, Joseph Selvin // *International Journal of Biological Macromolecules.*– 2013. – Vol . 59. – P. 170–177.

86. Mikkili I. Isolation, Screening and Extraction of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from Sewage sample / I. Mikkili, A. P Karlapudi, T.C. Venkateswarulu, J. Babu D., S.B. Nath, V. P. Kodali // *International Journal of*

PharmTech Research. – 2014. – Vol.6, №2. – P. 850-857.

87. Linton E. A Synthetic Biological Engineering Approach to Secretion-Based Recovery of Polyhydroxyalkanoates and Other Cellular Products / Elisabeth Linton / Utah State University. – 2010. – P. 161.

88. Ye J. Pilot Scale-up of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Production by *Halomonas bluephagenesis* via Cell Growth Adapted Optimization Process./J. Ye, W. Huang, D. Wang, F. Chen, J. Yin, T. Li, H. Zhang , GQ. Chen, // Biotechnol J. – 2018. – Vol. 13. – P. 409.

89. Han Jing Molecular Characterization of the phaECHm Genes, Required for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in the Extremely *Halophilic Archaeon Haloarcula marismortui* / Jing Han, Qiuhe Lu, Ligang Zhou, Jian Zhou, Hua Xiang // Appl Environ Microbiol. – 2007. – V. 73. – P. 6058–6065.

90. Tamer I. Optimization of poly(β -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: combined mechanical and chemical treatments/ I. M. Tamer, M. Moo-Young // Bioprocess Eng. – 1998. – V. 19. – P. 459-468.

91. Van Hee P. et al. Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation // Journal of colloid and interface science. – 2006. – T. 297. – №. 2. – С. 595-606.

92. Jacquel Nicolas Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)/ Jacquel Nicolas, Lo Chi-Wei, Wei Yu-Hong, Ho-Shing Wu, Shaw S. Wang // Biochemical Engineering Journal. – 2008. – Vol. 39. – P. 15–27.

93. Волова Т.Г. Полиоксиданканоаты (ПОА) - биоразрушаемые полимеры для медицины/ Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишадкая – Новосибирск, Издательство СО РАН. – 2003. – С. 330.

94. В. М. Сутягин Основные свойства полимеров: учебное пособие / В. М. Сутягин, О. С. Кукурина., В. Г. Бондалетов; Национальный исследовательский Томский политехнический университет. – Томск: Изд -во Томского политехнического университета. – 2010. – С. 96.


95. В.П. Дорожкин Химия и физика полимеров: учебное пособие /

Нижекамск– Нижекамский химико-технологический институт, 2013 – С. 189.

96. ГОСТ (проект) 11086 Гипохлорит натрия. Технические условия. – Москва: Стандартинформ.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой


подпись инициалы, фамилия
« 06 » июль 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Синтез полигидроксиалканоатов на различных сахарах в качестве
единственного источника углерода, исследование методов выделения
биополимера из биомассы бактерий

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель



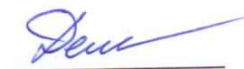
доцент, к.т.н. Е.Г. Киселев

Выпускник



О. Д. Петровская

Рецензент



доцент, к.т.н. Н.Ю. Демиденко

Красноярск 2020