

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т. Г. Волова

« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез полигидроксиалканоатов

бактериями *C. eutrophus B-10646* на глицерине различной степени очистки

Руководитель	_____	<u>доцент, к. т. н</u> должность, учёная степень	<u>Е.Г.Киселев</u> ициалы, фамилия
Выпускник	_____	<u>М.В.Калинин</u> ициалы, фамилия	

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Синтез полигидроксиалкоатов бактериями *C. eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки» содержит 45 страниц и включает в себя 43 литературных источников, 3 таблицы, 9 формул, 8 рисунков.

Ключевые слова : БИОСИНТЕЗ, ПГА, CUPRIAVIDUS EUTROPHUS, БИОПОЛИМЕР, П(ЗГБ).

Объект исследования: бактерии *Cupriavidus Eutrophus* B-10646.

Цель дипломной работы: Исследование процесса синтеза полигидроксиалкоатов (ПГА) *Cupriavidus Eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки.

Задачи дипломной работы: Изучить синтез ПГА *C.eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки в колбах, определить субстратную константу (K_s) и константу ингибирования (K_i); масштабирование процесса синтеза ПГА *C.eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки в 12 л ферментёре BioFlo 115; изучить физико-химические свойства полученных образцов полимеров.

Методы исследования: Для роста бактерий использовался шейкер инкубатор Шейкер инкубатор, 12 л. ферментёре BioFlo115. Изменение биомассы клеток регистрировали с помощью фотоэлектроколориметра UNICO. Для анализа свойств полимера использовали дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC-1 «Mettler Toledo», Швейцария), газовой хроматографии с масс-детектором, молекулярную массу определяли с использованием жидкостной хроматографии.

Полученные результаты и их новизна: изучен процесс синтеза ПГА на глицерине различной степени очистки. Полученные данные свидетельствуют о том, что глицерин различной степени очистки может быть использован в качестве источника углерода для синтеза ПГА. Присутствие примесей в составе глицерина критически не влияют на рост и синтез полимера.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Биотехнологический потенциал полигидроксиалканоатов в качестве альтернативы синтетических полимерным материалам	6
1.2 Культивирование микроорганизмов	7
1.3 Синтез ПГА.....	9
1.4 Производство полигидроксиалканоатов на глицериноподобных субстратах и оценка эффективности различных штаммов	11
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	16
2.1 Объекты исследования	16
2.2 Среда для культивирования бактерий	16
2.3 Техника и методы культивирования микроорганизмов.....	17
2.4 Методы контроля параметров процесса культивирования бактерий в режиме синтеза ПГА и определение кинетических и производственных характеристик	18
2.5 Микробиологические контроль процесса.....	22
2.6 Методы исследования химического состава и свойств ПГА	22
2.7 Статистические методы обработки результатов.....	25
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	26
3.1 Исследование процесса синтеза ПГА колбочной культуры <i>C. eutrophus</i> B10646 при использовании глицерина различной очистки	Ошибка! Закладка не определена.
3.2. Исследование влияния концентрации глицерина на удельную скорость роста и процесс микробиологического синтеза ПГА Ошибка! Закладка не определена.	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Исследование синтеза ПГА на глицерине различной степени очистки в 12 литровом ферментере	Ошибка! Закладка не определена.
ГЛАВА 4 СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПГА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ГЛИЦЕРИНЕ	Ошибка! Закладка не определена.

4.1. Молекулярная масса полученных образцов ПГА.... Ошибка! Закладка не определена.	
4.2 Рентгенограмма полученных образцов ПГАОшибка! Закладка не определена.	
4.3 Термограмма полученных образцов ПГАОшибка! Закладка не определена.	
Выводы	26
Список источников	28

ВВЕДЕНИЕ

XXI век – это не только век высоких технологий, но и глобальных экологических проблем. Одной из них является проблема загрязнения окружающей среды различными пластиками и полиэтиленовыми пакетами.

Современная биотехнология позволяет получать широкий спектр целевых продуктов различной природы, включая новые экологически чистые биоматериалы с высокими потребительскими свойствами [4]. Биополимеры можно разделить на 3 группы в зависимости от происхождения: природные биополимеры, извлеченные из биомассы (например, агроресурсы), синтетические биополимеры из микробного производства или ферментация (например, полигидроксиалканоаты (РНА)), синтетические биополимеры, обычно химически синтезируются из биомассы (например, PLA). Три группы получены из возобновляемых ресурсов. На сегодняшний день, как было сказано ранее проблема экологии растет и в связи с этим растет актуальность работ по полимерам биологического происхождения. Замена не разрушаемых синтетических полимеров, на бiorазрушаемые, имеет огромное экологическое значение[16].

Полиоксиалканоаты или ПГА линейные сложные полиэфиры, получаемые бактериальной ферментацией из сахара или липидов. Они производятся бактериями для хранения углерода и энергии. Более 150 различных мономеров могут быть объединены в этом семействе, чтобы получить материалы с совершенно разными свойствами. В 1925 году, Лемуань обнаружил и впервые описал ПГА, который производила культура *Bacillus*, но на сегодняшний день список микроорганизмов, способных аккумулировать ПГА, насчитывает свыше 300 представителей.

Сфера применения полимеров потенциально широки и включают восстановительную хирургию, клеточную и тканевую инженерию, трансплантологию, фармакологию, а также легкую и пищевую

промышленность, коммунальное и сельское хозяйство и др. С конца 1980-начала 1990-х годов ПГА интенсивно исследуются во всех развитых странах.

Существуют потенциальные возможности применения ПГА, вырабатываемых микроорганизмами, в медицинской и фармацевтической промышленности, в первую очередь из-за их биоразлагаемости. Однако их коммерческое использование ограничено их высокой себестоимостью относительно других полимерных материалов. Поэтому на сегодняшний день одной из главных задач в исследовании ПГА является поиск дешевых субстратов, высокопроизводительных штаммов-продуцентов, а также удешевление технологии получения данного класса биополимеров.

Благодаря своей низкой цене относительно других субстратов, глицерин является перспективным источником для микробного производства ПГА. В связи с увеличением производства глицерина из-за растущего производства биодизеля, цены на глицерин стали достаточно низкими, чтобы использовать это остаточное соединение в качестве «дешевого источника углерода» для биосинтеза микробных полиэфиров [5].

Цель работы: Исследование процесса синтеза полигидроксиалканоатов (ПГА) *Cupriavidus* *Eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки.

Задачи:

1. Изучить синтез ПГА *C.eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки в колбах, определить субстратную константу (K_s) и константу ингибирования (K_i)
2. Масштабирование процесса синтеза ПГА *C.eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки в 12 л ферментёре BioFlo 115;
3. Изучить физико-химические свойства полученных образцов полимеров.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биотехнологический потенциал полигидроксиалканоатов в качестве альтернативы синтетических полимерным материалам

Полигидроксиалканоаты-это линейные полиэфиры, синтезируемые прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста. Совокупность свойств, характерных для ПГА, делает их перспективными для применения в различных сферах - медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и других сферах. [19]

Перспективность ПГА вытекает из весьма существенных преимуществ этого класса природных полимеров:

- ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов)
- Сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водород. содержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина;
- ПГА - это семейство полимеров различной химической структуры, образованных мономерами с длиной С-цепи от C_4 до C_{12} и выше, от высококристаллических жестких термопластов до конструкционных эластомеров.
- Свойствами ПГА (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру.

- ПГА подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами.
- Высокая биосовместимость ПГА, в частности поли-3-тидроксибутират, связана с тем, что мономеры, образующие этот полимергидроксимасляная кислота — это естественный метаболит клеток и тканей организмов.

С этими полимерами связаны большие надежды, так как, помимо термопластичности, аналогично полипропилену и полиэтилену, ПГА обладают антиоксидантными и оптическими свойствами, и характеризуются высокой биосовместимостью и разрушаемостью в биологических средах.[20]

1.2 Культивирование микроорганизмов

Цель любой биотехнологии – на базе понимания биохимических и физиологических процессов штамма, максимально обеспечить накопление в питательной среде конечного целевого продукта [5]. Микробиологические манипуляции с биологическим агентом и питательной средой осуществляются в соответствии с конкретным биотехнологическим процессом. Основные технологические операции при этом можно систематизировать в виде уровней обеспечения параметров культивирования микроорганизмов и управления процессом метаболизма созданной биотехнологической системы путем контролирующих операций[6]. Таким образом, биотехнологическое управление процесса метаболизма в микробной популяции при широкомасштабном производстве таких продуктов как антибиотики, витамины, аминокислоты, гормоны, противоопухолевые агенты и многие другие на этапе получения биомассы должно быть направлено на обеспечение оптимальных условий для роста и размножения конкретного микроорганизма [7]. При всем разнообразии микробиологических подходов, способов и биотехнологических решений,

эффективность биопроизводства на этапе промышленного получения биомассы или продуктов метаболизма микроорганизмов в современных условиях в основном зависит:

- 1) от оптимальности питательной среды для роста микроорганизмов и производственного контроля над изменениями.
- 2) от оптимальности параметров внешней среды абиотических факторов контроля за их изменением.
- 3) от правильности выбора вида (конструкции) биореактора и варианта культивирования микробов, обеспечивающих максимальность накопления биомассы в питательной среде [8,9].

Культивирование микроорганизмов можно проводить поверхностным или глубинным, периодическим или непрерывным методами, в аэробных или анаэробных условиях.

При поверхностном культивировании микроорганизмы развиваются на поверхности питательной среды. Среды могут быть плотными, сыпучими или представлять собой тонкий слой жидкой среды[10]. Практически метод применим только для культивирования аэробных микроорганизмов. В этом случае микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха. Важным условием реализации метода является большая площадь соприкосновения поверхности питательной среды с окружающим воздухом. В жидких средах аэробные микроорганизмы часто растут, образуя на поверхности пленку[11]. Поверхностное культивирование микроорганизмов используют в основном, в лабораторной практике в научных исследованиях и в музеях чистых культур[4,11].

Глубинное культивирование. Глубинный метод культивирования является более совершенным по сравнению с поверхностным. Микроорганизмы растут и развиваются во всем объеме питательной среды, а не только на ее поверхности. Осуществляют его, применяя жидкие питательные среды. Метод можно использовать как при культивировании аэробов, так и анаэробов. Этот способ также используется в лабораторных

исследованиях, но особенно широкое применение он нашел в промышленной микробиологии, где его применяют при получении микробной биомассы, в производстве антибиотиков, ферментов, витаминов, кислот. В промышленных масштабах глубинное культивирование осуществляют в специальных аппаратах – ферментаторах [12,13].

1.3 Синтез ПГА

Процесс получения ПГА заключается в культивировании микроорганизмов при постоянной аэрации стерильным воздухом и специальном перемешивании, при избытке углеродного субстрата в среде и несбалансированном росте, когда некоторые элементы, такие как источник азота, становятся ограниченным [15].

Бактерии, используемые для производства ПГА, можно разделить на два группы на основе условий их культуры. Первая группа требует ограничение необходимых питательных веществ, таких как N, P, Mg, K, O или S, и избыток источника углерода; некоторые из этих бактериальных штаммов - *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas extorquens* и *Pseudomonas oleovorans*. Во второй группе ограничение питательных веществ не требуется, и полимер может накапливаться во время фазы роста [14]; некоторые примеры *Escherichia coli* рекомбинантный, *Azotobacter vinelandii* рекомбинантный, и *Alcaligenes latus*. Штаммы-продуценты РНВ, которые используют глицерин в качестве источника углерода перечислены в первой группе.

Ферментации может быть выполнена в разных режимах работы. Наиболее часто применяется двухэтапный метод культивирования, на первой стадии бактериальные клетки выращивают до тех пор, пока не будет достигнута предварительно определенная концентрация массы клеток без ограничения питательных веществ. Затем клетки переводятся на среду второй стадии с предельными питательными веществами и углеродными

субстратами, для получения ПГА. Во время этой стадии ограничения питательных веществ, клетки не могут размножаться и остаются почти постоянными. Однако клетки начинают увеличиваться по размеру и весу из-за внутриклеточного накопления ПГА в качестве продукта хранения[16,17].

Не смотря на наличие других фаз в процессе культивирования, вторая фаза –является самой существенной для процесса, так как в это время источник углерода конвертируется в субстраты, необходимые для синтеза ПГА. Не смотря на большое разнообразие микроорганизмов многие бактерии способны превращать КоA последовательно в ацетоацил КоA и далее – в D(-)-3-гидроксибутирил-КоА, дающий начало полигидроксибутирату.

Для промышленного производства ПГА используют штаммы, которые могут достигать высокой конечной плотности клеток в относительно короткий период времени и производить высокое содержание ПГА из простых, недорогих субстратов.

В зависимости от числа атомов углерода, присутствующих в мономерных звеньях, ПГА могут быть классифицированы на три основных типа:

1. Короткоцепочечные ПГА, содержат 3-5 атомов углерода. Наиболее известные представителями этого класса - поли (3-гидроксибутират) (ПГБ), и его сополимеры с гидроксивалератом. Полигидроксибутират является гомополимером D(-)-3-β-оксимасляной кислоты и представляет собой изотактический полиэфир (Волова Т.Г. с соавт, 2003). Из всех ПГА, ПГБ наиболее часто встречается в природе (Koning G, 1995). Это самый простой ПГА по отношению к химической структуре, имеющий метиленовую группу (-CH₃). В состав полимера входят углерод (81%), водород (7,03%) и кислород (37,16 %).

2. Со средней длиной цепи ПГА, содержат 6-14 атомов углерода. Для синтеза средней длины цепи в качестве продуцента специально используют псевдомонад, а в качестве субстрата алифатические углеводороды, такие как

н-алканы, н-алканоата, или н-алканола (de Smet MJ, 1983, Lageveen RG, 1988 , Gross RA, 1989, Preusting H, 1990, Brandl H, 1988, Haywood GW 1989).

3. Длинноцепочечные, содержат в себе 17-18 атомов углерода.

Свойство гибкости может быть изменено путем изменения длины цепи атомов углерода (Вугом D., 1987). Помимо числа атомов углерода, ПГА могут также быть классифицированы на основе типа мономерных звеньев. ПГА, содержащие один тип мономерного звена, называются гомополимеры, такие как поли-(3-гидроксибутират) или ПЗГБ, поли-(3-гидроксигексаноат) и поли-(3-гидроксиоктаноат), тогда как ПГА, содержащие более чем один тип мономера устройства называются гетерополимерами такие как поли-(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат). (Rooja Basnet, 2014).

1.4 Производство полигидроксиалканоатов на глицериноподобных субстратах и оценка эффективности различных штаммов

Биосинтез продуктов с высокой добавленной стоимостью является одним из наиболее перспективных видов использования глицерина для биотехнологической конверсии. Как правило, сырой глицерин получаемый в ходе производства биодизельного топлива, содержит от 78 до 86% основного вещества, и может содержать в своем составе различные примеси в виде хлоридов, воды, органических примесей, золы, свободных жирных кислот и других. Глицерин является перспективным субстратом для биотехнологии. Прежде всего, это связано с увеличением производства биодизельного топлива в мире, в результате которого, глицерин образуется в качестве побочного продукта. Начиная с 2005–2008 годов, биодизель стал практически лидером среди основных секторов-поставщиков глицерина на мировой арене. На сегодняшний день глицерин как субстрат может, использовался для производства ПГА в качестве дешевого, единственного

источника углерода и энергии при ограниченном количестве азота [21]. Кроме того, глицерин рассматривается как благоприятный субстрат для производства ПГА, так как атомы углерода в глицерине находятся в сильно восстановленном состоянии по сравнению с другими углеводами, стимулируя тем самым внутриклеточный синтез полимера в бактериях[22]. Микроорганизмов, способных аккумулировать полигидроксиалканоаты, достаточно много, однако. В качестве критериев для выбора потенциального продуцента поли-гидроксиалканоатов принято рассматривать следующие показатели: химический состав, выход полимера, затраты углеродного субстрата, концентрацию биомассы клеток в культуре, продуктивность процесса.

Таблица 1. Синтез ПГА на глицерине с использованием различных штаммов.

Штамм, глицерин	Место культивирования	CDW (г / л)	PHA (% CDW.)	PHA (г / л)	Ссылка
<i>P. putida</i> KT2440	Колба	4,23 ± 0,11	34,5±2	1,46 ± 0,21	[30]
<i>P. putida</i> KT2442	Колба	3,45 ± 0,07	26,5±4	0,91 ± 0,13	[30]
<i>P. putida</i> F1	Колба	3,50 ± 0,14	10,3±2	0,36 ± 0,01	[30]
<i>P. putida</i> S12	Колба	3,20 ± 0,07	12,6±5	0,40 ± 0,05	[30]
KT2440 (46 часов)	Колба	0,80 ± 0,04	19 ± 2	0,15 ± 0,02	[31]
KT40GlpR (22 часа)	Колба	0,87 ± 0,01	21 ± 4	0,18 ± 0,03	[31]
KT40GlpR (46 часов)	Колба	1,01 ± 0,03	34 ± 6	0,34 ± 0,05	[31]
KT2440 (22 часа)	Колба	0,56 ±	4 ± 5	0,02 ± 0,05	[31]

		0,09			
<i>KT2440</i> (46 часов)	Колба	1,02 ± 0,10	25 ± 6	0,26 ± 0,06	[31]
<i>KT40GlpR</i> (22 часа)	Колба	0,89 ± 0,10	31 ± 4	0,28 ± 0,01	[31]
<i>KT40GlpR</i> (46 часов)	Колба	1,22 ± 0,03	39 ± 5	0,47 ± 0,06	[31]
<i>Aeromonas</i> sp. AC_01					
Чистый глицерин	Колба	1,69 ± 0,04	7,8 ± 0,09		[33]
Сырой глицерин	Колба	2,02 ± 0,11	4,4 ± 0,54		
<i>Aeromonas</i> sp. AC_02					
Чистый глицерин	Колба	1,48 ± 0,04	5,0 ± 0,13		[33]
Сырой глицерин	Колба	1,41 ± 0,12	6,5 ± 0,63		
<i>Aeromonas</i> sp. AC_03					
Чистый глицерин	Колба	1,20 ± 0,05	3,6 ± 0,09		[33]
Сырой глицерин	Колба	1,27 ± 0,03	9,2 ± 0,49		
<i>Zobellella taiwanensis</i> <i>Azu-IN1</i> Неочищенный 1% глицерин	250 мл колба		49.76 %	2.30 г/л	[35]
<i>Pseudomonas Corrugata</i> 388 Неочищенный 1% глицерин	2 л колба		28,0%	0.88 г/л	[34]
<i>Pseudomonas</i>	2 л колба		16%	0.75 г / л	[34]

<i>Corrugata</i> 388 <i>Очищенный</i> <i>1% глицерин</i>				
<i>Pandoraea</i> sp. <i>MA03</i> <i>Неочищенный</i> <i>2% глицерин</i>	250мл колба	63,6%	2,9 г/л	[36]
<i>Pandoraea</i> sp. <i>MA03</i> <i>Очищенный</i> <i>5% глицерин</i>	250 мл колба	43,4%	2,21 г/л	[36]
<i>Zobellella</i> <i>denitrificans</i> <i>MW1</i> <i>Неочищенный</i> <i>1% глицерин</i>	42л ферментер	66,9 %	1.090 г/л	[37]
<i>Cupriavidus</i> <i>necator</i> <i>DSM</i> <i>545</i> <i>Неочищенный</i> <i>1% глицерин</i>	7,5л биореактор	64.55 %	4.25 г/л	[38]
<i>Methylobacteri</i> <i>um</i> <i>rhodesianum</i> <i>MB-126</i> <i>Неочищенный</i> <i>5% глицерин</i>	2.5л биореактор	50 %	0.223 г/л	[39]
<i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i> <i>DSM</i> <i>11348</i> <i>Неочищенный</i> <i>5% глицерин</i>	2.5л биореактор	42 %	0.254 г/л	[39]

Установлено, что штаммы, выделенные из активного ила на муниципальной установке очистки сточных вод, способны синтезировать полигидроксиалканоаты (РНА) с использованием чистого и неочищенного глицерина. Некоторые штаммы *Aeromonas* spp., демонстрируют преимущества по сравнению с другими бактериями благодаря их устойчивому росту и простым требованиям роста, которые делают их привлекательными мишенями для потенциального производства ПГА. В

случае с *Aeromonas sp. AC1,2,3* были способны использовать чистый и неочищенный глицерин. Самая низкая биомасса была для AC_02, самая высокая биомасса была для AC_03, выращенного на неочищенном глицерине.

В данной таблице приведены характеристики использования очищенного и загрязнённого глицерина. Использование очищенного глицерина для получения ПГА является самым продуктивным, отсутствие примесей натрий хлора (NaCl), увеличивают накопление и конечный вывод ПГА. Однако очистка сырого глицерина довольно трудный и затратный процесс, поэтому, во избежание издержек производства, более перспективным источником углерода является сырой глицерин для получения ПГА [5]. Присутствие NaCl оказывают негативное воздействие на производства ПГА, однако в случае с штаммом *Zobellella denitrificans MW1* характеризовалась получением больших количеств ПГА из глицерина с повышенным ростом и продуктивностью полимера в присутствии NaCl. Отрицательный эффект субстратов, содержащих NaCl можно было бы уменьшить путем смешивания с загрязненным K₂SO₄ глицерином. Различные концентрации солей, накопленные при культивировании могут не только ингибировать синтез ПГБ, но и сам рост биомассы [14,37].

Не смотря на широкий список потенциального использования ПГА в различных сферах, так же с ежегодно расширяющимся списком природных штаммов продуцентов ПГА, идут активные работы по усовершенствованию и улучшению качества и количества произведенного ПГА как на глицериноподобных субстратах, так и на различных других. Это определило направленность настоящей работы, ориентированной на изучение возможности продуктивного синтеза ПГА при использовании глицерина в качестве источника углерода в микробном синтезе ПГА.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В работе исследовался штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646, который характеризуется по эффективности синтеза многокомпонентных ПГА, так же вид обладает широким органотрофным потенциалом.

Культурально-морфологические особенности штамма: грамотрицателен, клетки-палочки. Слабо подвижен. Оптимум роста 30-31°C, pH 6,7-7,2.

Ростовые характеристики: штамм растет на минеральной среде с сахарами или органическими кислотами, а также в атмосфере водорода, двуокиси углерода и кислорода, специфических факторов роста и органических добавок не требуется. Границы физиологического действия pH в диапазоне 4,4-8,6, штамм сохраняет способность к росту в диапазоне температур 20-41°C

2.2 Среда для культивирования бактерий

За основу принята среда Шлегеля [Schlegel et al., 1961], представляющая собой фосфатный буфер следующего состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; NH_4Cl – 1,0 (г/л). В качестве источника железа использовали раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который добавляли из расчета 5 мл/л. Микроэлементы добавляли в среду по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 0,228; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NiCl_2 – 0,008 (г/л). В качестве источника азота использовали мочевину.

В качестве моноуглеродного С-субстрата при синтезе гомополимера 3-гидроксималаяной кислоты использовали глицерин при его стартовой концентрации в среде 10-15 г/л и текущей концентрации в культуре не ниже 5 г/л.

Для исследований в качестве основного С-субстрата использовали глицерин различного происхождения и различной степени чистоты:

глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция), содержание основного вещества 99,3%, сульфаты < 0,0005%, хлориды < 0,0001%, аммонийные соли < 0,0005%, железа < 0,00005%, мышьяка < 0,00004%, свинца < 0,00005%, эфиры жирных кислот и жирные кислоты < 0,025%;

глицерин-II («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия), содержание основного вещества 82,07%, хлориды 4,35%, органические примеси 1,38%, вода 9,88%, зольность 6,59%, метанол 0,13%.

2.3 Техника и методы культивирования микроорганизмов

Бактерии выращивали в периодическом режиме. Культивирование проводили в стеклянных колбах объемом 1 и 2 литра, с заполнением 50% с использованием терmostатируемых шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova® серии 44» «New Brunswick Scientific» (США) (Рисунок 2.1).



Рисунок 1. - Фото шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova 44 для культивирования бактерий в колбах.

Бактерии культивировали, соблюдая условия, разработанные для биосинтеза ПГА [Волова, 1992]. Для инокулята в качестве посевного материала использовали музейные культуры штаммов хемоорганотрофных водородоокисляющих бактерий, которые хранятся на агаризованной среде Шлегеля при температуре 5 °С. Инокулят получали в строго стерильных условиях ресуспендионением музейной культуры.

Бактерии культивировали на солевой среде Шлегеля при pH 7,0, при стартовой концентрации глицерина 10-15 г/л и температуре среды 30 °С с лимитированием роста бактерий по азоту – фактор, стимулирующий суперпродукцию ПГА. Применили периодический двустадийный процесс. На первом этапе (10-20 ч) использовали среду с уменьшенным в два раза от физиологической потребности бактерий содержанием азота, составляющим 120 мг/г биомассы клеток при оптимальных условиях роста. В качестве азота использовали карбамид. На втором этапе (20-30 ч) процесс продолжали при тех же параметрах, но в безазотной среде. В высокоплотных ферментационных культурах подачу концентрированных растворов С-субстрата и минеральных элементов в культуру осуществляли с помощью перистальтических насосов-дозаторов.

2.4 Методы контроля параметров процесса культивирования бактерий в режиме синтеза ПГА и определение кинетических и производственных характеристик

В процессе культивирования бактерий каждые 4 - 6 ч отбирали пробу и на фотоэлектрокалориметре UNICO 2100 (США) определяли оптическую плотность культуры. Для тестирования разводили пробу дистиллированной

водой в пропорции 1:5, измерения проводили при длине волны $\lambda = 440$ нм в кюветах 1 мм. Концентрацию клеток X, г/л оценивали весовым способом. Метод заключается в следующем: культуру с определённым объемом откручивали на центрифуге при 6000 об/мин в течении 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок клеток дважды отмывали ресуспендируя клетки в свежем объёме дистиллированной воды и собирая центрифугированием при указанных условиях для удаления остатков питательной среды. Отмытые клетки переносили в бюксы и высушивали при температуре 105 °C в течение суток до постоянного веса. После охлаждения в эксикаторе пробы взвешивали. Вес бактериальной биомассы вычисляли из разницы между весом бюкса с высушенными клетками и исходным весом бюкса.

Концентрацию глицерина определяли методом, основанным на окислении глицерина периодатом натрия в сернокислом растворе до формальдегида и определении колориметрическим методом с хромотроповой кислотой [Nakamura et al., 2016]. Метод определения состоит из следующих стадий: 2 мл культуры центрифицируют в течении 2 мин при 6000 об/мин; затем 20 мкл супернатанта переносят в пробирку и добавляют 10 мл воды; далее 2 мл подготовленной пробы переносят в чистую пробирку, в контрольную пробирку добавляют 2 мл воды; в обе пробирки добавляют 0,1 мл H₂SO₄ 10н и 0,5 мл NaIO₄ 0,1M; выдерживают 5 минут и добавляют 0,5 мл NaHSO₃; 1 мл разведений переносят в пробирку с притертый шлифом добавляют 5 мл хромотроповой кислоты, закрывают стеклянными крышками и нагревают на кипящей водяной бане в течении 30 мин; далее пробирки охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность на фотоэлектрокалориметре UNICO 2100 в кюветах с длиной оптического пути 5 мм при $\lambda = 570$ нм. Концентрацию глицерина определяют по предварительно подготовленному калибровочному графику.

Содержание в культуральной среде аммонийного азота оценивали одним методом. Качественный метод – дистиллиированную воду объёмом 10 мл смешивали с 1 мл супернатанта, затем добавляли каплю 33 %-ного

раствора KOH, далее добавляли реагент Несслера объёмом 0,5 мл. В результате качественной реакции раствор в зависимости от содержания азота изменял свою окраску. Визуально сравнивали окраску раствора с окраской стандартов (следы, №1, №2, №3).

В экспериментах оценивали следующие характеристики процесса биосинтеза полимера. Регистрировали урожай биомассы клеток в культуре (X , г/л), выход ПГА (г/л и в % от веса абсолютного сухого вещества клеток). Границы физиологического действия глицерина в культуре, кинетические константы по глицерину (K_s и K_i); удельные скорости роста бактерий и синтеза ПГА (μ , ч⁻¹), продуктивность процесса биосинтеза по биомассе и полимеру (P , г/л·ч), экономический коэффициент (Y , г/г) находили общепринятыми методами.

Удельную скорость роста культуры (μ , ч⁻¹) определяли по уравнению

$$\mu = \ln\left(\frac{x_k}{x_n}\right)/\Delta\tau, \quad (2.1)$$

где:

x_n, x_k – начальная и конечная концентрация бактерий кг/м³;

τ – время культивирования, ч.

Удельную скорость синтеза полимера (μ_β , ч⁻¹) определяли по формуле:

$$\mu_\beta = \ln\left(\frac{\PiGA_k}{\PiGA_n}\right)/\Delta\tau, \quad (2.2)$$

где:

\PiGA_n, \PiGA_k – начальная и конечная концентрация полимера в клетках, кг/м³.

Продуктивность процесса по биомассе (P_x) и полимеру ($P_{ПГА}$), кг/л·ч находили, используя:

$$P = X/T, \quad (2.3)$$

где :

X – концентрация биомассы, г/л;

P – продуктивность г/л*ч;

T – время затраченное на процесс, ч.

Экономический коэффициент культуры по продукту Y , кг/кг рассчитывали по формуле:

$$Y = m_x / m_c, \quad (2.4)$$

где:

m_c – масса субстрата, затраченного на получение продукта, кг;

m_x – масса продукта (X , полимер), кг.

Экономический коэффициент культуры субстрату Y , г/г рассчитывали по формуле:

$$Y = \frac{x_k - x_h}{C_k - C_h}, \quad (2.5)$$

где:

x_h , - начальная концентрация бактерий, г/л;

x_k – конечная концентрация бактерий, г/л;

C_k – конечное содержание используемого субстрата, г/л;

C_h – начальное содержание используемого субстрата, г/л.

Скорость утилизации компонентов субстрата культурой q , кг/(кг·ч) определяли по формуле:

$$q = \frac{G_e}{x \cdot V}, \quad (2.6)$$

где G_e – расход потребляемого субстрата, кг/ч;

x – концентрация бактерий, кг/м³.

V – рабочий объем аппарата, м³.

2.5 Микробиологические контроль процесса

Микробиологический контроль стадий технологического процесса проводили согласно ГОСТ ИСО 14644-1-2002 - Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды.

Исследования включали:

- микробиологический контроль стерильности внутренних полостей ферментационных установок проводили после стерилизации оборудования;
- микробиологический контроль технологического воздуха, подаваемого в ферментационную линию, проводили методом, основанном на принципе ударного воздействия струи воздуха из линии на поверхность чашек Петри с питательной средой;
- микробиологический контроль питательных сред, поступающих в ферментер;
- контроль чистоты бактериальной культуры проводили высеиванием и микроскопией проб на пептонный агар (20 г агара, 10 г пептона, 5 мл 2,5% NaCl на 1 л дистиллированной воды). Разведения проводили стандартным методом [Егоров, 1976] из разведений 10⁷, 10⁸; культивировали в термостате *Binder (USA)* при температуре 30 °C;

2.6 Методы исследования химического состава и свойств ПГА

Экстракцию ПГА из клеточной биомассы, которую предварительно сгущали на ультрафильтрационной установке АСФ20 (Владисарт,Россия) до

500г/л и далее высушивали в лиофильной сушилке LP10R (ilShinBioBase, Корея) до остаточной влажности 5%, проводили в блоке экстракции. Экстракцию осуществляли в две стадии: на первой стадии обезжиривали биомассу этиловым спиртом, на второй экстрагировали полимер метиленом хлористым. После этого раствор полимера фильтровали от клеточных стенок и осаждали полимер этанолом.

Состав высокоочищенных образцов ПГА, определяли методом хроматографии заранее полученных метиловых эфиров жирных кислот на хромато-масс-спектрометре GC–MS 7890/5975C (Agilent Technologies, США) и ^1H ЯМР спектроскопией растворов ПГА в CDCl_3 на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 600 (Германия, 600.13 МГц; Красноярский региональный центр коллективного пользования СО РАН).

Физико-химические свойства полимеров определяли, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию, рентгеноструктурный анализ и дифференциальную сканирующую калориметрию.

Молекулярную массу ПГА определяли с применением системы гельпроникающей хроматографии Agilent 1200 (США) с набором полистироловых стандартов «Sigma». Значение средней числовой молекулярной массы образцов рассчитывали по формуле:

$$M_n = \sum (N_i \cdot M_i / N), \quad (2.7)$$

где:

N_i — количество молекул массы I ;

N — общее количество молекул;

M_i — масса молекул длины I .

Среднюю весовую молекулярную массу образцов определяли по формуле:

$$M_w = \sum (w_i \cdot M_i), \quad (2.8)$$

где:

w_i – доля массы ($w_i = N_i \cdot M_i / \Sigma (N_i \cdot M_i)$).

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различными размерами молекул, вычисляли из соотношения:

$$P_D = M_w / M_z. \quad (2.9)$$

где:

M_w – средневесовая молекулярная масса, г/моль;

M_n – среднечисловая молекулярная масса, г/моль.

Для изучения физико-химических свойств ПГА были использованы образцы полимера в виде порошков. Термический анализ проводили с применением дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария). Образцы навеской 4 мг в алюминиевых тиглях нагревали до 200°C, затем охлаждали до - 20°C, выдерживали в течении 20 минут, затем снова нагревали до 320°C. С помощью программного обеспечения «StarE» по пикам на термограммах определяли температуру стеклования, кристаллизации, плавления и термической деградации.

Степень кристалличности образцов определяли на порошковом дифрактометре D8ADVANCE (Bruker AXS, Германия) с линейным детектором VANTEC. Для этого в непрерывном режиме сняты рентгенограммы с пошаговым запоминанием накопленной за 114 с интенсивностью (шаг 0,016° по 2θ), интервал сканирования от 5° до 60° по 2θ. В промежутке от 48° до 60° наблюдался только равномерно поникающийся фон. В процессе измерений образцы врашивались вокруг перпендикуляра к поверхности. Степень кристалличности определяли как величину отношения площади под рентгенограммой с вычтеным аморфным

фоном к площади без вычитания фона. Для вычислений использована программа Eva из программного приложения к дифрактометру.

2.7 Статистические методы обработки результатов

Определяли средние значения результатов; рассчитывали отклонения от среднего значения для каждого результата; дисперсию, стандартное отклонение отдельного результата и стандартное отклонение среднего результата. Достоверность полученных результатов определяли по критерию Стьюдента при избранной доверительной вероятности $\alpha = 0.95$. Рассчитывали ошибку полученного среднего результата (степень адекватности). Устанавливали интервал, в котором с доверительной вероятностью α находится средний результат. Затем рассчитывали относительную ошибку. Полученные результаты проверяли по одному из вышеописанных способов (по критериям максимального отклонения, Стьюдента) на наличие грубых ошибок. После исключения грубых ошибок производили повторную обработку результатов.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изъято 15 страниц.

Выводы

1. Были исследованы ростовые характеристики *C. eutrophus* B10646 при использовании глицерина различной степени очистки, установленно, что рост бактерий возможен при изменение концентрации глицерина в среде в широких пределах от 1 до 60 г/л, а присутствие различных примесей в составе глицерина значительно не влияет на удельную скорость роста и синтез полимера. В результате графоаналитического метода Лайнуивера-Берка субстратная константа (K_s) и константа ингибирования (K_i) для глицерина I,II составили, не менее 0,30 г/л и 55 г/л.
2. Результаты масштабирования синтеза ПГА *C. eutrophus* B10646 в 12 литровом ферментере показали, что используемый штамм способен расти и синтезировать полимер на глицерине различной степени очистки. При масштабировании примеси содержащиеся в глицерине не оказывают ингибирующего воздействия. Урожай биомассы составил 60 г/л, а содержание полимера не менее 70 %.
3. Полимер, синтезируемый адаптированной к глицерину продуктивной культурой *C. eutrophus* B10646 имел близкие значения показателей M_q , M_b , D, C_x , $T_{стекл}$, $T_{крист}$, $T_{пл}$, $T_{дегр}$ однако при использовании неочищенного глицерина значения M_q и M_b были несколько ниже. Так же наблюдалось снижение степени кристалличности (C_x) до 50-55%, по сравнению с ПГА синтезированными на глюкозе.

Список источников

1. Sébastien B.L., Abbadiea A.A. Городская экология, заинтересованные стороны и будущее экологии. *Science of The Total Environment Volume 667, 1 June 2019, Pages 475-484.*
2. Allan K.N. Экология, Микробиология. Справочный модуль в науках о жизни 2019, Энциклопедия микробиологии, 2009, стр. 91-106.
3. Урусова В. В. Научно-исследовательская работа Пластиковый мусор глобальная проблема современности.
4. E. A. Dawes. Возникновение, метаболизм, метаболическая роль и промышленные применения бактериальных полигидроксиалканоатов, *Microbiol. Rev.* 1990 с. 450 – 472.
5. A. Anjum, M. Zuber, KM Zia. Микробное производство полигидроксиалканоатов (PHAs) и его сополимеров: обзор последних достижений *Int. J. Biol. Macromol.*, 89 (2016), с. 161 – 174.
6. Денис П. Обзор безопасности и надежности для обрабатывающей промышленности Глава 3 - Цель и описание РНА 2012 , страницы 7-12.
7. Sathianachiyar S., Devaraj A. Производство биополимеров бактериальными видами с использованием глицерина, продукта биодизеля. Международный журнал научно-исследовательских публикаций. 2013; 3 (8): 1-5.
8. Джеймса М., Кломбурга Р. Г. *Trends in Biotechnology*. Анаэробная ферментация глицерина: платформа для возобновляемых видов топлива и химикатов. Том 31, номер 1 , январь 2013 года , страницы 20-28.
9. Дорота С., Катаржина Л., и Владзимеж Г. *Ann Microbiol.* . 2014; 64. Примеси неочищенного глицерина и их влияние на выработку метаболитов.
10. Н.С. Panikov. Кинетика микробных процессов. Справочный модуль по системам Земли и наукам об окружающей среде 2016, относится к Энциклопедия почв в окружающей среде, 2005, стр. 463-479.
11. Дэвида П., Кларка Н. Биотехнология (второе издание). Глава 1 - Основы биотехнологии. 2016 , страницы 1-31
12. Мохаммад Х.А., Ибрагими А.Ш. Получение поли (3-гидроксибутират) из глицерина с помощью *Zobellella*. 2009 г. августа
13. Susann M., Hauke H., Thomas B. Текущее мнение в области биотехнологий. Происхождение и анализ микробной гетерогенности

популяции в биопроцессах. Том 21, выпуск 1 , февраль 2010 года, страницы 100-113.

14. Wijnand R., Процесс ферментации на основе глицерина. 04/13/2017 .
15. Серафим Л.С., Лемос ПК, Альбукерке МГЭ, Рейс МАМ. Стратегии производства ПГА смешанными культурами и возобновляемыми отходами. Прикладная микробиология и биотехнология. 2008; 81 (4), 615-628.
16. Г. Г. ФРИМАН, М. С. ДОНАЛЬД. Процессы ферментации, ведущие к глицерину. Влияние некоторых переменных на образование глицерина в Присутствие сульфитов. 28 июня 1956 г.
17. Гонсалес, Рамон (Хьюстон, Техас, США). Анаэробная ферментация глицерина. 12/18/2012.
18. Iwona K., Iza R., Michał K., Grażyna A. Синтез и структурная характеристика биоактивных олигомеров РНА и γ -PGA для потенциальных применений в качестве системы доставки. : 25 апреля 2016.
19. Волова Т.Г., Шишатская Е.И., Синский А.Ю. (2013). Деградируемые полимеры: производство, свойства и применение: Nova Sci Publ. 3.
20. Т.Г. Волова, Е.Н. Афанасова, Е.С. Задереева. Экологическая Биотехнология . 2014. Стр 179.
21. Ф. Ян , М. А. Ханна , Р. Сун.Использование добавленной стоимости для сырого глицерина - побочного продукта производства биодизеля Biotechnol. Биотопливо , 5 (2012) , с. 13.
22. С. HermannKrauss, M. Koller, A. Muhr, H. Fasl, F. Stelzer, G. Brauneegg.Производство археальных сополимеров и терполиэфиров полигидроксиалканоата (РНА) из побочных продуктов биодизельного производства. Archaea, 2013 (2013), стр. 1 – 10.
23. С.П. Мохандас, Л. Балан, Н. Лекшми, С.С. Кубелио, Р. Филип, И.С. Брайт Сингх. Производство и характеристика полигидроксибутират из Vibrio harveyi MCCB 284 с использованием глицерина в качестве источника углерода. J. Appl. Microbiol. (2016).
24. М. Коллер, И. Гассер, Ф. Шмид, Г. Берг. Связь экологии с экономикой: взгляд на полигидроксиалканоат-продуцирующие микроорганизмы. Eng. Life Sci. , 11 (2011) , с. 222 – 237.
25. М. Хигuchi-Такеучи, К. Морисаки, К. Тойока, К. Нумата. Синтез высокомолекулярных полигидроксиалканоатов морскими фотосинтетическими пурпурными бактериями PLoS One, 11 (2016).

26. D. Moorkoth, KM Nampoothiri. Получение и характеристика поли (3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV) новым галотолерантным изолятом мангровых деревьев Bioresour. Technol. , 201 (2016), с. 253 – 260.
27. Д. Тан, Ю.С. Сюэ, Г. Айбайдула, Г.-К. Чен. Нестерильное и непрерывное производство полигидроксибутирата с помощью *Halomonas TD01* Bioresour. Technol. , 102 (2011) , с. 8130 – 8136.
28. C. Porwal, T. Кумар, С. Лал, А. Рани, С. Кумар, С. Чима , НJ Пурохит, Р. Шарма, К. Сингх Пател. Полигидроксибутират производить способности микробов из различных мест обитания темными ферментативный процесс Bioresour. Technol. , 99 (2008) , с. 5444 – 5451.
29. M. Singh, VC Kalia. Способность *Bacillus spp* продуцировать водород и полигидроксибутират . из глюкозы в двухступенчатой системе Indian J. Microbiol. , 51 (2011) , стр. 418 – 423.
30. Игнасио П.-К., Даниэль Б., Рене Э. и Манфред Р. Сравнение синтеза mcl-Poly (3-гидроксиалканоатов) различными штаммами *Pseudomonas putida* из неочищенного глицерина: цитрат накапливается при высоком титре в условиях производства PHA. 23 декабря 2014 г.
31. I. F. Escapa, C. Cerro, J. L. García, M. A. Prieto. Роль GlpR-репрессора в росте *Pseudomonas putida* KT2440 и продукции PHA из глицерина. 31 мая 2012 г.
32. Elodie B., Vera A. A., Patrizia C. Полигидроксиалканоат (PHA): обзор синтеза, характеристик, обработки и потенциальных применений в упаковке. June 2014.
33. Justyna M.-C., Tomasz P. Изучение ограниченности питательных веществ для синтеза полигидроксиалканоатов недавно выделенными штаммами *Aeromonassp.* с использованием производного биодизеля глицерина в качестве субстрата. 23 октября 2018 г.
34. Rosa P., Francesco P., Manuela F., Marco T., Arcangelo D., Antonino F. Catara. Производство полигидроксиалканоатов (ПГА) Путем преобразования глицерина выбранными штаммами *Pseudomonas Mediterranea* и *Pseudomonas Corrugata*. VOL. 27, 2012.
35. Мохамед Али Абдель-Рахман, Саид Эль-Сайед Дезуки, Ферментативное производство полигидроксиалканоатов (ПГА) из Глицерин от *Zobellella taiwanensis* Azu-IN1. Журнал прикладной биологии и биотехнологии Том. 5 (05), стр. 16-25.
36. de Paula FC, Kakazu S., de Paula CBC, Gomez JGC., Contiero J. Производство полигидроксиалканоата из сырого глицерина недавно

выделенным *Pandoraea* sp. Журнал Университета короля Сауда-науки. 2017; 29 (2), 166-173.

37. Ибрагим М.Х., Штейнбюх А. *Zobellella denitrificans* MW1. недавно выделенной бактерии, пригодной для получения поли (3-гидроксибутират) из глицерина. Журнал прикладной микробиологии. 2010; 108 (1): 214-225.

38. Alejandra R.-C., Martin K. Влияние глицерина на получение поли (3-гидроксибутират) на *Cupriavidus necator* и *Burkholderia sacchari*. Журнал биохимической инженерии 94 (2015) 50-57.

39. E.J. Bormann1, M. Roth2. Получение полигидроксибутирата *Methylobacterium rhodesianum* и *Ralstonia eutropha* в средах, содержащих глицерин и казеиновые гидролизаты. Biotechnology Letters 21: 1059-1063, 1999.

40. J.M. Naranjo, JA Posada , JC Higuita , CA Cardona Валоризация глицерина посредством производства биополимеров: случай РНВ с использованием *Bacillus megaterium* Bioresour. Technol. , 133 (2013) , с. 38 – 44.

41. П. Кумар , С. Рэй , СКС Патель , Ж.-К. Lee , VC Kalia Биоконверсия неочищенного глицерина в полигидроксиалканоат с помощью *Bacillus thuringiensis* в условиях неограниченного содержания азота Int. J. Biol. Macromol. , 78 (2015) , с. 9 – 16.

42. С.К. Дипти, П. Бинод, Р. Синду, А. Пандей Медиаинженерия для производства поли- β -гидроксибутирата *Bacillus firmus* NII 0830 J. Sci. Ind. Res. , 70 (2011) , стр. 968 – 975.

43. Sowmya P., Linu B., Jayanath G. Биосинтез и характеристика полигидроксиалканоата из морской *Bacillus cereus* MCCB 281 с использованием глицерина в качестве источника углерода. Том 119 , ноябрь 2018 , страницы 380-392.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологий

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
М. Киселев Т. Г. Волова
« 5 » июне 20 19 г.

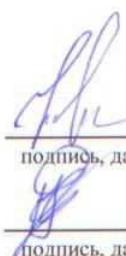
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез полигидроксиалканоатов

бактериями *C. eutrophus B-10646* на глицерине различной степени очистки

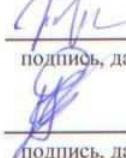
Руководитель


подпись, дата

доцент, к. т. н
должность, учёная степень

Е.Г.Киселев
ициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

М.В.Калинин
ициалы, фамилия

Красноярск 2019