

M16/3

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

Фундаментальной биологии и биотехнологии  
институт  
Базовая кафедра биотехнологии  
кафедра

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

подпись \_\_\_\_\_ инициалы, фамилия  
«20» июня 2016 г.

### МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование способов экстракции полигидроксиалканоатов в условиях  
опытного производства

тема

06.04.01 Биология

код и наименование направления

020400.68 – 01 Микробиология и биотехнология

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель


  
21.06.16г.

доцент, к.т.н.

С.В. Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник

  
21.06.16

подпись, дата должность, ученая степень

Ю.Ю. Комаровский

инициалы, фамилия

Рецензент

  
21.06.16

доцент, к.т.н.

В.А. Кожухов

инициалы, фамилия

Красноярск 2016

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Исследование способов экстракции полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства» содержит 61 страницу текстового документа, 24 иллюстрации, 7 таблиц, 53 использованных источника.

Ключевые слова: экстракция, полигидроксиалканоаты, полимер, биомасса бактерий, детергенты, *Cupriavidus eutrophus*, хроматография.

Цель работы: исследовать использование поверхностно-активных веществ и органических растворителей в процессе экстракции биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 для определения эффективной схемы получения полимера с минимальным содержанием примесей.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Определить эффективность использования детергентов (додецилсульфата натрия и полиоксиэтилен-20-цетилового эфира) для экстракции биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646;

2. Провести дополнительные исследования процесса экстракции в части использования различных органических растворителей для повышения чистоты полимера;

3. По результатам проведенных исследований предложить схему экстракции, позволяющую получать полимер с наименьшим содержанием примесей.

Актуальность исследования заключается в низкой эффективности существующих методов экстракции. Поэтому предложен новый способ солюбилизации биомассы бактерий *C. eutrophus* В-10646 поверхностно-активными веществами. Используя детергенты, невозможно добиться высокой чистоты полимера без этапа доочистки реагентами. Экстракция биомассы этанолом позволяет получить полимер высокой чистоты и продукты экстракции (белковый шрот, липиды, жирные кислоты).

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Полигидроксиалканоаты как замена традиционным синтетическим полимерам .....	6
1.2 Характеристика ПГА и способы их выделения из биомассы.....	8
1.2.1 Расщепление микробной оболочки с помощью щелочи и гипохлорита натрия.....	10
1.2.2 Использование сверхкритических флюидов в процессах экстракции биополимера.....	11
1.2.3 Метод селективной флотации.....	12
1.2.4 Использование ферментов для очистки и выделения ПГА.....	13
1.2.5 Использование детергентов для экстракции ПГА.....	14
1.2.6 Экстракция ПГА с помощью органических и неорганических растворителей .....	17
1.3 Особенности процессов экстракции и выделения конечного продукта из бактериальной биомассы .....	21
2 Объекты и методы исследования .....	24
2.1 Объект исследования и используемое оборудование .....	24
2.2 Технологические стадии обработки биомассы органическими растворителями.....	28
2.3 Технологические стадии обработки биомассы детергентами.....	30
2.4 Метанолиз образцов.....	33
2.5 Математическое определение содержания полимера в биомассе .....	34
2.6 Определение физико-химических характеристик образцов полимеров .....	35
3 Результаты исследования.....	37
3.1 Влияние концентрации детергентов на содержание примесей в биомассе.....	37
3.2 Влияние экстрагента на содержание примесей в полимере .....	43
3.3 Выход полимера при экстракции этанолом .....	51

ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	52
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	55

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует глобальная экологическая проблема загрязнения окружающей среды синтетическими пластмассами (полипропиленами и полиэтиленами), получаемыми в результате нефтеорганического синтеза. Непереработанные отходы складываются на мусорных свалках, тем самым занимая все больше плодородных земель, но накопление основной части происходит в океанах и составляет приблизительно 300 млн. т. в год [51, 30]. Одним из решений такой проблемы является создание биоразлагаемых материалов, подверженных деградации в окружающей среде без причинения ущерба природному сообществу [43]. Производство полигидроксиалканоатов в будущем сыграет огромную роль в развитии медицины (использование биополимера в качестве биорезорбируемого материала для создания транспортной системы доставки лекарств) [53], 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.

В отличие от зарубежных исследований полимерных материалов, в России в целом отсутствует индустрия по производству биоразлагаемых полимеров. Подавляющая часть российского рынка за неимением высокотехнологичного производства медицинских изделий, фармакологических препаратов, материалов для хирургии и пр. занята импортом зарубежной продукции, что отрицательно влияет на конкурентоспособность страны [43].

При получении биоразлагаемых полимеров важным технологическим этапом является выделение целевого продукта из бактериальной биомассы и

его очистка. Поэтому необходимы исследования, направленные на совершенствование существующих методов экстракции.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Полигидроксиалканоаты как замена традиционным синтетическим полимерам**

ПГА – белково-липидные соединения, которые синтезируются многими микроорганизмами как формы хранения материала. После синтеза, ПГА накапливаются в виде гранул в цитоплазме бактериальной клетки. Средний размер гранул ПГА составляет примерно 0,2-0,5 мкм. Для извлечения ПГА из гранул необходимо разрушить клеточную стенку бактерий и удалить белковый слой, который обволакивает гранулы ПГА. Кроме того, селективным методом выбирают наиболее подходящий растворитель для ПГА. Формирование гранул ПГА зависит от наличия соответствующих метаболических путей [22].

Существует два основных типа биополимеров: полимеры, производимые биологическими системами (в качестве микроорганизмов) и химически синтезированные полимеры на основе биологического сырья (аминокислоты, сахара, жиры) [42].

ПГА являются перспективной альтернативой нефтехимическим полимерам в качестве быстроразлагаемых изделий, применяемых в сельском хозяйстве и здравоохранении в виде одноразовых упаковок, нитей и швов [3]. Доклад, опубликованный Европейским институтом перспективных миссий о биоразлагаемых пластике на основе микроорганизмов, содержит в себе перспективное направление, согласно которому доля биопластиков во всем мире будет составлять около 5% к 2020 году [8]. Высокая себестоимость производства биопластика, включая выделение полимера и очистку биомассы 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 [3]. ПАВ не может дать высокую чистоту ПГА (>97%), поэтому также вкупе 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 [14]. Протеолитические ферменты проявляют высокую активность в растворении белков, но оказывают незначительное влияние на деградацию полигидроксиалканоатов. Типичная обработка ПГА-содержащих клеточных суспензий (60% от массы ПГА) начинается с термическим воздействием с последующим ферментативным гидролизом, ПАВ пропиткой, и окончательным обесцвечиванием перекисью водорода [39].

Несмотря на наличие множества способов извлечения ПГА из биомассы, методы, удовлетворяющие масштабу крупного производства, безопасности и экономическим факторам еще не существуют. В связи с высокой значимостью процесса экстракции в общей технологической схеме получения ПГА проводятся исследования, целью которых является повышение эффективности экстракции за счет усовершенствования экстракционной аппаратуры,



применения диафильтрации [1], экстракцией при высоких температурах малорастворяющимися полимер растворителями, не содержащими галогены [7], использования суперкритической флюидной экстракции сжиженным углекислым газом [2]. Дано описание нескольким методам извлечения полимера, включая различные предварительные способы разрушения клеток, а именно высокотемпературную обработку биомассы с последующим ферментативным расщеплением, обработку биомассы несколькими детергентами и щелочными растворами [48].

Разработка дешевого, безопасного процесса извлечения ПГА в дальнейшем будет иметь значительное влияние на промышленное производство этого универсального биополимера. Обычным способом извлечения полимера является экстракция органическим растворителем. Выход полимера при использовании этого метода лучше, чем при альтернативном разрушении клеток с последующей водной экстракцией. Это происходит потому, что во время разрушения клеток уменьшается молекулярная масса биополимера. Также, предложены способы предварительной обработки клеток, разрушения клеток, химическое или ферментативное расщепление систем, не содержащих ПГА, их спонтанное высвобождение, флотация в растворенном воздухе и экстракция с использованием сверхкритического  $\text{CO}_2$ . Ни один из этих способов выделения не обладает всеми необходимыми требованиями для эффективной и экономичной масштабируемости процесса. Основные недостатки заключаются в стоимости ферментов и поверхностно-активных веществ, безопасности и масштабируемости [18].

## **1.2 Характеристика ПГА и способы их выделения из биомассы**

В последние 10-15 лет, производство биополимера стало одним из важнейших междисциплинарных научных направлений. Среди биоразлагаемых полимеров, которые уже разработаны или находятся в стадии разработки, различают алифатические полиэфиры, полиамиды, сегментированные

полиуретаны, полимеры молочной и гликолевой кислот (полилактиды и полигликолактиды), силикон, полиэтилентерефталаты, и, с недавних пор, полимеры из гидроксипантеновых жирных кислот (ПГА) [42].

В зависимости от длины углеродной цепи различают следующие виды ПГА:

- короткоцепочечные (short chain length,  $HA_{SCL}$ ) – имеют в своем составе 3-5 атомов углерода;

- среднецепочечные (medium chain length,  $HA_{MCL}$ ) – содержат от 6 до 14 углеродных атомов;

- длинноцепочечные (long chain length,  $HA_{LCL}$ ) – цепи состоят из 17-18 атомов углерода [32].

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.

Получение термолабильных биополимеров представляет совокупность неразрывно связанных химических и тепломассообменных процессов. Производство материалов в условиях взаимосвязанного тепломассопереноса, осложненного фазовыми и химическими превращениями, в общем случае представляет значительные трудности из-за неодинакового влияния температуры на скорости одновременно протекающих теплофизических и химических процессов, причем скорости химических процессов на несколько порядков превышают скорости переноса энергии и вещества [41].

### **1.2.1 Расщепление микробной оболочки с помощью щелочи и гипохлорита натрия**

Биомассу бактерий можно предварительно обрабатывать щелочным раствором или раствором гипохлорита натрия, который солюбилизирует молекулы, не содержащие полигидроксиалканоев, оставляя сами молекулы ПГА неповрежденными [11]. Затем, ПГА могут быть отделены от раствора центрифугированием. Но в процессе обработки гипохлоритом натрия наблюдается серьезная деградация полимера, которая заключается в 50% снижении молекулярного веса [28]. Эта технология довольно проста, однако, учитывая заметное снижение молекулярной массы ПГА вследствие использования гипохлорита натрия, который является сильным окислителем и содержит заметное количество хлора, который остается в выделенных гранулах ПГА, эта технология была модифицирована многими исследователями. Один из вариантов модификаций включает в себя использование дисперсионного раствора, изготовленного из гипохлорита натрия и хлороформа [38].

Однако при обработке возможна деструкция эфирных связей и снижение молекулярной массы полимера. Способ переваривания клетки щелочью (NaOH) используется для выделения ПГА, но есть вероятность того, что передержав клетки ПГА в щелочи, произойдет разрушение полимера. В некоторых случаях хлопья ПГА, выделенные из переваренных клеток, были дополнительно обработаны озоном или перекисью для удаления загрязняющих веществ [9].

Также, существует комбинированный способ выделения ПЗГБ с предварительным ферментативным расщеплением безполимерных структур: клетки (от 100 до 1000 мг сухой биомассы на 10 мл ферментов), имеющие различный полимерный состав, обрабатывали при температуре 30 °С в течение 1 ч с различными химическими веществами. Клеточный раствор промывали дистиллированной водой и центрифугировали. Далее, водой промывали клетки и добавляли к ним различные химические растворы. После смешивания клеток с растворами для расщепления безполимерных клеток, гранулы ПЗГБ отделяли

от водной фракции центрифугированием при 2500 G в течение 20 мин. Выделенные гранулы ПЗГБ осторожно промыли дистиллированной водой (во избежание флотации полимерных гранул), снова провели центрифугирование и высушили на открытом воздухе. В ферментативном расщеплении принимали участие следующие химические вещества: кислоты (HCl и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), щелочи (NaOH, кон и NH<sub>4</sub>OH), поверхностно-активные вещества (диоктилсульфосукцинат натрия, гексадецилтриметиламмоний бромид, додецилсульфат натрия, полиоксиэтилен-р-трет-октил фенол, и полиоксиэтилен (20) сорбитан моноолеат) [4].

В работе (Hahn et al., 1994) методом распыления хлороформа и раствора гипохлорида натрия достигнута высокая эффективность очистки с незначительной деструкцией полимера [48].

### **1.2.2 Использование сверхкритических флюидов в процессах экстракции биополимера**

С недавнего времени сверхкритические флюиды (СКФ) представляют огромный интерес в биотехнологических процессах. Они обеспечивают решение кардинальных проблем, связанных с нетепловой клеточной инактивацией, ферментативной инактивацией, клеточной проницаемостью и извлечением продуктов брожения. Применение сверхкритических флюидов является простым, недорогим и, что более важно, безвредным для структур и функций ферментов, например, алкоголь дегидрогеназы, инвертазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фумаразы и активности белков. Сверхкритический диоксид углерода (СК-CO<sub>2</sub>) является наиболее широко используемой жидкостью с низкой критической температурой кипения (31.1 °C) и давлением (73 бара), что делает его идеальным средством для обработки летучих продуктов. Он недорогой, легко доступен, не оставляет токсичных остатков, обладает низкой реакционной способностью, является негорючим и обладает умеренной критической температурой (31°C) и давлением (7.29 МПа).

Сверхкритический флюид используется для извлечения почти 90% ПГА в биомассе с чистотой от 86 до 99% [9]. Нетоксичность, негорючесть, селективность процесса и легкость выделения полимера являются наиболее важными характеристиками [19].

Определение различных параметров, таких как время выдержки, давление, температура, объем метанола в качестве модификатора, эффективность разрушения клеток исследовались с использованием статистического подхода Тагучи для установления оптимальных условий. Оптимальные условия для разрушения клеток и выделения ПГА были следующие: время воздействия – 100 мин; давление – 200 атм; температура – 40 °С; объем метанола – 0,2 мл. Время культивирования бактерий не играет роли. При оптимальных условиях максимальная эффективность выделения ПЗГБ составила 89% [12]. Процесс предполагает внезапное освобождение СК-СО<sub>2</sub> под давлением, что приводит к проникновению СКФ внутрь клеток. После расширения газа внутри клеток внезапный сброс давления сил клеточной стенки вызывает разрушение клеток.

Метод является относительно простым и может быть легко расширен. Кроме того, клетки подвергаются минимальному воздействию поперечных сил, также отсутствует тепловыделение, которое может неблагоприятно повлиять на выход термолабильных и термочувствительных материалов [19]. Таким образом, предлагаемый способ является перспективным, поскольку используется меньше растворителя для разрушения клеток в сравнении с другими методами выделения, при этом он является более благоприятным для экологии [12].

### **1.2.3 Метод селективной флотации**

Выделение ПГА из бактерий *Pseudomonas putida*, ферментированных путем брожения, 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) только когда учитывается отталкивание щеточного узла. 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 доходить до 95%. Количество выделенного полимера, в основном, зависит от фракции полимерных включений, которые не объединяются и слишком малы по своим размерам для эффективной флотации [34].

#### **1.2.4 Использование ферментов для очистки и выделения ПГА**

Был открыт способ использования ферментов, свободных от химических добавок для выделения и очистки ПГА, ферментированного на грамтрицательных бактериях *Ralstonia eutropha* DSM 545. Изучены ферменты протеаз, такие как трипсин, химотрипсин, папаин и бромелайн,  $\beta$ -глюкоцидаза, целлюлаза и лизоцим. В экспериментах, в которых последовал выбор ферментов, направленных на нахождение оптимальной температуры, pH и концентрации фермента, была достигнута высокая эффективность в солюбилизации безполимерной биомассы и, следовательно, в выделении и очистке ПГА. В результате экспериментов установлено, что протеазы оказались наиболее подходящими ферментами для солюбилизации и очистки ПГА полимерных бактерий *R. Eutropha* (выход полимера при использовании трипсина составил 89 %). Высокая эффективность и низкая стоимость

использования трипсина делают его перспективным ферментом для крупномасштабных производств [17].

### 1.2.5 Использование детергентов для экстракции ПГА

Один из подходов получения полимера (который называют «безреагентным») заключается не в его экстракции из биомассы клеток, а в удалении загрязняющих компонентов (белков, углеводов). Как известно, полимер ассоциируется в клетках в виде гранул, однако гранулы помимо полимера содержат белки ферменты, катализирующие реакции синтеза и биораспада полимерных цепей в клетке [31]. Использование анионных детергентов, таких как додецилсульфат натрия, может привести к разложению любых нерастворимых веществ, таких как белки и липиды, а также к сольubilизации компонентов посредством включения в мицеллы [38]. Дальнейшее поступление ПАВ разрывает мембрану для того чтобы мицеллы проникли в фосфолипидный слой, что приведет к отделению клеточного мусора от ПГА. Еще одна функция ПАВ заключается в сольubilизации. ПАВ сольubilизирует не только белки, но и другие, не содержащие ПГА структуры. Преимущество этого метода исходит из того, что поверхностно-активные вещества проводят лизис клеток без ухудшения качества полимерных гранул.

Путем добавления хелатного комплекса к ПАВ можно увеличить качество обработки ПГА. На самом деле, роль хелатов можно объяснить тем, что у некоторых грамотрицательных бактерий, таких как *R. Eutropha*, есть двухвалентные катионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , находящиеся в наружной мембране. Добавление хелата может дестабилизировать наружную мембрану, образуя комплексы с двухвалентными катионами. Изменения во внешней мембране также ослабляют связи во внутренней мембране. Все это облегчает разрушение клеточной стенки *R. Eutropha* и дают более высокую чистоту выделенных ПЗГБ [15].

Для экстракции полимера из полученной сырой пасты готовится 5%-ный раствор SDS объемом 50 л. Затем паста загружается в реактор и заливается раствором SDS в соотношении 4–5 л/кг биомассы. Реактор снабжен мешалкой и терморубашкой для поддержания температуры. Процесс экстракции длится 60 мин при температуре  $(60 \pm 5)$  °С и активном перемешивании. Затем полученный экстракт центрифугируется, фугат инактивируется и сливается в сборник для последующей утилизации, а полученный полимер с примесью SDS подвергается промывке дистиллированной водой. Далее полимер отделяется от промывной воды центрифугированием и дополнительно трёхкратно промывается дистиллированной водой. Очищенный и промытый полимер в количестве  $(9 \pm 1)$  кг сушат при температуре 60 °С в течение 24 ч. Конечный продукт (в случае необходимости) стерилизуют и асептически упаковывают [21].

Метод обработки биомассы детергентами отличается тем, что детергенты разрушают различные компоненты клетки, оставляя молекулы ПГА нетронутыми, что является главной целью процесса экстракции [37]. Например, 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 [48]. Также, 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 [50].

Ещё одно исследование заключалось в оценке содержания остаточных белков после экстракции методом электронной микрофотографии. После добавления додецилсульфата и перемешивания, содержание остаточного белка в выделенной пробе составляло около 80% от первоначального уровня и оно было снижено до 5% после термической обработки. Никаких остаточных белков не было обнаружено после окончательного шага промывки дистиллированной водой. На рисунке 4 показаны гранулы ПЗГБ, полученные путем просвечивающей электронной микрофотографии до и после обработки [20].

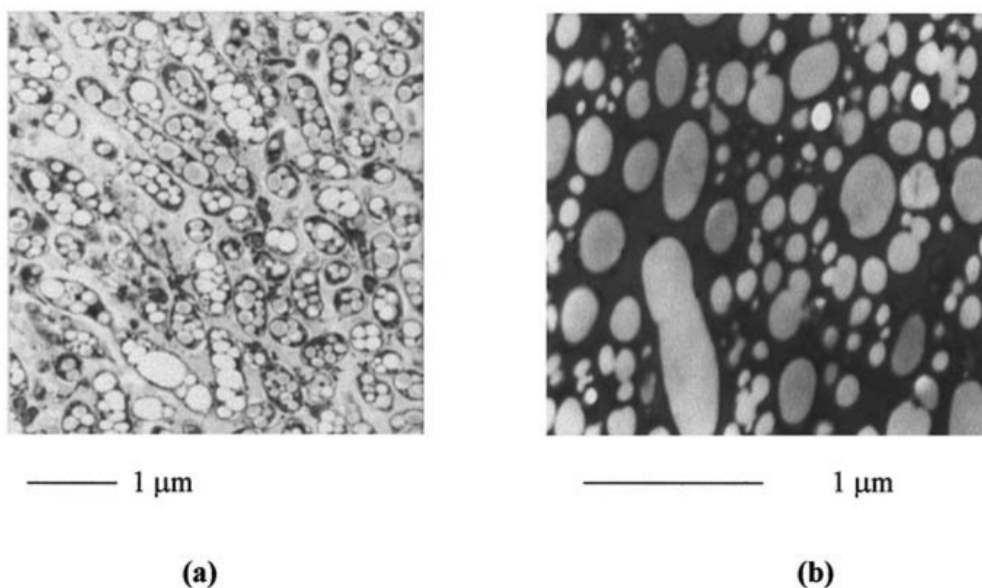


Рисунок 1 – Электронная микрофотография образца ПЗГБ до обработки (a) и после (b) [20]

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 [16]. Однако, есть и преимущества использования мыльных растворов: метод может быть применен для сырой биомассы непосредственно после культивирования, что исключает необходимость сушки полимера до экстракции [33]. Еще одно несомненное преимущество метода – отпадает необходимость в использовании токсичных растворителей [37].

### **1.2.6 Экстракция ПГА с помощью органических и неорганических растворителей**

Экономические соображения процесса культивирования клеток часто ограничиваются долей содержания ПГБ в микроорганизмах, что требует использования большого количества растворителей для экстракции, из которых получается полимерный раствор, значительно упрощающий процесс разделения безполимерных композиций от самого раствора полимера. Следовательно, если стоит цель получить полимерный продукт, свободный от таких растворенных примесей, необходимо провести предварительную стадию экстракции растворителем, в котором полимер не растворяется, чтобы удалить растворимые примеси перед экстракцией полимера или, другими словами, полимер должен быть селективно отделен от раствора, например, путем осаждения. Если концентрация раствора составит 5%, также, если 95% растворителя регенерируется для повторного использования, на извлечение 1 кг полимера уходит 1 кг растворителя. При более низких концентрациях или менее эффективной регенерации растворителей, для выделения полимера их потребуется еще больше [13].

Большинство процессов, разработанных для выделения ПГА из микробной биомассы, основаны на экстракции органическими растворителями, включая галогенированные углеводородные растворители, такие как хлороформ и дихлорметан [4, 5]. 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 [6]. Использование небольшого количества растворителей может привести к высокой вязкости полимерного раствора, если концентрация раствора составит  $>5\%$  [48]. Недавно найден способ разрушения клеточной стенки сверхкритическим флюидом, флотацией растворенного воздуха и селективным растворением клеточной массы для выделения ПГА. Все эти методы являются перспективными альтернативами экстракции растворителем, но ни один из них не обладает всеми необходимыми требованиями для эффективного и экономичного запуска масштабного производства. Основными недостатками являются стоимость, надежность и масштабность [29].

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 солубилизации ПГА. Впоследствии, биомасса может быть лиофилизированной 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 [9].

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 5,8 - 6,4 г/моль, 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  $6,2 \cdot 10^5$  до  $3,4 \cdot 10^5$  г/моль [50].

Проведено исследование метода тепловой экстракции/осаждения растворителем для извлечения полимерного материала из ила. Весь объем твердого ила был сконцентрирован при низкой скорости центрифугирования (2000 об/мин) и ресуспендирован в 25% растворе Рингера. Концентрация сухого осадка определена путем фильтрации образца данной суспензии. Для снижения бактериального лизиса и, как следствие, высвобождения внутриклеточных продуктов, ил подвергался термической обработке при 80 °С. Степень осаждения полимера доходила до 90 % [23].

Также, исследована экстракция из *R. eutropha* с использованием жидким галогенированных растворителей, таких как хлорэтан и хлорпропан. Установлено, что наилучшие результаты были получены для растворителей, в которых функциональные атомы углерода несут по меньшей мере один атом хлора и один атом водорода. Использование следующих растворителей в качестве экстрагентов дало положительные результаты: диолы (1,2-пропандиол: выход полимера 79%, чистота 99.1%, 140°C), ацетализированные триолы (глицерин: выход полимера 85%, чистота 99.7%, 120°C), эфир ди- или трикарбоновой кислоты (диэтиловый сукцинат: выход полимера 90%, чистота 100%, 110°C), бутиролактон (выход полимера 90%, чистота 99.5%, 110°C) [15].

При использовании лиофилизированной биомассы бактерий *Alcaligenes eutrophus*, лучшие результаты были получены при предварительной обработке ацетоном и при обработке дихлорметаном или хлороформом с обратным холодильником в течение 15 мин. Выделенный поли-3-гидроксибутират имел 95% чистоту и молекулярную массу ( $M_w$ ) до 1050000 и 930000 г/моль соответственно [25].

Ещё один способ включает в себя высокотермическую обработку биомассы с последующей экстракцией растворителями и осаждения в виде кристаллов: клеточный материал микроорганизмов из ферментированного

раствора удаляют центрифугированием, затем нагревают от 110° до 140° С. В качестве растворителя могут использоваться пропандиол, глицерин, диэтилсукцинат или диметилсукцинат, эфирные смеси, состоящие из диметилсукцината, солей глутаровой кислоты и адипата или бутиролактона. Раствор перемешивают в течение 15 минут при заданной температуре. Нерастворенный клеточный материал отделяется путем нагревания вакуумного фильтра и охлаждения полученного горячего раствора, в результате чего получится полиэфирный гель. Однако, осадители, такие как вода, этанол, метанол, ацетон или их смеси, также могут быть добавлены в раствор, после чего полиэфир осаждают в виде кристаллов. Полиэфиры, отфильтрованные с помощью вакуумной фильтрации, дополнительно можно освободить от жидкости и осадить путем перемешивания остатка с осадителями, такими как вода, этанол, метанол, ацетон или их смеси. Кристаллический осадок отфильтровывают и сушат. Поскольку все без исключения экстрагенты имеют высокие температуры кипения по сравнению с осадителями, они могут быть выделены из осадителей, например, путем дистилляции. Таким образом, осадители и экстрагенты можно использовать вторично для экстракции и осаждения полиэфиров [35].

Описан способ выделения ПГА из сухих клеток биомассы с помощью метилизобутилкетона: к 1.35 л метилизобутилкетона добавлены лиофилизированные клетки, содержащие 27 г ПГА для формирования 2% раствора. Полученную смесь переносят в 5 литровую круглодонную колбу. Полимер экстрагируют при температуре 100 °С с перемешиванием при нагревании с обратным холодильником в течение 4 ч. Образец охлаждают до комнатной температуры в течение ночи и центрифугируют в стеклянной бутылке при 2200 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. 1 л аликвоты полученного раствора осадил 3 литрами н-гексана при комнатной температуре в 4 л колбу Эрленмейера при перемешивании. Надосадочную жидкость удаляли путем декантации, осадок дважды промывали н-гексаном и

затем сушили при температуре 50 °С в течение ночи. Общий выход полимера от раствора метилизобутилкетона и геля метилизобутилкетона составил 84%.

ПГА, выделенный из смеси влажных клеток с этилацетатом, не показал гелеобразования полученной смеси. Полимер, выделенный таким способом, обладал чистотой до 98% с содержанием гидроксигексаноата в 21% от массы биомассы. Во время центрифугирования извлеченной смеси наблюдалось разделение остаточного клеточного материала на три отдельные фазы. В верхнем слое содержалось 58% ПГА, в среднем – 31%, в нижнем – 27%. Процент выделения полимера из раствора этилацетата с сырой биомассой составил только 71%, тогда как выход полимера от сухих клеток составил 93% с чистотой в 95% [26].

К сожалению, масштабное применение экстракции растворителем обычно рассматривается как метод, который не является экологически чистым. Кроме того, ряд других факторов способствуют использованию растворителей, таких как высокие капитальные и оперативные расходы. Еще одной проблемой является высокая вязкость полимерного раствора, когда концентрация превышает 5%. Высокая вязкость раствора препятствует выходу клеточных стенок в результате длительной сепарации биомассы [22].

### **1.3 Особенности процессов экстракции и выделения конечного продукта из бактериальной биомассы**

Существенную роль в общей стоимости производства играет способ выделения ПГА из клеточной биомассы. При его выборе необходимо учитывать затраты на реагенты и эффективность извлечения. Экономические оценки показали, что затраты на выделение ПГА значительно уменьшаются с увеличением содержания полимера в клетке. Согласно этим расчетам, при 88%-ном содержании полимера стоимость выделения составит 0,92 \$, а при 50%-ном – 4,8 \$ США за 1 кг. Это удорожание обусловлено в основном использованием большего количества вещества для выделения полимера и увеличением затрат

на вывозы отходов. Разработка более экономичных способов экстракции является важной задачей на пути создания эффективного производства ПГА [49].

При селективном выделении определенного целевого компонента из биоматериала, представляющего собой гетерогенную многофазную систему, в состав которой входят сложные химические соединения различных высокомолекулярных полимеров, необходимо:

- создать оптимальные тепломассообменные условия ускоренного селективного извлечения и формирования структуры целевого биополимера, принимая во внимание термолабильность биоматериала и наноразмеры его единичной молекулы; □

- обеспечить сохранность структуры выделенного биополимера в процессе получения его сухих форм и при взаимодействии высушенного биополимера с жидкой средой [41].

Наибольшие трудности при выделении ПГА связаны с его ограниченной растворимостью в органических растворителях, в настоящее время для растворения ПГА используют хлороформ, дихлорметан, дихлорэтан и другие галогенпроизводные (патенты РФ № 2333962, US4358583, US4391766), а также имеются данные по использованию высококипящих растворителей этиллактата (патент ФРГ № 19712702), уксусного ангидрида (патент ГДР № 229428). Недостатком применения высококипящих растворителей прежде всего являются высокие температуры, а следовательно, повышенные затраты на экстракцию и их регенерацию, а также весьма вероятен гидролиз части ПГА под действием высоких температур, что снижает эффективность производства [49]. Стоимость выделения ПГА с помощью экстракции растворителем может быть от 50% и выше общей себестоимости продукции. Такая высокая стоимость может быть значительно снижена с помощью солубилизации молекул, не содержащих в себе ПГА, путем секвенирования поверхностно-активными веществами и перевариванием с помощью гипохлорита натрия. Гипохлорит – неселективный, сильный окислитель, переваривающий

биомассу без полимера, но поэтому снижается молекулярный вес молекул полимера (1-22 кД) и его выход из биомассы [39].

Выделение ПГА с использованием гипохлорита вызывает деструкцию эфирных связей в полимере и снижает величину молекулярной массы. Однако обработка бактериальной суспензии гипохлоритом в сочетании с поверхностно-активными веществами показала высокую эффективность очистки с меньшим повреждением полимера. Простой способ выделения ПГА недорогими химикатами может быть наиболее эффективным и экономичным при извлечении из клеток с высоким содержанием полимера [24]. Такой метод опробован на рекомбинантном штамме *E. coli* [4]. Контакт клеток, содержащих 77 % ПГА, с 0,2% р-ром NaOH, в течение одного часа позволяет получить полимер с чистотой 98,5% [49].



## 2 Объекты и методы исследования

### 2.1 Объект исследования и используемое оборудование

На сегодняшний день самым изученным видом из семейства ПГА является полимер 3-гидроксимасляной кислоты или поли-3-гидроксибутират [36]. Наибольшее внимание в ходе производства и синтеза ПГА уделено бактериям *Ralstonia eutropha* В 5786 (Рис. 2) (известных на сегодняшний день как *Cupriavidus eutrophus* В-10646), способных к накоплению ПГА и в дальнейшем дающих высокий выход полимера на различных субстратах [41].

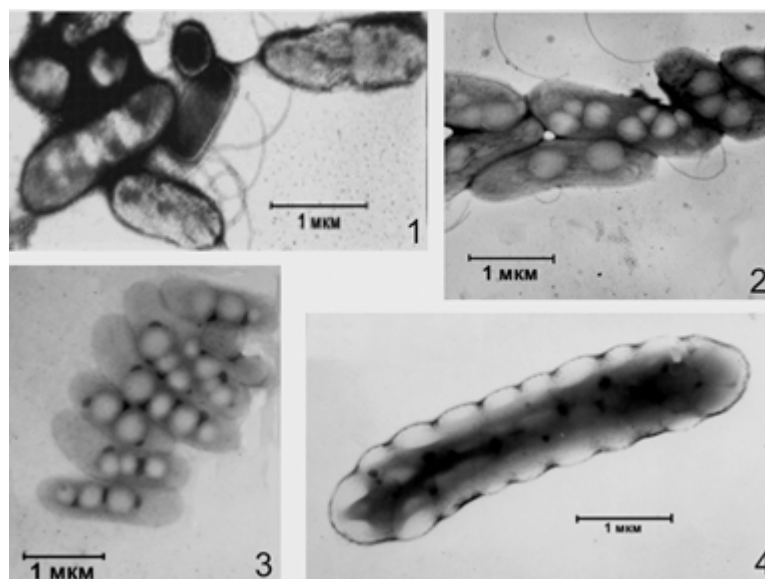


Рисунок 2 – Микрофотографии бактерии *Ralstonia Eutropha*

На данный момент известные методы извлечения полимера из биомассы не соответствуют многим требованиям, таким как расходы на реагенты, чистота полученных полигидроксиалканоатов и полнота их извлечения и экологичность продукта. Несовершенство методов ставит целью улучшение процессов экстракции и выделения ПГА, что является условием увеличения эффективности этих процессов и уменьшения себестоимости конечного продукта.

Для достижения цели в работе поставлены следующие задачи: провести экстракцию полимера с использованием растворителей и детергентов, дать

сравнительную характеристику по каждому из представленных методов и оценку полученных результатов.

Экстракция ПГА, полученных при культивировании бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 на глюкозном или фруктозном субстрате, подразумевает собой использование полярных (этанол – в качестве первичного экстрагента для растворения примесей в биомассе) и неполярных растворителей (дихлорметан, хлороформ – в качестве экстрагентов, гексан – в качестве осадителя) [44]. Также, для осаждения возможно использование этанола. Использование тетрахлорэтана нежелательно по причине высоких показателей токсичности. Хлороформ по своей природе является более токсичным растворителем по сравнению с дихлорметаном и имеет меньшую растворяющую способность, образует азеотропные смеси с гексаном, имеет более высокую стоимость, поэтому предпочтение при экстракции отдается дихлорметану.

Процессу выделения полигидроксиалканоатов предшествует концентрирование полученной биомассы и её обезвоживание. Существует 2 способа сушки: лиофильная при отрицательной температуре в вакууме и температурная. Выделение полимера входит в постферментационную стадию и может проводиться несколькими методами.

В следующей таблице представлены материалы, используемые для экстракции, выделения и метанолиза полученного полимера.

Таблица 1 – Перечень материалов и комплектующих

Наименование	Обозначение НД	Показатели, обязательные для проверки	Назначение
Дихлорметан (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	ГОСТ 9968-86	Кол-во согласно накладной	Экстракция
Гексан (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	ТУ 2631-003-05807999-98	Кол-во согласно накладной	Осаждение
Спирт этиловый технический (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	ГОСТ 18300-87	Кол-во согласно накладной	Химический контроль, экстракция, осаждение

Окончание таблицы 1

Хлороформ (CHCl <sub>3</sub> )	ГОСТ 20015-88	Кол-во согласно накладной	Химический контроль, экстракция
Кислота бензойная (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COOH)	ГОСТ 10521-78	Кол-во согласно накладной	Химический контроль, метанолиз
Стандарт полистирольный	DIN 55672-2 (2008-06)	Кол-во согласно накладной	Физико-химический контроль, метанолиз
Додецилсульфат натрия (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> Na)	ГОСТ 8748-2006	Кол-во согласно накладной	Экстракция
Полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (Brij-58, C <sub>56</sub> H <sub>114</sub> O <sub>21</sub> )	ГОСТ 29213-91	Кол-во согласно накладной	Экстракция
Пробирка	ГОСТ 1770-74	Кол-во согласно накладной	Химический контроль
Цилиндр 1-250 или 3-250, 1-10 или 23-100, 1-1000 или 3-1000	ГОСТ 20292-74	Кол-во согласно накладной	Химический контроль
Стаканчик СН 45/13, 60/14	ГОСТ 25336-82	Кол-во согласно накладной	Физико-химический контроль
Колба КН-2-250-34 ТХС	ГОСТ 25336-82	Кол-во согласно накладной	Получение посевного материала
Колба КН-1-250; 1-500; 1-1000; 1-2000	ГОСТ 25336-82	Кол-во согласно накладной	Получение посевного материала
Воронка ВФ-1-32 пор ТХС или любого типа с таким же фильтром	ГОСТ 25336-82	Кол-во согласно накладной	Физико-химический контроль

Основное оборудование, используемое для подготовки биомассы к процессу экстракции и получению полимера, представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Перечень основного оборудования и инструментов, используемых для производства Материала

Наименование	Инвентарный номер	Кол-во	Производственное помещение	Назначение
Холодильник Бирюса 151ЕК-2	3004147187	1	Отделение музейной культуры, отделение экстракции	Хранение биомассы, микробиологический контроль

Окончание таблицы 2

Шкаф сушильный UN55 (Mettler)	2511147013	1	Отделение средоподготовки, отделение экстракции	Сушка биомассы, микробиологический контроль
Весы лабораторные аналитические Pioneer PA512C (OHAUS)	2006147005	1	Отделение средоподготовки, отделение экстракции	Подготовка питательных растворов, формование плёнок и мембран
Плитка электрическая MR-HEI-standart (Heidolph)	2610113012	1	Отделение средоподготовки, отделение экстракции	Подготовка питательных растворов, входной контроль биомассы, формование плёнок и мембран
Экстрактор	0312123002	1	Отделение экстракции	Экстрагирование полимера
Фильтр экстрактора	0312123003	1	Отделение экстракции	Экстрагирование полимера
Осадитель	1712147049	1	Отделение экстракции	Осаждение полимера
Насос мембранный DM25/125RTT (DELLMECO)	-	1	Отделение экстракции	Осаждение полимера
Емкость для сбора растворителей	1712147051	1	Отделение экстракции	Осаждение полимера
Фильтр осадителя	1712147050	1	Отделение экстракции	Осаждение полимера
Насос вакуумный мембранный ВНХС Millipore	-	1	Отделение экстракции	Экстрагирование полимера
Ротационный испаритель BUCHI Rotavapor R-215	2508113012	1	Отделение экстракции	Химический контроль

Дополнительное оборудование:

- Лиофильная сушка: Lyoph Pride LP10 (ilShin Bio Base Co., Ltd., Корея);
- Хроматография:  
газовый хроматограф Agilent 7890 (Agilent technologies Inc., Wilmington, США) – определение состава ПЗГБ,  
масс-спектрометрический детектор Agilent 5975C;
- Жидкостная хроматография: система гель проникающей хроматографии на базе жидкостного хроматографа с рефрактометрическим детектором

Agilent 1200 – определение средневесовой молекулярной массы  $M_w$ , средней молекулярной массы  $M_z$ , полидисперсности образцов D;

- Термический анализ: дифференциально-сканирующий калориметр DSC 1 (Mettler Toledo, Швейцария) – определение температурных свойств полимера:
  - Температуру плавления  $t_{\text{плав}}$ ;
  - Температуру деградации  $t_{\text{дегр}}$ ;
  - Температуру кристаллизации  $t_{\text{крист}}$ .

## **2.2 Технологические стадии обработки биомассы органическими растворителями**

Процесс экстракции подчиняется законам равновесного распределения и диффузии. Динамическое равновесие между концентрациями экстрагента и экстрагируемого вещества наступает при массообмене между фазами, когда из одной фазы во вторую переносится столько же вещества, сколько из второй в первую. Выравнивание концентраций по всему занимаемому объему означает окончание массообмена между фазами. Ряд факторов оказывает влияние на ведение экстракции (температура, время экстракции, количество и тип экстрагента, тип сырья, полученного в результате культивирования бактерий).

Этанол обезживает клетки и подвергает разрушению бислойные клеточные мембраны. Происходит агрегация липидов внутри нее и накопление воды, что приводит к снижению барьерных функций мембраны [10].

Процесс подготовки биомассы для дальнейшего извлечения из нее полимера проходит в несколько стадий:

1. Очистка биомассы от липидов и белковых фракций. Использовались этанол, ацетон и изопропиловый спирт в соотношении 5:1 к массе биомассы. Экстракция этиловым спиртом проходит 1 час на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Standard (Германия) с использованием обратного холодильника;

2. Фильтрация биомассы с помощью воронки Бюхнера, склянки Бунзена, вакуумного насоса Millipore WP6122050 (Billerica, Массачусетс) и бумажного фильтра «белая лента»;

3. Экстракция биомассы органическим растворителем (дихлорметаном). Соотношение экстрагента к биомассе равно 20:1. Продолжительность экстракции – 2 часа путем кипячения при перемешивании на магнитной мешалке с обратным холодильником. По окончании этапа раствор должен достигнуть оптической прозрачности;

4. Фильтрация экстракта с помощью воронки Бюхнера, склянки Бунзена, вакуумного насоса и бумажного фильтра «белая лента». Оставшийся шрот после экстракции анализируется на остаток полимера, жирных кислот. При низкой концентрации полимера шрот утилизируется, при высокой – проводится повторная экстракция дихлорметаном;

5. Упаривание полученного экстракта на роторном испарителе. Полученные экстракты упаривались на роторном испарителе Buchi, в который входят контроллер вакуума Buchi Vacuum Controller V-850, привод вращения колб Buchi Rotavapor R-215, тепловая баня Buchi Heatis Bath B-491, вакуумный насос Buchi Vacuum Pump V-700. Экстракт необходимо упаривать до образования густой полимерной консистенции;

6. Осаждение экстракта гексаном в соотношении 2:1 к экстракту и дальнейшая фильтрация полимера от осадителя.

При использовании пары этанол-дихлорметан с применением гексана в качестве осадителя образуется азеотроп с этанолом. Поэтому возможно проводить процесс осаждения ПГА при помощи этанола, так как замещение не окажет отрицательного воздействия на полимер при эталонном качестве этилового спирта.

Также, необходимо проанализировать спиртовой экстракт на липидный и белковый состав. Для этого полученный экстракт в пункте 1 максимально упаривается на роторном испарителе, затем центрифугируется для получения спиртового фугата и твердого осадка.

### 2.3 Технологические стадии обработки биомассы детергентами

Помимо спиртовой экстракции существует способ безреагентной очистки биомассы от липидов в процессе экстракции биомассы детергентами додецилсульфат натрия (SDS, химическая формула  $C_{12}H_{25}SO_4Na$ ) и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (Brij-58, химическая формула  $C_{56}H_{114}O_{21}$ ). Суть способа заключается в удалении безполимерных композиций, таких как белки и жирные кислоты, а не в извлечении полимера из биомассы.

Клеточные мембраны по большей части имеют в своем составе липиды и белки, которые нерастворимы в воде и имеют свойство гидрофобности. Но сами белки и липиды в своей структуре содержат довольно большие области, которые образуются влаговпитывающими группировками, как и детергенты обладающими одновременно лиофильными и лиофобными свойствами. Процесс происходит благодаря балансу лиофильных и лиофобных остатков соединений данных молекул. Величина критической концентрации мицеллообразования для этих соединений крайне мала, поэтому молекулы веществ склонны к агрегации. Но по причине своего состава в воде образуются длинные мембранные агрегаты, а не малоразмерные частицы мицелл. Эту структуру составляют неполярные участки молекул, которые способствуют образованию вокруг мембраны гидрофобной области, изолированной от воды лиофильными группами, располагающимися друг перед другом на поверхностях бислоя мембран. Мицеллообразующие и мембранообразующие молекулы требуют разную геометрию ассоциационных молекул.

Молекулы поверхностно-активных веществ, имеющих большие объемы лиофильной области и довольно маленькие лиофобные участки, в своем большинстве имеют конусообразное строение, вследствие чего упаковка в цилиндрические или сферические мицеллярные структуры происходит довольно легко. Но в молекулах мембранообразующих липидов разница между лиофильной и лиофобной областями не слишком заметна, по причине чего они напоминают цилиндрическую форму и свободно могут упаковываться в

длинный бислой липидов с кривизной небольшой величины. По этой причине, когда в одном агрегате одновременно содержатся и липиды, и детергенты, происходит конфликт между стремлением липидов сохранить свои молекулы в бислойной мембране и детергентов, стремящихся к мицеллярной конфигурации.

Если концентрация поверхностно-активных веществ в мембране невелика, то происходит лишь дефект в упаковке молекул с возникновением пор в бислойной мембране, состоящей из липидов. По мере увеличения концентрации изменения в строении мембраны стремятся к более высокой величине, что, в конечном счете, приведет к нарушению структуры мембраны или даже к ее разрыву или распаду на отдельные части, но эти части все еще могут сохранять мембранную структуру и система так же остается раствором ПАВ в мембранах.

При достижении концентрации какой-либо критической отметки сохранение системы раствора детергента в мембране невыгодно по причине высоких энергозатрат, происходит распад мембран, начинают образовываться системы мицелл детергент-липид и детергент-белок, по факту представляющие собой раствор частиц мембран в избытке детергентов, что является моментом начала солюбилизации. Происходит резкое уменьшение размеров частиц, из чего следует снижение оптической плотности раствора и количества вещества, концентрируемого с помощью центрифугирования.

Для успешного проникновения детергентов в мембрану и ускоренного распада раствора до смешанных мицелл необходимо использовать ПАВ с низкой критической концентрацией мицеллообразования. Для этих целей лучше всего подходят детергенты ионного происхождения, но их использование довольно часто приводит к денатурации белковых композиций [46, 27].

Образцы полигидроксиалканоатов, экстрагируемые таким способом, включают в себя следующие стадии:

1. Экстракция биомассы додецилсульфатом натрия и полиоксиэтилен-20-цетиловым эфиром. Продолжительность экстракции – 2 часа путем кипячения



при перемешивании на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Standard (Германия) с обратным холодильником;

2. Центрифугирование полученного экстракта при 6000 об/мин в течение 15 мин. с последующей отмывкой от детергента путем заливания дистиллированной воды и многократного центрифугирования (процедура повторяется 4 раза);

3. Сушка биомассы на открытом воздухе или с помощью сушильного шкафа при температуре 105 °С.

4. Экстракция биомассы органическими растворителями (дихлорметаном и хлороформом). Соотношение экстрагента к биомассе равно 10:1. Продолжительность экстракции – 2 часа путем кипячения при перемешивании на магнитной мешалке с обратным холодильником. По окончании этапа раствор должен достигнуть оптической прозрачности;

5. Фильтрация экстракта с помощью воронки Бюхнера, склянки Бунзена, вакуумного насоса Millipore WP6122050 (Billerica, Массачусетс) и бумажного фильтра «белая лента». Оставшийся шрот после экстракции анализируется на остаток полимера, жирных кислот. При низкой концентрации полимера шрот утилизируется, при высокой – проводится повторная экстракция дихлорметаном;

6. Упаривание полученного экстракта на роторном испарителе. Полученные экстракты упаривались на роторном испарителе Buchi, в который входят контроллер вакуума Buchi Vacuum Controller V-850, привод вращения колб Buchi Rotavapor R-215, тепловая баня Buchi Heitig Bath B-491, вакуумный насос Buchi Vacuum Pump V-700. Экстракт необходимо упаривать до образования густой полимерной консистенции;

7. Осаждение экстракта гексаном в соотношении 2:1 к экстракту и дальнейшая фильтрация полимера от осадителя.

## 2.4 Метанолиз образцов

Метанолиз является этапом подготовки проб для их последующей хроматографии. Для проведения метанолиза потребуются:

- Обратные холодильники;
- Водяная баня;
- Штатив с лапками;
- Колбы 100 мл;
- Резинки для фиксации колб к холодильникам.

Для анализа состава полимера необходимо 19-21 мг полимера, 3 мл хлороформа, 2,55 мл метанола, 0,45 мл концентрированной серной кислоты. Для анализа содержания и состава полимера в биомассе необходимо 19-21 мг сухой биомассы, 3 мл внутреннего стандарта (50 мг бензойной кислоты на 100 мл хлороформа), 2,55 мл метанола, 0,45 мл концентрированной серной кислоты.

1. Поместить пробы под обратный холодильник и зафиксировать резинками, опустить в водяную баню. Температура кипячения 80 °С.
2. Засечь время метанолиза – 5 ч после того, как в колбах начнёт образовываться сконденсированный хлороформ.
3. После 5 часового метанолиза залить в колбы по 3 мл дистиллята, взболтать и поставить в холодильник на сутки для расслоения получившейся смеси.

Для очистки проб перед непосредственной хроматографией потребуются:

- Штатив с лапками;
- 2 делительные воронки;
- Колбы 100 мл;
- Хлороформ;
- Дистиллированная вода;
- Маленькая воронка;
- Вата;

- Сернистый натрий;

1. Перенести пробу из колбы в делительную воронку, колбу промыть 0,5 мл хлороформа и слить в делительную воронку.
2. Добавить дистиллята в делительную воронку, перемешать до образования нижнего слоя.
3. Нижний слой слить во вторую делительную воронку, добавить в неё дистиллят, перемешать и дать отслоиться.
4. Поместить в маленькую воронку вату, присыпать сверху сернистым натрием, воронку поместить в чистую колбу. Колбу закрепить в штативе.
5. Пропустить нижний слой из делительной воронки через слой сернистого натрия в маленькой воронке. Воронку промыть 0,5 мл хлороформа. Полученный хлороформенный слой используется для анализа в хроматографии.

## 2.5 Математическое определение содержания полимера в биомассе

Для описания колонного хроматографического процесса использовался метод выходной кривой, называемой хроматограммой. Хроматограмма представляет собой кривую зависимости одного из свойств элюата (в данном случае концентрация) от его времени прохождения. Регистрируется изменение свойства потока элюата, содержащего хроматографируемое вещество [40]. Подсчет количества полимера проводится по соотношению площадей пиков образцов и пика внутреннего стандарта, установленных в результате хроматографии, по формуле (1):

$$P = \frac{(\sum S_{\text{обр}}/S_{\text{внутр.ст.}}) \cdot 100 \cdot 1,5}{m_{\text{обр}}} \cdot k, \quad (1)$$

где  $\sum S_{\text{обр}}$  – сумма площадей пиков образцов;

$S_{\text{внутр.ст.}}$  – площадь пика внутреннего стандарта;

$m_{\text{обр}}$  – масса навески образца, взятого на метанолиз в мг;

$k$  – коэффициент внутреннего стандарта.

Коэффициент 1,5 используется для навески образцов в 19-21 мг.

Коэффициент внутреннего стандарта определяется каждый раз после изготовления нового раствора бензойной кислоты в хлороформе путем метанолиза чистого образца полимера. Определяется по формуле (2):

$$k = \frac{m_{\text{обр}}}{X}, \quad (2)$$

где  $X$  – отношение суммы площадей пиков образцов к пику внутреннего стандарта (3):

$$X = \frac{\sum S_{\text{обр}} \cdot 1,5}{S_{\text{внутр.ст.}}} \quad (3)$$

## 2.6 Определение физико-химических характеристик образцов полимеров

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов Agilent PS-H EasiVial. Находили средневесовую ( $M_w$ ) и среднечисловую ( $M_z$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $D$ ), растворяя образцы сополимерных ПГА навеской 10-12 мг в 2 мл хлороформа с дальнейшей их фильтрацией.

Величину среднечисловой молекулярной массы находили по выражению (4):

$$M_z = \sum(N_i \cdot M_i / N), \quad (4)$$

где  $N_i$  – количество молекул массы  $I$ ;

$N$  – общее количество молекул;

$M_i$  – масса молекул длины  $I$ .

Средневесовая молекулярная масса определяется по формуле (5):

$$M_W = \sum(w_i \cdot M_i), \quad (5)$$

где  $w_i$  – массовая доля;

$$w_i = \frac{N_i \cdot M_i}{\sum(N_i \cdot M_i)}. \quad (6)$$

Полидисперсность, которая позволяет оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, вычисляли по выражению (7):

$$D = \frac{M_W}{M_Z}. \quad (7)$$

### **3 Результаты исследования**

#### **3.1 Влияние концентрации детергентов на содержание примесей в биомассе**

Был проведен эксперимент с двумя детергентами: додецилсульфатом натрия и полиоксиэтилен-20-цетиловым эфиром (табл. 1), в котором установлено, что различные концентрации полученных смесей по-разному влияют на количество оставшихся примесей в биомассе. Поверхностно-активные вещества разрушают клетки путем включения в липидный бислой мембраны. При добавлении ПАВ, большая его часть поступает в мембрану для увеличения объема клеточной стенки, пока она насыщается. Дальнейшее поступление ПАВ разрывает мембрану для того чтобы мицеллы проникли в фосфолипидный слой, что приведет к отделению клеточного мусора от полигидроксиалканоатов [15].

Для оценки чистоты использовался газовый хроматограф (п. 2). Перед непосредственным хроматографированием необходимо провести метанолиз проб и их фильтрацию (п. 2.3). Лиофильно высушенная биомасса была обработана четырьмя концентрациями мыльных растворов SDS и Brij-58 – 0,5%, 1%, 1,5%, 2,5% при температуре 105 °С. Навеска биомассы для экстракции составила 20 грамм. Учитывая то, что полимер при такой обработке не подвергается растворению, а в раствор переходят вещества белковой и липидной природы, критерием оценки эффективности процесса будет отношение количества примесей к количеству полимера. Соединение в растворе молекул детергентов и белков объясняется их амфифильностью. По причине высокой степени связываемости белка с поверхностно-активными веществами этот процесс является необратимым и идет в две стадии. На первой белок связывается с детергентами по причине лиофобного взаимодействия неполярных доменов белка с лиофильными участками детергентов. Вторая стадия подразумевает собой процесс разворачивания молекул белка, благодаря чему происходит связывание лиофобных групп белка с детергентами. Скорее

всего, мицеллы детергентов имеют более высокую сольубилизационную емкость и числа агрегации по сравнению с образующимися мицеллами [52]. Для определения количества полимера в шроте необходимо воспользоваться формулой (1) (п. 2.4). Коэффициент внутреннего стандарта для всех образцов по формуле (2) принят  $k=10,65$ . Для образца, обработанного 0,5% раствором Brij-58:

$$P_{Brij-58}^{0,5\%} = \frac{((333682383+54015959)/409161544) \cdot 100 \cdot 1,5}{19,8} \cdot 10,65 = 76,45\%.$$

По аналогии рассчитываются остальные пробы:

$$P_{Brij-58}^{1\%} = 65,83\%;$$

$$P_{Brij-58}^{1,5\%} = 56,45\%;$$

$$P_{Brij-58}^{2,5\%} = 87,25\%;$$

$$P_{SDS}^{0,5\%} = 55,53\%;$$

$$P_{SDS}^{1\%} = 79,65\%;$$

$$P_{SDS}^{1,5\%} = 62,79\%;$$

$$P_{SDS}^{2,5\%} = 81,53\%.$$

Расчеты в п. 3.1 показали, что наибольшая степень очистки биомассы от примесей достигается с использованием 2,5% растворов с обоими детергентами. Ниже приведены хроматограммы образцов, обработанных этими растворами детергентов. С использованием других концентраций процент оставшихся примесей значительно выше (табл. 3).

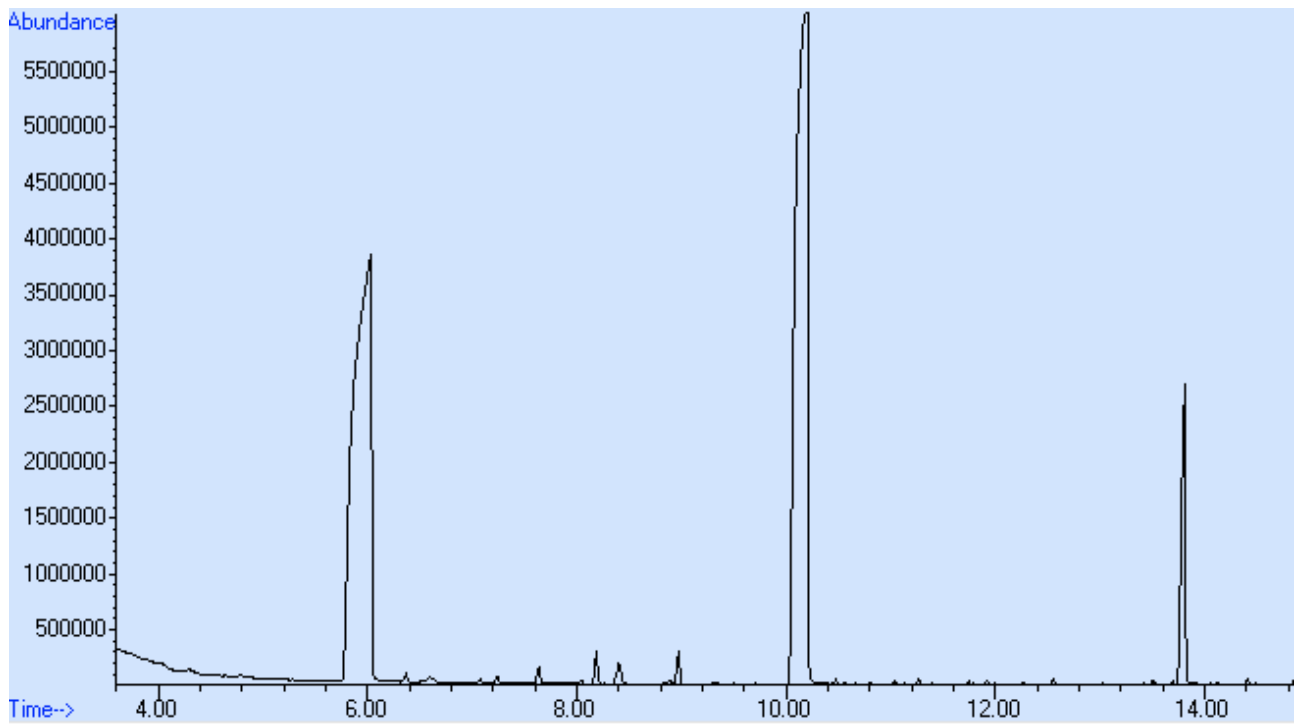


Рисунок 3 – Хроматограмма образца, обработанного 2,5 % р-ром Вгїј-58

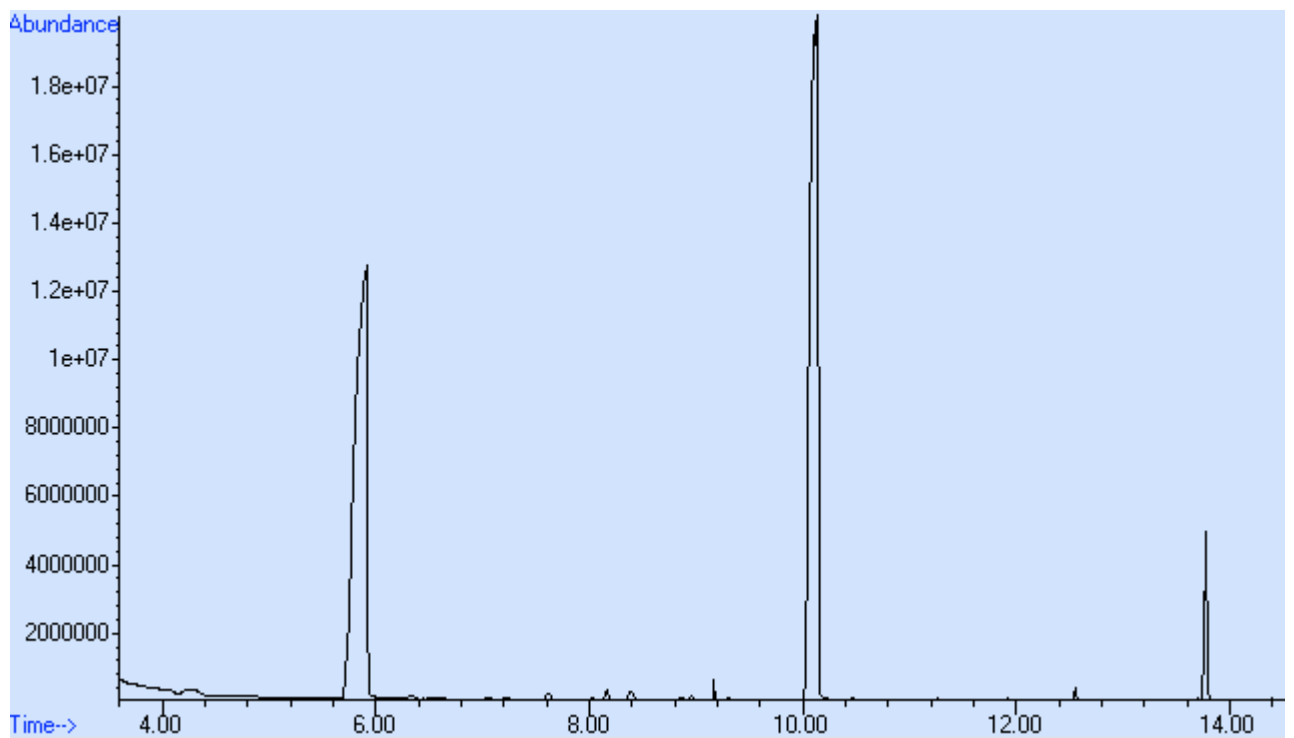


Рисунок 4 – Хроматограмма образца, обработанного 2,5 % р-ром SDS



Таблица 3 – Результаты хроматографии образцов после экстракции детергентами

Детергент	Концентрация детергента, %	Шрот после обработки а.с.б., г	Количество полимера в шроте по отношению к примесям, %
Brij-58	0,5	14,49	76,45
Brij-58	1	15,27	65,83
Brij-58	1,5	18,84	56,45
Brij-58	2,5	19,47	87,25
SDS	0,5	19,93	55,53
SDS	1	14,82	79,65
SDS	1,5	17,99	62,79
SDS	2,5	13,89	81,53

Исходя из полученных результатов, все образцы полимеров, обработанные безреагентными методом, нуждаются в доочистке органическими растворителями (п. 2.2), поскольку количество примесей составляет от 19 до 45%, что неприемлемо для использования ни в медицинских целях, ни в сельском хозяйстве. Результаты соответствуют описанию метода в работе Р.А. Holmes [14], где указано, что использование детергентов не может дать высокую степень чистоты целевого продукта (>95%), поэтому необходимо участие реагентов для доочистки.

Если взять во внимание то, что полимер после обработки детергентами содержит меньший процент примесей и разрушенную клеточную стенку, то предположительно на стадиях доочистки удастся уменьшить объемы затрачиваемых реагентов на экстракцию. Такой подход позволяет избежать образования азеотропных смесей, которые возникают при использовании этанола в качестве первичного экстрагента и гексана – в качестве осадителя.

Исходя из экспериментальных данных, для получения полимера с высокой степенью чистоты возникает необходимость в следующей стадии – очистке полученного шрота органическими растворителями. В качестве экстрагента и осадителя использовались дихлорметан и гексан (табл. 1).

Хроматограмма образца с наивысшей чистотой показана на рисунке 5. Подробное описание экспериментов и результатов представлено в таблице 4.

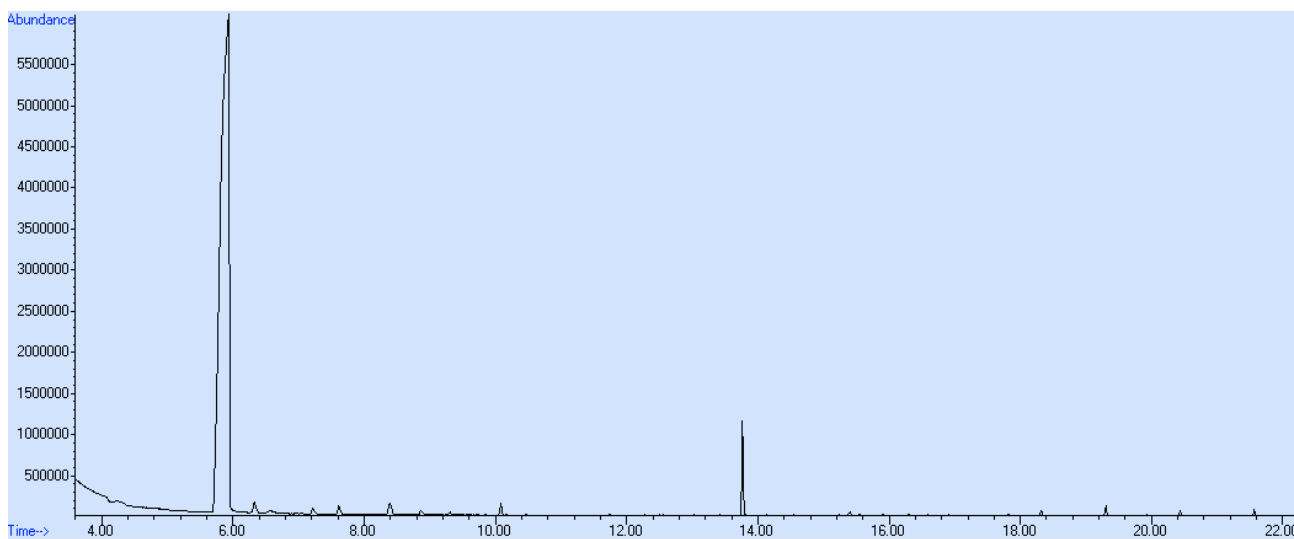


Рисунок 5 – Хроматограмма образца полимера очищенной биомассы, обработанной 1,5-процентом SDS

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.934	378	422	468	rUB	6059226	53453344	100.00%	96.005%
2	13.765	1822	1830	1853	rBU	1156507	1787167	3.34%	3.210%
3	18.321	2644	2649	2656	rM 3	62527	112324	0.21%	0.202%
4	19.305	2820	2826	2850	rM	126340	227597	0.43%	0.409%
5	20.440	3023	3030	3037	rM	64728	97301	0.18%	0.175%

Рисунок 6 – Информация о пиках полимера и примесей образца №7

Таблица 4 – Процент выхода и чистота полимера при использовании детергентов

№	1	2	3	4	5	6	7	8
Первичный экстрагент	0,5% p-p Brij-58	1% p-p Brij-58	1,5% p-p Brij-58	2,5% p-p Brij-58	0,5% p-p SDS	1% p-p SDS	1,5% p-p SDS	2,5% p-p SDS
Масса навески а.с.б., г	76,34	47,41	45,09	45,44	32,96	12,14	31,27	34,65
Содержание полимера в исходной биомассе, %	70,1	63,89	63,89	63,89	70,1	63,89	63,89	63,89

Окончание таблицы 4

Выделено полимера, %	68,02	80,22	60,05	90,21	35,97	65,07	95,95	67,07
Процент выделения полимера от исходной б/м	47,68	51,26	38,37	57,64	25,21	47,57	61,3	42,85
Чистота полученного полимера, %	97,12	98,83	98,43	94,77	96,48	95,12	99,83	96,37

Метод позволил получить образцы с низким остаточным содержанием примесей (0,03-5,23%). Образец под номером 6, обработанный 1,5% раствором додецилсульфата натрия, является полностью очищенным от примесей. Обработка биомассы таким раствором приводит к практически полному высвобождению полимера. Образцы под номерами 2 и 3, обработанные 1% и 1,5% растворами Brij-58, также имеют высокий процент чистоты.

С помощью газового хроматографа с масс-спектрометрическим детектором и дифференциально-сканирующего калориметра (п. 2) определены следующие физико-химические характеристики образцов полимеров (табл. 5):

Таблица 5 – Физико-химические характеристики образцов полимеров

Детергент	Концентрация детергента, %	Молекулярная масса, кД	Полидисперсность	Температура плавления, деградации, кристаллизации, °С
Brij-58	0,5	$M_w = 6,35 \cdot 10^5$ $M_z = 1,32 \cdot 10^6$	D=3,18	$t_{\text{плав}} = 173,77;$ $t_{\text{дегр}} = 296,49;$ $t_{\text{крист}} = 60,22$
Brij-58	1	$M_w = 6,79 \cdot 10^5$ $M_z = 1,26 \cdot 10^6$	D=2,55	$t_{\text{плав}} = 174,5;$ $t_{\text{дегр}} = 296,38;$ $t_{\text{крист}} = 66,73$
Brij-58	1,5	$M_w = 7,09 \cdot 10^5$ $M_z = 1,42 \cdot 10^6$	D=3,4	$t_{\text{плав}} = 173,97;$ $t_{\text{дегр}} = 295,65;$ $t_{\text{крист}} = 68,24$
Brij-58	2,5	$M_w = 6,51 \cdot 10^5$ $M_z = 1,29 \cdot 10^6$	D=2,99	$t_{\text{плав}} = 174,36;$ $t_{\text{дегр}} = 296,96;$ $t_{\text{крист}} = 66,8$

## Окончание таблицы 5

SDS	0,5	$M_w=6,71 \cdot 10^5$ $M_z=1,18 \cdot 10^6$	D=2,92	$t_{\text{плав}}=175,62;$ $t_{\text{дегр}}=297,32;$ $t_{\text{крист}}=58,37$
SDS	1	$M_w=6,64 \cdot 10^5$ $M_z=1,29 \cdot 10^6$	D=2,86	$t_{\text{плав}}=174,21;$ $t_{\text{дегр}}=284,73;$ $t_{\text{крист}}=62,28$
SDS	1,5	$M_w=6,85 \cdot 10^5$ $M_z=1,34 \cdot 10^6$	D=3,01	$t_{\text{плав}}=170,16;$ $t_{\text{дегр}}=293,91;$ $t_{\text{крист}}=73,06$
SDS	2,5	$M_w=6,41 \cdot 10^5$ $M_z=1,3 \cdot 10^6$	D=3,05	$t_{\text{плав}}=171,84;$ $t_{\text{дегр}}=296,9;$ $t_{\text{крист}}=70,41$

В результате полученных данных установлено, что использование детергентов в качестве первичных экстрагентов не влияет на физико-химические свойства конечного продукта, значения молекулярной массы и полидисперсности лежат в пределах нормы [45].

### 3.2 Влияние экстрагента на содержание примесей в полимере

В данном эксперименте показано влияние первичного экстрагента на чистоту полимера (табл. 6). Главным источником примесей являются липиды и жирные кислоты, так как в результате экстракции органическими растворителями извлечение происходит вместе с полигидроксиалканоатами, что является причиной его последующего загрязнения. Поэтому рассмотрена возможность на первой стадии экстрагировать липиды и жирные кислоты, затем из обезжиренной биомассы проводить извлечение полимера. Для этих целей использовались следующие растворители: этиловый спирт, ацетон, изопропанол в качестве первичных экстрагентов, дихлорметан – для экстракции обезжиренного полимера (п. 2; патенты РФ № 2333962, US4358583, US4391766; Киселев Е.Г., 2012). В качестве осадителя применялся этанол.

В зависимости от типа первичного экстрагента меняется количество экстрактивных веществ, отделенных от биомассы в процессе экстракции, что напрямую влияет на чистоту конечного продукта. Поэтому важно на первом этапе отделить максимально возможное количество примесей. Использовались 3 экспериментальные биомассы из разных периодов культивирования с высоким содержанием полимера. Оценка чистоты проводилась по результатам хроматографии. Программно определялись площади пиков, затем по разности сумм пиков полигидроксиалканоатов и сумм пиков различных примесей получался процент полимера по отношению к примесям. На примере образца №1 на рис. 7 все пики, кроме последнего на 20-й минуте, являются полигидроксиалканоатами. На рис. 8 показана подробная информация о выбранных пиках.

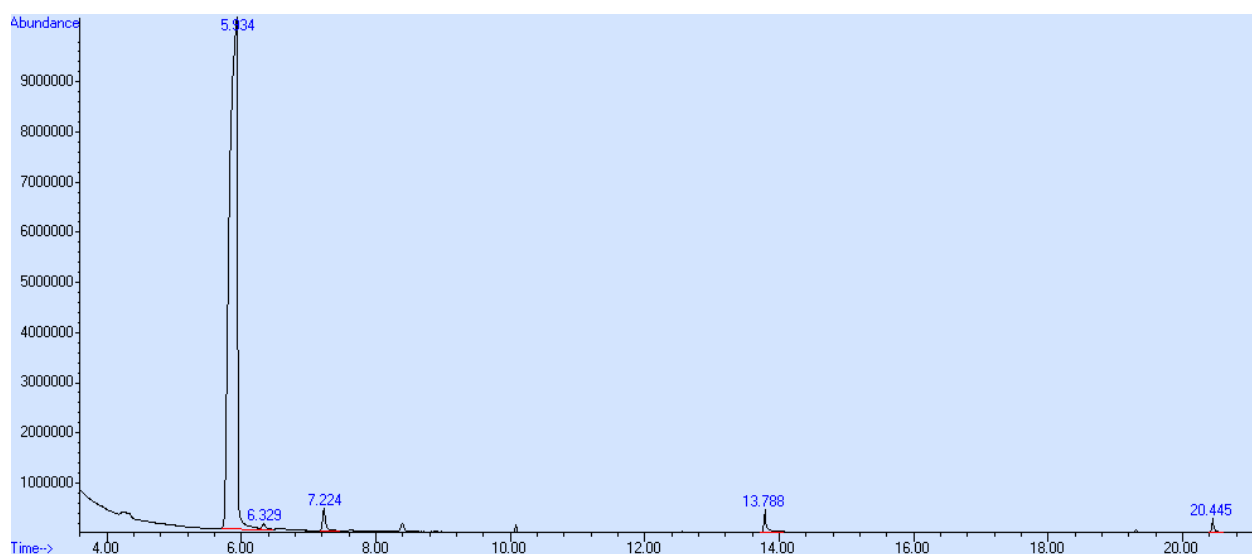


Рисунок 7 – Хроматограмма пиков полимера и примесей образца №1, обработанного этанолом

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.934	381	422	484	rBU	10208669	82211154	100.00%	95.803%
2	6.329	487	493	520	rUB2	105309	383050	0.47%	0.446%
3	7.224	645	654	699	rBU2	443712	1357818	1.65%	1.582%
4	13.788	1823	1834	1882	rBU	444429	1249257	1.52%	1.456%
5	20.445	3023	3031	3063	rBU	265579	611551	0.74%	0.713%

Рисунок 8 – Информация о пиках образца №1, обработанного этанолом

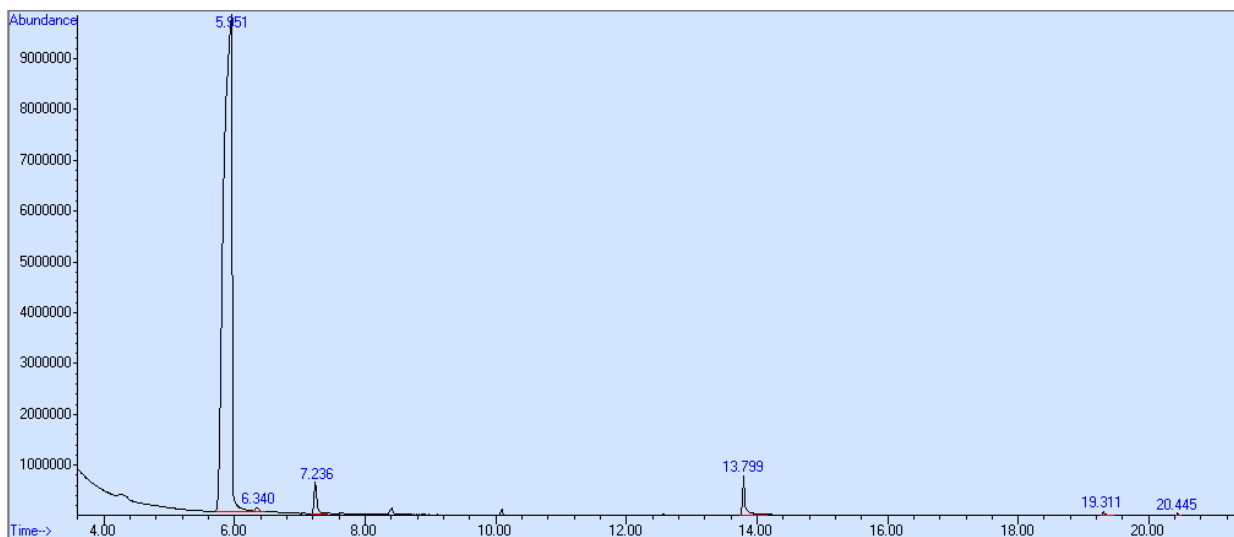


Рисунок 9 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №2, обработка этанолом

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.951	381	425	487	rBU	9784516	83793902	100.00%	94.803%
2	6.340	489	495	519	rUB2	93075	337574	0.40%	0.382%
3	7.236	646	656	690	rBU	613491	1855055	2.21%	2.099%
4	13.799	1824	1836	1898	rBU	773382	2112870	2.52%	2.390%
5	19.311	2819	2827	2858	rBU2	79223	206746	0.25%	0.234%
6	20.445	3026	3031	3043	rM	40356	81036	0.10%	0.092%

Рисунок 10 – Информация о пиках образца №2, обработка этанолом

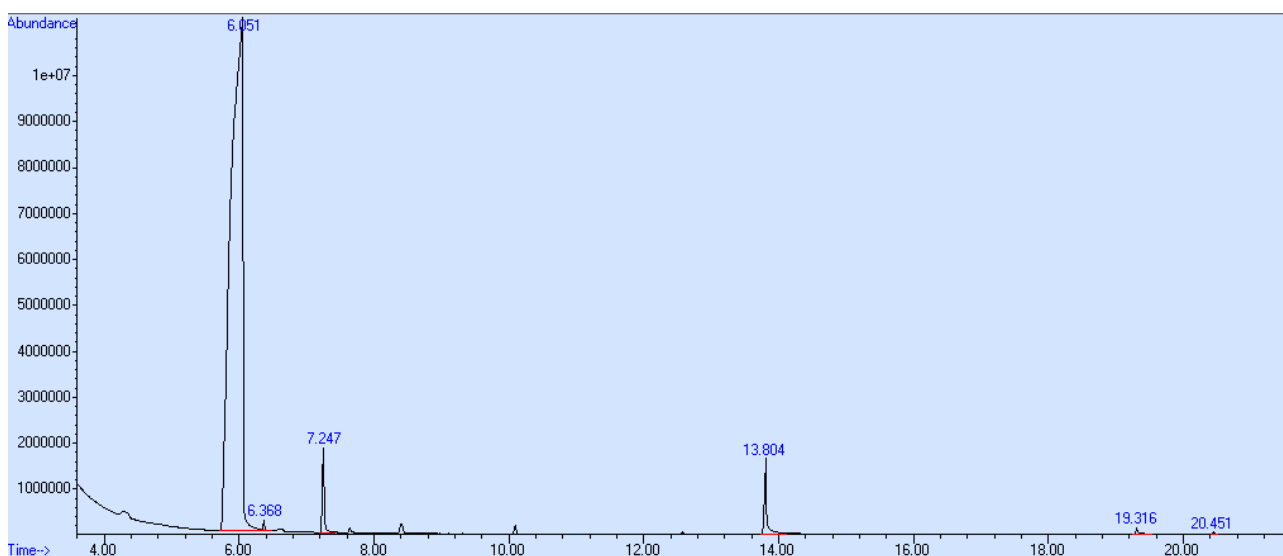


Рисунок 11 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №3, обработка этанолом

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	6.051	383	443	493	rBU	11175392	136427157	100.00%	94.418%
2	6.368	495	500	523	rUB	229608	431700	0.32%	0.299%
3	7.247	649	658	689	rBU	1843992	3340967	2.45%	2.312%
4	13.804	1824	1837	1892	rBU	1645155	3752628	2.75%	2.597%
5	19.316	2817	2828	2869	rBU2	139619	429851	0.32%	0.297%
6	20.451	3026	3032	3046	rM	53443	110068	0.08%	0.076%

Рисунок 12 – Информация о пиках образца №3, обработка этанолом

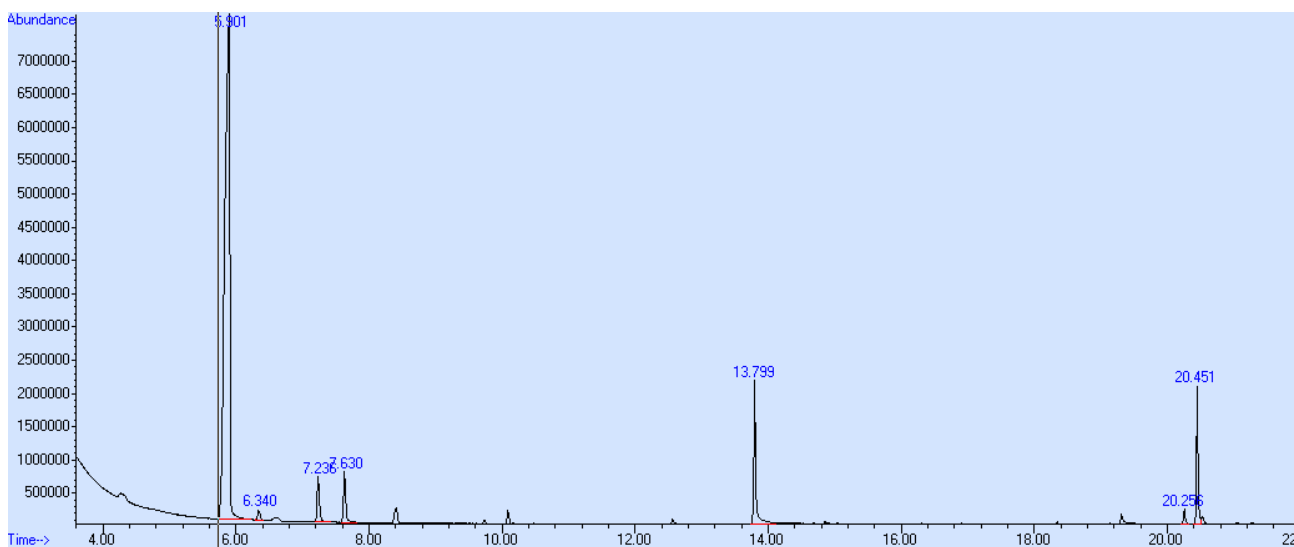


Рисунок 13 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №4, обработка ацетоном

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.901	385	416	476	rUB	7607578	39449068	100.00%	76.714%
2	6.340	488	495	509	rUB	151738	439738	1.11%	0.855%
3	7.236	647	656	691	rBU	678402	1710887	4.34%	3.327%
4	7.630	718	727	762	rUB	760776	1804403	4.57%	3.509%
5	13.799	1825	1836	1893	rBU	2155499	4316703	10.94%	8.394%
6	20.256	2989	2997	3012	rBU	215464	381459	0.97%	0.742%
7	20.451	3023	3032	3041	rBU	2068874	3321527	8.42%	6.459%

Рисунок 14 – Информация о пиках образца №4, обработка ацетоном

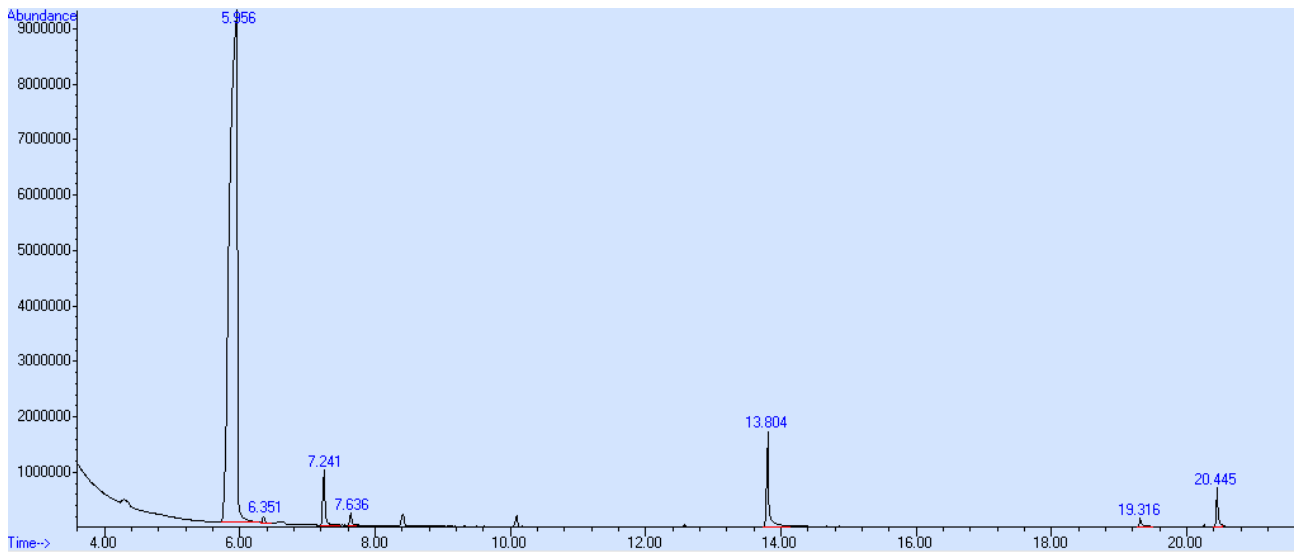


Рисунок 15 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №5, обработка ацетоном

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.956	385	426	486	rBU	9244764	73478180	100.00%	89.364%
2	6.351	491	497	519	rUB	127220	341521	0.46%	0.415%
3	7.241	648	657	704	rUB	993260	2237230	3.04%	2.721%
4	7.636	721	728	747	rBU	210076	477098	0.65%	0.580%
5	13.804	1825	1837	1897	rBU	1720926	3854728	5.25%	4.688%
6	19.316	2819	2828	2865	rBU2	158086	480882	0.65%	0.585%
7	20.445	3022	3031	3045	rBU	703915	1354068	1.84%	1.647%

Рисунок 16 – Информация о пиках образца №5, обработка ацетоном

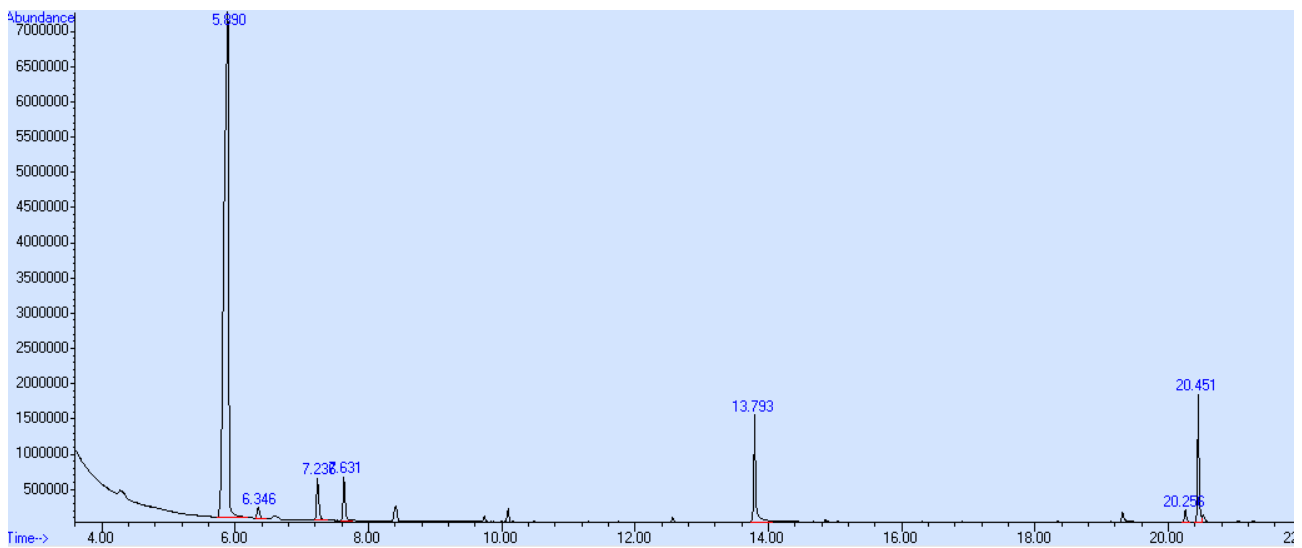


Рисунок 17 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №6, обработка ацетоном



peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.890	386	414	471	rUB	7176937	33352072	100.00%	77.577%
2	6.346	489	496	520	rUB	163089	493696	1.48%	1.148%
3	7.236	648	656	684	rBU	599040	1425475	4.27%	3.316%
4	7.631	719	727	749	rBU	622272	1398192	4.19%	3.252%
5	13.793	1825	1835	1883	rBU	1517518	3046276	9.13%	7.086%
6	20.256	2988	2997	3011	rBU	170583	313860	0.94%	0.730%
7	20.451	3022	3032	3041	rBU	1811943	2962848	8.88%	6.892%

Рисунок 18 – Информация о пиках образца №6, обработка ацетоном

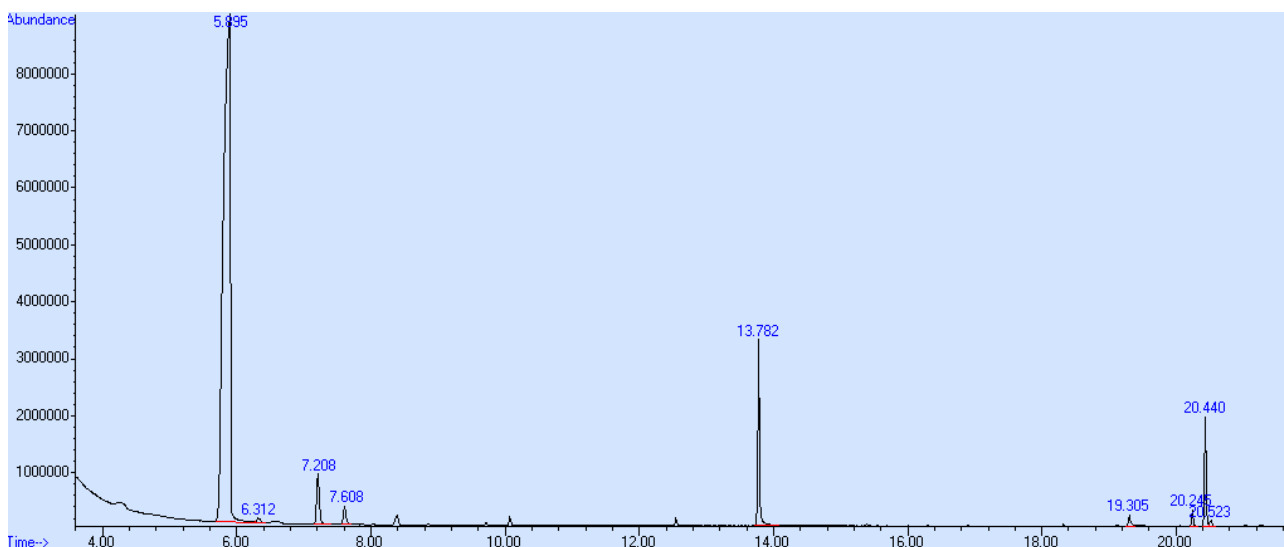


Рисунок 19 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №7, обработка изопропанолом

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.895	378	415	481	rUU	8918196	61640003	100.00%	81.923%
2	6.312	484	490	514	rUB2	81376	309511	0.50%	0.411%
3	7.208	642	651	689	rUB	878571	2492998	4.04%	3.313%
4	7.608	715	723	742	rBU2	323128	896988	1.46%	1.192%
5	13.782	1822	1833	1889	rBU	3267290	5752684	9.33%	7.646%
6	19.305	2818	2826	2841	rBU	199750	453848	0.74%	0.603%
7	20.245	2988	2995	3011	rBU	289041	441095	0.72%	0.586%
8	20.440	3022	3030	3038	rBU	1918157	2981190	4.84%	3.962%
9	20.523	3038	3045	3060	rUB5	97547	273456	0.44%	0.363%

Рисунок 20 – Информация о пиках образца №7, обработка изопропанолом

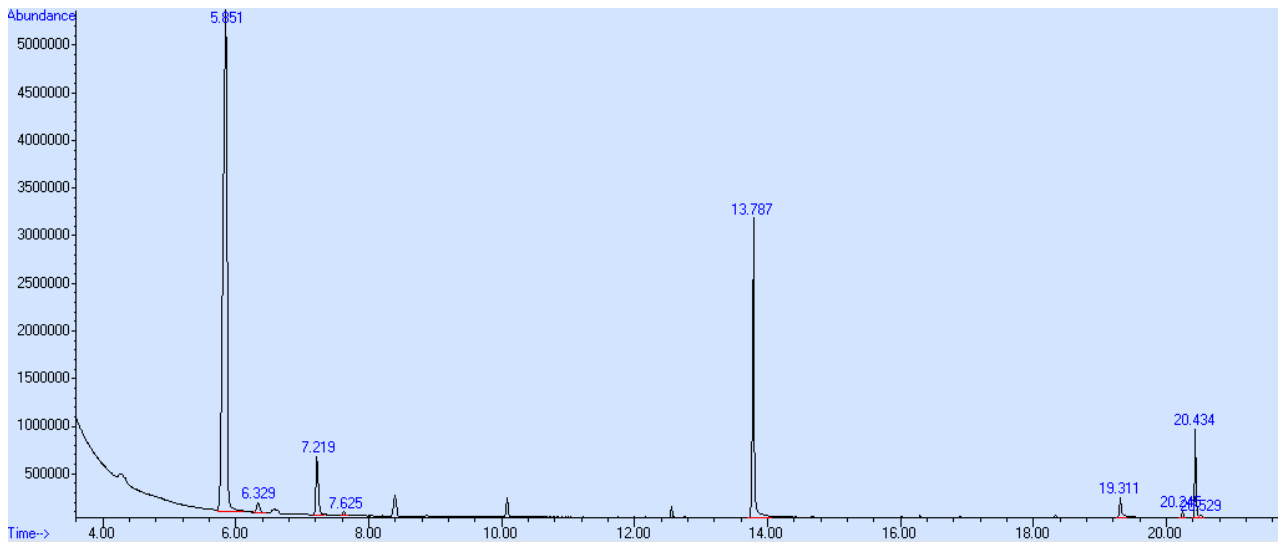


Рисунок 21 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №8, обработка  
 изопропанолом

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.851	384	407	456	rUB	5263702	22007463	100.00%	69.800%
2	6.329	486	493	516	rUB2	107771	347389	1.58%	1.102%
3	7.219	645	653	672	rBU	616056	1561470	7.10%	4.952%
4	7.625	720	726	738	rUB4	34374	87373	0.40%	0.277%
5	13.787	1820	1834	1882	rBU	3141591	5443855	24.74%	17.266%
6	19.311	2818	2827	2842	rBU	211577	468738	2.13%	1.487%
7	20.245	2984	2995	3006	rBU	73768	112968	0.51%	0.358%
8	20.434	3022	3029	3039	rBU	931546	1425025	6.48%	4.520%
9	20.529	3039	3046	3057	rUB6	30880	75132	0.34%	0.238%

Рисунок 22 – Информация о пиках образца №8, обработка изопропанолом

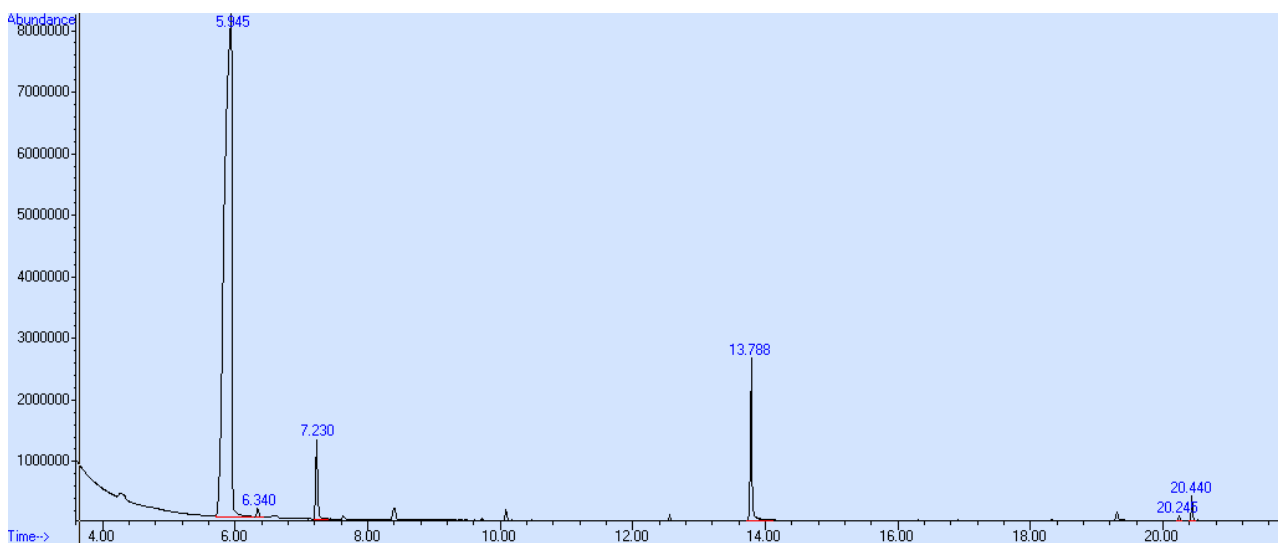


Рисунок 23 – Хроматограмма пиков полимера и примесей, образец №9, обработка  
 изопропанолом

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	5.945	383	424	487	rUU	8173264	63759962	100.00%	88.315%
2	6.340	489	495	513	rUB	143438	366798	0.58%	0.508%
3	7.230	647	655	690	rUB	1289249	2756928	4.32%	3.819%
4	13.788	1822	1834	1891	rBU	2638308	4566331	7.16%	6.325%
5	20.245	2989	2995	3006	rM	77724	122674	0.19%	0.170%
6	20.440	3023	3030	3042	rBU	396751	623463	0.98%	0.864%

Рисунок 24 – Информация о пиках образца №9, обработка изопропанолом

Таблица 6 – Чистота полимера при использовании различных растворителей

№	Первичный экстрагент	Биомасса	Выход примесей после первичной экстракции, %	Выход полимера, %	Чистота полимера, %
1	Этанол	1	5,36	41,64	99,29
2	Этанол	2	4,67	44,68	99,67
3	Этанол	3	6,16	59,56	99,63
4	Ацетон	1	0,82	12,90	92,80
5	Ацетон	2	0,67	72,72	97,77
6	Ацетон	3	0,95	16,60	92,38
7	Изопропанол	1	1,02	49,82	94,49
8	Изопропанол	2	1,43	62,14	93,40
9	Изопропанол	3	1,58	40,18	98,97

По результатам хроматографии установлено, что использование этанола на стадии экстракции наиболее эффективно влияет на удаление липидов из биомассы и позволяет в дальнейшем получить высокоочищенный полимер с чистотой >99 %. Объясняется это тем, что молекулы этанола способны ослаблять силы притяжения между молекулами липидов в мембране клетки, получая способность свободно перемещаться в пределах бислоя липидов. Происходит ослабление жесткости и структурной организации клетки, она становится менее вязкой и более текучей [47], в результате чего на следующем этапе экстракции с использованием дихлорметана происходит беспрепятственное высвобождение чистых полимерных гранул, чего нельзя добиться с применением ацетона и изопропанола. Исходя из этого, предложена

схема, в которой использование этанола на начальной и дихлорметана на конечной стадии даст высокую чистоту целевому продукту.

### 3.3 Выход полимера при экстракции этанолом

Для постановки эксперимента использовались биомассы из различных культивационных периодов. Экстрагировалась как сырая, так и лиофильно/температурно высушенная биомассы. По п. 2.1 получился относительно небольшой процент выхода полимера (в пределах от 5% до 26%) вследствие перегрева растворов экстрагентов, который привел к деградации молекул полигидроксиалканоатов. Подробное описание в табл. 7.

Таблица 7 – Выход полимера при первичной экстракции этиловым спиртом

№	1	2	3	4	5
Дата культивирования биомассы	10.07.2014	04.02.2015	20.02.2015	20.02.2015	20.02.2015
Метод сушки	Термообработка при 105°C	Леофильно высушенная	Сырая	Термообработка при 105°C	Леофильно высушенная
Масса взятой пробы, г	82,05	100,02	100,04	106,05	90,7
Экстрагент	Дихлорметан	Дихлорметан	Дихлорметан	Дихлорметан	Хлороформ
Влажность, %	4,626	4,123	49,429	1,29	23,697
Масса пробы без учета влаги, г	78,254	95,896	50,591	104,682	69,207
Содержание полимера в исходной биомассе, %	33,7	70,1	63,89	63,89	63,89
Масса выделенного полимера, г	20,36	19,08	2,72	10,68	6,34
Процент выделения полимера от исходной биомассы	26,018	19,899	5,376	10,202	9,161
Выделено полимера, %	77,2039	28,3868	8,4151	15,9686	14,3386

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате эксперимента определена возможность использования детергентов в качестве солюбилизатора. Установлено, что использование детергентов менее затратно, снижает количество используемых взрывоопасных реагентов, но использование данного метода не дает высокий процент очистки полимера (>97%), поэтому присутствует необходимость в доочистке ПГА органическими растворителями. При использовании детергента Brij-58 с концентрацией 1,5% в качестве первичного экстрагента с доочисткой органическими растворителями получается чистый полимер (99,97%), с минимальным содержанием примесей.

На первичной экстракции использование и додецилсульфата натрия, и полиоксиэтилен-20-цетилового эфира с концентрацией растворов в 2,5% достигнуты лучшие результаты по удалению примесей из биомассы (содержание примесей в шроте составило менее 20%). С использованием других концентраций детергентов процент примесей значительно выше.

Недостатки использования детергентов:

- Большой расход воды (45 л. при промывке на 1 кг. биомассы)
- Вероятность содержания остаточных ПАВ в солюбилизированной биомассе;
- Необходимость наличия стоков для утилизации солюбилизированной биомассы;
- Невозможно получить достаточно чистый ПГА на начальном этапе экстракции.

2. Очистка ПГА органическими растворителями, такими как этанол, ацетон и изопропанол, позволяет получить высокоочищенный биополимер. Наиболее высокую чистоту ПГА возможно получить при использовании этанола (>99%). Недостатками использования метода являются высокая стоимость, высоколетучесть токсичность и взрывоопасность растворителей. Также, вследствие чувствительности полимера к высоким температурам

необходимо проводить экстракцию при температурах, близким к кипению экстрагента.

3. На основании полученных данных разработана наиболее эффективная технологическая схема экстракции биомассы бактерий, позволяющая получать полимер с чистотой более 99%. Она предполагает использование этанола на начальной и дихлорметана – на конечной стадии экстракции с возможностью получения липидов и белкового шрота.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы выразить благодарность в написании магистерской диссертации своему научному руководителю Сергею Викторовичу Барановскому за помощь в составлении и оформлении диссертации, за хорошую подготовку к защите и содействию в создании презентации. Киселеву Евгению Геннадьевичу – в постановке экспериментов, подбору материалов, необходимых для исследований и в описании полученных результатов. Виноградовой Ольге Николаевной – за помощь в обучении использованию хроматографа и проведении процессов хроматографии.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Braunegg G., Koller M., Hesse P.J., Kutschera C., Bona R., Hermann C., Horvat P., Neto J., Dos Santos Pereira L. Production of plastics from waste derived from agrofood industry // Renewable resources and renewable energy: a global challenge / Ed. Graziani M., Fornasiero P. – CRC Press, Taylor and Francio Group, Boca Raton. – 2007. – P. 119–135.
2. Breitenbach A., Mohr D., Kissel T. Biodegradable semi-crystalline comb polyesters influence the microsphere production by means of a supercritical fluid extraction technique (ASES) // J. Control. Rel. – 2000. – V. 63, I.1-2. – P. 53-68.
3. Chen, Y.; Xu, Q.; Yang, H.; Gu, G. Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactantchelate aqueous system. *Process Biochem.* 2001, 36, 773-779.
4. Choi J., Lee S. Y. Efficient and economical recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals // *Biotechnology and bioengineering.* – 1999. – T. 62. – №. 5. – C. 546-553.
5. Choi J., Lee S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999, b. – Vol. 51. – P. 13–21.
6. Choi J., Lee S.Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation // *Bioprocess Eng.* – 1997. – Vol. 17. – P. 335–342.
7. Devdatt L. Kurdikar F., Strauser E., Solodar A. J., Mark D. P. // US Patent 6087471. – 2000.
8. [en.european-bioplastics.org/](http://en.european-bioplastics.org/)



9. Gumel A. M., Annuar M. S. M., Chisti Y. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates //Journal of Polymers and the Environment. – 2013. – Т. 21. – №. 2. – С. 580-605.
10. Gurtovenko A. A., Anwar J. Interaction of ethanol with biological membranes: the formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance //The Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – Т. 113. – №. 7. – С. 1983-1992.
11. Hahn S.K., Chang Y.K., Kim B.S. Et al. Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersion of sodium hypochlorite solution and chloroform // Biotechnol. Bioeng. – 1994. – Vol. 44. – P. 256–261.
12. Hejazi P., Vasheghani-Farahani E., Yamini Y. Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) Recovery //Biotechnology progress. – 2003. – Т. 19. – №. 5. – С. 1519-1523.
13. Holmes P. A., Lim G. B. Separation processor of a 3-hydroxybutyrate polymer : пат. EP0145233B2 Франция. – 1992.
14. Holmes, P. A.; Lim, G. B. Separation process. U.S. Patent 4,910,145, 1990.
15. Jacquel N. et al. Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates) //Biochemical Engineering Journal. – 2008. – Т. 39. – №. 1. – С. 15-27.
16. Jian Yu. // US Patent 7514525. – 2009.
17. Kapritchkoff F. M. et al. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha* //Journal of biotechnology. – 2006. – Т. 122. – №. 4. – С. 453-462.
18. Keshavarz T., Roy I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda //Current opinion in microbiology. – 2010. – Т. 13. – №. 3. – С. 321-326.
19. Khosravi-Darani K. et al. Effect of process variables on supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* cells for poly (R-hydroxybutyrate) recovery //Biotechnology progress. – 2004. – Т. 20. – №. 6. – С. 1757-1765.

20. Kim M. et al. Recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate //Biotechnology letters. – 2003. – T. 25. – №. 1. – C. 55-59.
21. Kiselev E. G. et al. Scaling of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates Synthesis Technology in Pilot Production Conditions //Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2014. – T. 2. – №. 7. – C. 134-147.
22. Kunasundari B., Sudesh K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates //Express Polym. Lett. – 2011. – T. 5. – №. 7. – C. 620-634.
23. Morgan J. W., Forster C. F., Evison L. A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges //Water Research. – 1990. – T. 24. – №. 6. – C. 743-750.
24. Page W. J., Cornish A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate //Applied and environmental microbiology. – 1993. – T. 59. – №. 12. – C. 4236-4244.
25. Ramsay J. A. et al. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents //Biotechnology Techniques. – 1994. – T. 8. – №. 8. – C. 589-594.
26. Riedel S. L. et al. Recovery of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents //Biotechnology and bioengineering. – 2013. – T. 110. – №. 2. – C. 461-470.
27. Rigaud J. L., Pitard B., Levy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1995. – T. 1231. – №. 3. – C. 223-246.
28. Rodrigues M.F.A., Silva LF, Gomez JGC, Valentin HE, Steibüchel A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypentonic acid) from unrelated substances by *Burkholderia sp.* //Appl Microbiol Biotechnol. – 1995. – V. 43. – P. 880-886.

29. Saharan B. S. et al. Bioplastics-for sustainable development: a review //International Journal of Microbial Resource technology. – 2012. – T. 1. – №. 1. – C. 11-23.
30. Stein R.S. Polymer recycling: opportunities and limitations// Proc.Natl.Acad. Sci. – 1992. – V. 89. – P.835-838.
31. Steinbüchel A., Aerts K., Babel W., Föllner C., Liebergesell M., Madkour M.H., Mayer F., Pieper-Fürst V., Pries A., Valentin H.E., Wieczorek R. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acids inclusions //Can. J. Microbiol. – 1995a. – V.41. – № 1. – P.94-105.
32. Steinbüchel A., Valentin H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids //FEMS Microbiol Lett. – 1995 b. – V. 128. – P.219-228.
33. Thakor N., Lütke-Eversloh T., Steinbüchel A. 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 // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – P. 835–841.
34. 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. – C. 595-606.
35. Vanalutem N., Gilain J. Process for separating  $\beta$ -hydroxybutyrate from a biomass : пат. US4310684 CIIIA. – 1982.
36. Volova T.G. Polyhydroxyalkanoates–Plastic Materials of the 21st Century: production, properties, application. NY: Nova Science Pub, 2004. – 282 p.
37. Yang Y. H. et al. Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) //Biotechnology letters. – 2011. – T. 33. – №. 5. – C. 937-942.
38. Yasotha K. et al. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration //Biochemical engineering journal. – 2006. – T. 30. – №. 3. – C. 260-268.

39. Yu J., Chen L. X. L. Cost-Effective Recovery and Purification of Polyhydroxyalkanoates by Selective Dissolution of Cell Mass //Biotechnology progress. – 2006. – Т. 22. – №. 2. – С. 547-553.
40. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа: Учебник для вузов / А. Ф. Жуков, И. Ф. Колосова, В. В. Кузнецов и др.; Под ред. О. М. Петрухина – М.: Химия, 2001. – 496 с.
41. Вайнберг Р. Ш. и др. Теплофизические проблемы и практические результаты повышения энергоэффективности извлечения и термообработки высокомолекулярных биополимеров //Промышленная теплотехника. – 2007.
42. Волова Т. Г. и др. Фундаментальные основы производства и применения биodeградируемых полигидроксиалканоатов. – 2012.
43. Волова Т. Г., Volova T. G. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов. – 2014.
44. Волова Т.Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксиалканоаты-биоразрушаемые полимеры для медицины // под ред. ак. В. И. Шумакова. 2-е изд., перераб. и доп. Красноярск: Изд-во Платина.– 2006.
45. Жила Н. О. и др. К вопросу о внутриклеточной деградации полигидроксibuтирата. – 2015.
46. Кагава Я. Биомембраны //М.: Высшая школа. – 1985.
47. Карпов А. М., Шакирзянов Г. З. Самозащита от алкоголизации. Образовательно-воспитательные основы профилактики и психотерапии зависимости от алкоголя //М: Олита. – 2004.
48. Киселев Е. Г. и др. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. – 2014.
49. Киселев Е. Г. и др. Техничко-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов. – 2012.
50. Киселев Е. Г. Техничко-технологические основы биосинтеза резервных полигидроксиалканоатов водородными бактериями. – 2012.

51. Фомин В.А., Гузеев В.В. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования// Пластические массы. – 2001. – № 2. – С.42-46.
52. Холмберг К. и др. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах //М.: Бином. Лаборатория знаний. – 2007. – Т. 528.
53. Шершнева А. М. и др. Конструирование микрочастиц на основе резорбируемых полимеров Биопластотан с применением метода распылительной сушки. – 2014.