

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.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
Оптимизация метода экстракции биополимеров из биомассы
бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

| | | |
|----------------------|---------------|------------------------------------|
| Научный руководитель | _____ | <u>доцент, к.т.н. Е.Г. Киселёв</u> |
| | подпись, дата | инициалы, фамилия |
| Выпускник | _____ | <u>С.Ю. Воронина</u> |
| | подпись, дата | инициалы, фамилия |
| Рецензент | _____ | <u>доцент, к.т.н. В.А. Кожухов</u> |
| | подпись, дата | инициалы, фамилия |

Красноярск 2018

Реферат

Магистерская диссертация по теме: «Оптимизация метода экстракции биополимеров из биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646» содержит 65 страницы текстового документа, 29 иллюстраций, 12 таблиц, 13 формул и 58 использованных источников.

ПОЛИГИДРОКИАЛКАНОАТЫ, БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОМАССА, ПОЛИМЕР, ЭКСТРАКЦИЯ, НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ, ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ, *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* В10646.

Цель: исследование влияния параметров обработки биомассы *Cupriavidus eutrophus* В-10646 (*C. eutrophus* В-10646) этанолом на выход и физико-химические свойства ПГА.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

- наработка биомассы бактерий *C. eutrophus* В-10646 на опытной ферментационной линии;
- исследование влияния технологических параметров спиртовой экстракции: температура, время, концентрация этанола, соотношение этанол:биомасса, на выход экстрактивных веществ, чистоту и физико-химические свойства ПГА;
- выполнить оптимизацию процесса с использованием методов математической статистики - регрессионный анализ в полном факторном эксперименте.

Актуальность исследования заключается в отсутствии обоснованной модели экстракции ПГА, удовлетворяющая масштабу крупного производства, а также экономическим факторам. Ввиду этого, предложены математические модели для наиболее важных параметров извлечения продуктов биотехнологического синтеза. Оценка влияния технологических параметров на выделение продуктов биотехнологического синтеза в процессе экстракции ПГА является необходимым для реализации крупномасштабного производства.

Содержание

| | стр. |
|--|------|
| Введение..... | 4 |
| 1 Обзор литературы..... | 5 |
| 1.1 Полигидроксиалканоаты: структура и свойства | 5 |
| 1.2 Получение биополимера..... | 7 |
| 1.3 Выделение продуктов биотехнологического синтеза..... | 10 |
| 1.4 Молекулярно - массовые характеристики полимера..... | 16 |
| 1.5 Оптимизация первого этапа процесса экстракции: кинетика и моделирование..... | 17 |
| 2 Методы исследования..... | 19 |
| 2.1 Исследуемые микроорганизмы..... | 19 |
| 2.2 Условия роста бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646..... | 19 |
| 2.3 Определение сухой биомассы клеток | 22 |
| 2.4 Выбор факторов для плана оптимизации | 22 |
| 2.5 Методика проведения математической обработки процессов экстракции ПГА..... | 23 |
| 2.6 Методы выделения продуктов биотехнологического синтеза. | 28 |
| 2.7 Метод спиртовой экстракции..... | 28 |
| 2.8 Исследование содержания и состава ПГА..... | 30 |
| 2.9 Определение молекулярной массы ПГА | 30 |
| 3. Экспериментальная часть..... | 32 |
| 3.1 Накопление биомассы бактерий культуры <i>C.eutrophus</i> B10646... | 32 |
| 3.2 Факторы, влияющие в процессе экстракции на параметры процесса выделения продуктов биотехнологического синтеза..... | 35 |
| 3.3 Многофакторный анализ | 38 |
| 3.4 Определение оптимального режима процесса экстракции биополимера | 55 |
| Выводы..... | 56 |
| Список литературы..... | 58 |

Введение

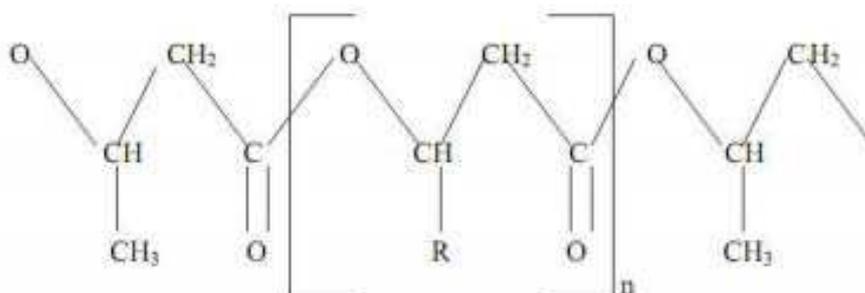
Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой перспективные сложные полиэфиры, полученные бактериями путем аэробной ферментации с использованием разных источников углерода. Эти биополимеры полностью биodeградируются в аэробных и анаэробных условиях, а также обладают эластомерными и термопластичными свойствами. Однако, несмотря на усилия, поставленные к разработке рентабельных ферментативных систем, стоимость производства ПГА по-прежнему остается существенно высокой, препятствуя использованию этих биополимеров в качестве товара [1].

Из ПГА возможно получение гибких пленок различной толщины, в том числе полупроницаемых мембран, нитей, нетканых материалов, различных полых форм (бутыли, контейнеры, коробки и пр.), а также гелей и клеев. 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. Масштабы применения ПГА в настоящее время сдерживаются достаточно высокой стоимостью. Расходы на извлечение ПГА из общей стоимости производственного процесса может составлять более чем 50 % стоимости конечного продукта [2, 3]. Существуют различные методы извлечения ПГА. Эти методы включают использование растворителей, химическое вываривание, ферментативное вываривание, механическая экстракция с гомогенизацией с высоким давлением и ультразвуком, используют комбинацию этих методов. При крупномасштабном производстве, сбор и очистка биополимера от остатков биомассы представляют собой решающую стадию, определяющую практическую применимость технологии. Однако возрастающие требования к охране окружающей среды, с одной стороны, и имеющиеся перспективы снижения стоимости биополимеров за счет повышения эффективности производства, с другой, делают ПГА одним из перспективных материалов.

1 Обзор литературы

1.1 Полигидроксиалканоаты: структура и свойства

ПГА - это сложные полиэфиры гидроксиалканоатов (рисунок 1), которые накапливаются внутриклеточно в виде аморфных, жидких гранул, представляющих собой запас энергии. Биополимеры синтезируются и сохраняются в большинстве бактерий (грамположительных, грамотрицательных) при стрессовых состояниях и накапливаются в виде внутриклеточных гранул [4]. Средний размер гранул ПГА составляет около 0,2-0,5 мкм. Для извлечения ПГА из гранул необходимо разрушить клеточную стенку бактерий и удалить белковый слой, который обволакивает гранулы. ПГА являются биоразлагаемыми, биосовместимыми термопластами, очень сходными с нефтехимическими полимерами, такими как полистирол и полиэтилен. Они имеют многочисленные потенциальные применения, особенно в медицине и фармацевтике и таких отраслях, как тканевая инженерия. Одним из ключевых членов ПГА является поли-3-гидроксибутират [П(ЗГБ)], который впервые был обнаружен в бактериальных клетках *Bacillus megaterium* в 1925 году [5].



n – варьируется от 600 до 35000

R-группа: метил (C4) Поли(3-гидроксибутират);

этил (C5) Поли(3-гидроксивалерат);

пропил (C6) Поли(3-гидроксигексаноат);

бутил (C7) Поли(3-гидроксигептаноат);

пентил(C8) Поли(3-гидроксиоктаноат);

гексил(C9) Поли(3-гидроксинонаноат);

гептил(C10) Поли(3-гидроксидеканоат)

Рисунок 1 – Структурная формула полигидроксиалканоатов [6].

Номенклатура и число атомов углерода для ПГА-соединений определяется функциональной алкильной R-группой.

На рисунке 2 представлено изображение гранул биополимера в культуре клеток бактерий [7].

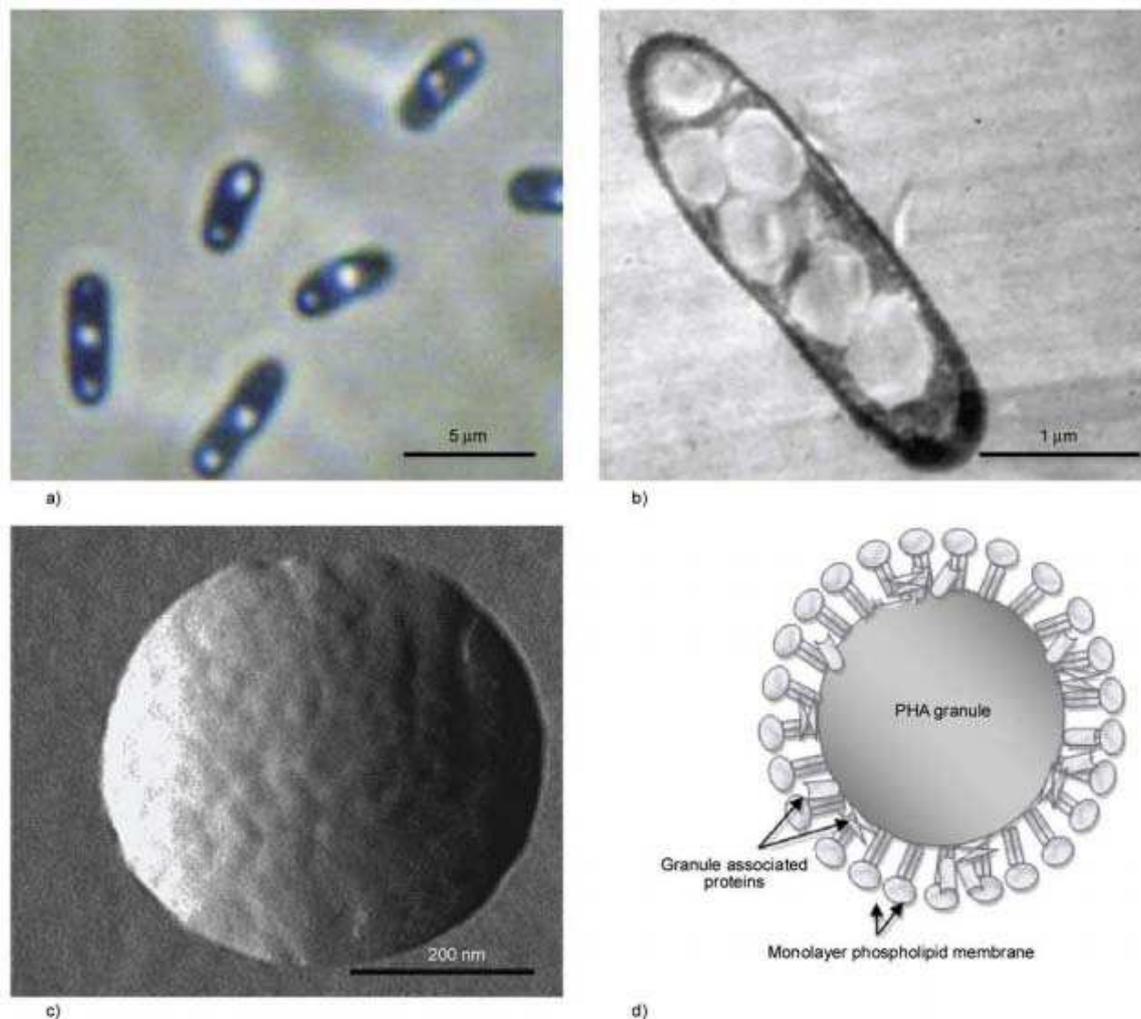


Рисунок 2 – Морфология гранул ПГА в бактериальных клетках, наблюдаемых при: (а) фазовом контрасте; (б) в трансмиссионном микроскопе (с) изображение атомного силового микроскопа, показывающее присутствие глобулярных частиц на поверхности гранул; (d) модель, представляющая нативную гранулу РНА с белковым монослоем на поверхности (в соответствии с фактическим масштабом) [7]

Белые области представляют собой полимерные гранулы, заключенные в цитоплазме. Присутствие полимера оказывает небольшое влияние на осмо-

тическое давление клетки и не мешает клеточному обмену веществ. Когда источники питания истощаются, клетка в состоянии депонировать полимер для получения энергии, тем самым продлевая свою жизнеспособность до тех пор, пока не возобновится нормальное питание [8].

ПГА являются термопластами и их свойства отличаются в зависимости от их химического состава (гомо- или сополиэфир, содержащий гидроксигирные кислоты).

Характеристики ПГА:

- нерастворим в воде и относительно устойчивый к гидролитическому разрушению;
- устойчив к ультрафиолету, не устойчив к кислотам и основаниям;
- растворим в хлороформе и других хлорированных углеводородах;
- биосовместим (пригодный для медицинских целей);
- нетоксичен;
- менее «липкий», чем традиционные полимеры [9].

1.2 Получение биополимера

Синтезируются ПГА прокариотическими микроорганизмами в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса. Модельным организмом для исследований ПГА является *Ralstonia eutropha*. Она может накапливать П(ЗГБ) в виде множества, а содержание биополимера в клетке достигает чем до 90 % от веса сухой биомассы [10], со средним конечным числом гранул в типичной ПГА-производящей клетке около десяти [11].

Автотрофный и гетеротрофный рост *R. eutropha* Н16 приводит к получению центрального метаболита ацетил-СоА (рисунок 3). Во время синтеза жирных кислот, производные ацетил-СоА конденсируются на ациле (АСР), для получения ряда с увеличением длины для реализации синтеза липидов. Экспрессия ацил-АСР-тиоэстераз позволяет осуществлять гидролиз ацил-АКТ и высвобождение жирных кислот, некоторые представители которых

способны пересекать липидную мембрану. Жирные кислоты могут повторно потребляться через путь β -окисления, в ходе которого удаляется два атома углерода из жирной кислоты с получением ацетил-CoA. Ведение жирных кислот в β -окисление катализируется один или несколько ацил-CoA-лигаз. Несколько гомологов каждой стадии β -окисления пути были идентифицированы в геноме *R. eutropha* H16, с числом гомологов указанных в скобках. Ацетил-CoA также может быть превращен в ПГБ через действие трех ферментов (*phaCAB*) в периоды избытка углерода, и ограничении питательных веществ, таких как азот или фосфор. Синтез ПГБ и β -окисление имеют общие метаболические интермедиаты и могут быть согласованным. Пунктирная линия указывает на возможность включения 3-гидроксиацил-CoA в путь синтеза ПГБ и быть включенным в полимер. ПГА-синтаза – один из ключевых ферментов синтеза биополимеров, который катализирует формирование эфирных связей в процессе полимеризации мономеров [12].

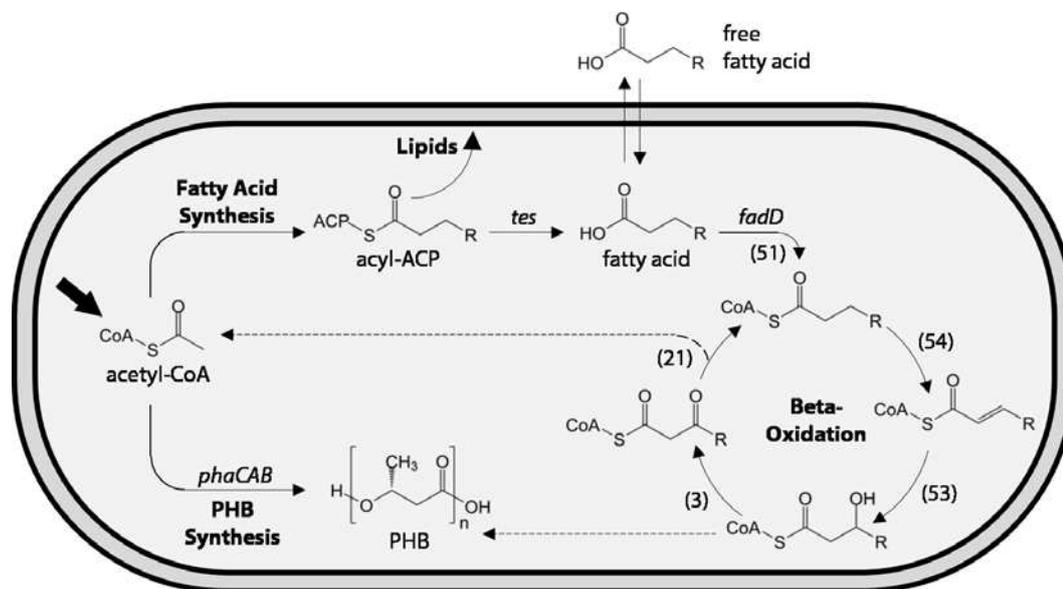


Рисунок 3 - Схема производства и поглощения жирных кислот [13]

Швейцарские ученые в 1998 году сделали заключение о том, что регуляция метаболизма ПГА может происходить на четырех разных уровнях:

1) активация экспрессии *pha* гена вследствие конкретных экологических факторов, как например, нехватка питательных веществ;

2) активация синтетических ферментов ПГА с помощью специфических клеточных компонентов, а также промежуточных продуктов метаболизма;

3) ингибирование метаболических ферментов конкурирующих путей и, следовательно, обогащение необходимыми промежуточными соединениями для синтеза ПГА;

4) комбинации всех этих уровней [14].

Способность водородоокисляющих бактерий синтезировать ПГА в автотрофных условиях с CO_2 как источником конструктивного метаболизма и H_2 - как источником метаболизма энергии, делают их хорошими кандидатами для коммерческого производства биополимера [15].

Количество микроорганизмов, способных накапливать ПГА, насчитывает свыше трёхста штаммов. Среди них представители аэробов и анаэробов, гетеротрофов, фототрофов, архебактерий и др. микроорганизмов. В числе изученных природных продуцентов биополимера представители различных таксонов: *Pseudomonas putida* [16], *Comamonas testosteroni* [17], *Ralstonia eutropha* [18], *Aeromonas hydrophila* [19, 13, 20], *Rhodospirillum rubrum* [21] и др. В вышеперечисленных работах описаны процессы синтеза ПГА на разных субстратах, служащих основным источником углерода: сахара, органические и жирные кислоты. В работе [20] исследовали природный штамм *Aeromonas hydrophila* ATCC 14715 с использованием в качестве источника углерода масло зародышей пшеницы, соевого масла, масло семян капусты, гексаноат, а также 3ГБ в различных комбинациях. В работе научного коллектива под руководством Чен [13] культивировали другой природный штамм *Aeromonas hydrophila* 4АК4, здесь в качестве углеродного субстрата использовали глюкозу и лауриновую кислоту. Бактерии выращивали в условиях лимитирования азотом или фосфором. В результате исследований синтезированы сополимеры с выходом ПГА 51 % от а.с.м. Штамм *Comamonas testosteroni* способен синтезировать ПГА, используя в качестве единственного источника углерода кокосовое масло. При этом выход ПГА составлял 87,5 % от а.с.м.

[17]. В работе [16] авторы культивировали *Pseudomonas putida* Bet001, выделенный из отходов производства пальмового масла, на олеиновой кислоте и в качестве единственного источника углерода и энергии в двухступенчатом периодическом процессе ферментации авторами использованы различные жирные кислоты.

Известные ПГА производители среди водородоокисляющих штаммов микроорганизмов - бактерии рода *Cupriavidus* [22]. Для получения полимеров на основе биосинтеза бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 используют в качестве основного субстрата глюкозу, карбамид и минеральное сырье.

1.3 Выделение продуктов биотехнологического синтеза

Для извлечения гранул ПГА необходимо разрушить бактериальную клетку и удалить слой белка, покрывающий гранулы биополимера [23]. Так, как ПГА является внутриклеточным продуктом, поэтому методы, используемые для его извлечения, фокусируются либо на его солюбилизации, либо на солюбилизации неполимерных клеточных материалов, состоящих из нуклеиновых кислот, фосфолипидов, липидов, пептидогликана и белков [24].

Различные исследователи оценили, что приблизительно половина стоимости производства ПГА связана с экстракцией и очисткой полимера [25-27]. Следовательно, затраты на выделение ПГА должны быть сведены к минимуму. Это приводит к тому, что существует необходимость разработки результативных способов извлечения и очистки ПГА для экономически эффективного производства биополимера. Наряду с этим, также необходимо сохранять качественные характеристики ПГА, которые обеспечивают свойства материала: молекулярную массу полимера, его чистоту [25]. В растворах в равновесном состоянии макромолекулы полимерных материалов могут образовывать различные конформационные структуры, зависящие от типа растворителя, длины и жесткости молекулярных цепей, химической структуры мономолекулярных секторов.

Выделение и очистка полимеров является важным шагом для их анализа и характеристики. Существует большинство различных методов, используемых для извлечения ПГА из клеток. Они включают экстракцию органическими растворителями; обработку биомассы растворами щелочей, кислот, детергентов, ферментами, а также их различные сочетания [2, 7,28].

1.3.1 На промышленном уровне наиболее часто используется метод экстракции галогенизированными растворителями (хлороформ, дихлорметан). В нем участвуют две основные стадии: во-первых, это изменение проницаемости клеточной мембраны, что позволяет высвободить и солубилизировать ПГА. Затем следует его нерастворимое осаждение [7]. Стадия предварительной обработки клеточной биомассы может быть вставлена в процесс извлечения и имеет целью дестабилизировать и (или) разрушить стенку бактериальной клетки и облегчить действие растворителя в процессе экстракции.

При комнатной температуре типичные галогенизированные экстракционные растворители, такие как хлороформ [29, 30], дихлорметан (метиленхлорид) [2], полихлорированный этан (1,2-дихлорэтан, 1,1,2 -трихлорэтан, 1,1,2,2-тетрахлорэтан) применяют для экстракции коротко- и среднецепочечных ПГА. Тетрахлорэтан является наилучшим растворителем ПГА, однако, его использование нежелательно по причине высокой токсичности (является сильным почечным и печеночным ядом); предельно допустимая концентрация паров в воздухе $0,001 \text{ мг/м}^3$. [15]. После экстракции ПГА растворимость полиэфира резко сводится к минимуму путем добавления «антирастворителя ПГА», обычно низкомолекулярных спиртов (главным образом этанола или метанола), гексана, эфира, ацетона или воды. Это приводит к осаждению высокоочищенного ПГА.

Хлороформ и другие хлорированные углеводороды растворяются все ПГА из смешанной культуре биомассы. Способ, в котором используют оба типа растворителя (экстракция липидов с последующим растворением полимера) применяется во многих исследованиях. Растворенный полимер отде-

ляют от растворителя, обычно выпариванием или осаждением спиртом или ацетоном, таким как метанол. Экстракция растворителем широко используется для извлечения ПГА с высокой степенью чистоты [4]. При этом используются два основных этапа: модификацию проницаемости клеточной мембраны, что позволяет высвободить и солюбилизацию ПГА; осаждение без растворителя. Экстракция ПГА осуществляется такими растворителями, как хлороформ, 1,2-дихлорэтан, дихлорметан или некоторыми циклическими карбонатами - этиленкарбонат и 1,2-пропиленкарбонат. Осаждение ПГА обычно индуцируется нерастворителем, таким как метанол и этанол. Экстракция растворителями имеет несомненное преимущество перед другими методами извлечения ПГА с точки зрения эффективности. Однако вызывает незначительную деградацию полимеров. К сожалению, широкомасштабное применение экстракции растворителем, обычно, рассматривается как метод, который не является экологически чистым. Кроме того, несколько других факторов препятствуют использованию растворителей, таких как эксплуатационные расходы, высокая вязкость экстрагированного раствора полимера, когда концентрация полимера превышает 5 %. Вязкость раствора влияет на удаление клеточных остатков, приводящее к длительной сепаративной обработке [31].

1.3.2 Поверхностноактивные вещества, такие как анионный додецилсульфат натрия (ДДС- Na), разрушают клетки путем включения в липидной мембраны бислоя. Он проникает в мембраны для увеличения объема клеточной оболочки. Далее разрывает мембраны для получения мицелл ПАВ и мембраны фосфолипидов, это приводит к высвобождению полимера в раствор, окруженного клеточными остатками. Некоторые ПАВ (пальмитоил, карнитин, сурфактант) лизируют *R.eutropha* и *A. latus*. Преимущество этого метода исходит из того, что ПАВ лизирует клетки без разрушения полимерных гранул. Другой метод состоит в восстановлении ПГА непосредственно из культуральной жидкости с высокой плотностью клеток, без предварительной обработки, путем добавления ДДС-Na, встряхивания, нагревания и про-

мывки. На *R. eutropha*, чистота ПГА более 95 % и скорость извлечения более 90 % было получено с отношением ДДС-На / биомассы выше. Ряд работ посвящен методу обработки биомассы детергентами [32, 33], который отличается тем, что детергенты разрушают различные компоненты клетки, оставляя молекулы ПГА нетронутыми, что является главной целью процесса экстракции. Например, после обработки биомассы *Ralstonia eutropha* растворами ДДС-На различной концентрации и нагревания суспензии до 90°C удалось выделить гранулы полимера, содержащие только 3 - 4 % примесей. 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 % ДДС-На 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. 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 [2].

Одним из основных преимуществ этого метода является то, что позволяет восстановить полимер непосредственно из высоких плотностей клеток: 50-300 г сухой клетки. Использование только ПАВ не может обеспечить высокую чистоту ПГА (более 97 %), для этого необходимы другие агенты, такие как гипохлорит и гидроксид натрия необходимы. Кроме того, высокая доза поверхностно-активного вещества вызывает проблемы очистки в сточных водах и повторное использование [23, 25].

1.3.3 Одним из распространённых методов является использование гипохлорита натрия, который солибилизирует клеточную массу и оставляет ПГА нетронутым. Однако он может разрушить ПГА, что приводит к 50 % снижению молекулярной массы. Это объясняется тем, что гипохлорит натрия является сильным окислителем, и существенное количество хлора остается в ПГА. Как правило, аморфные гранулы ПГА относительно восприимчивы к щелочному омылению и быстро разлагается в мономеры и олигомеры в качестве растворимых продуктов. Добавление антиоксиданта: например бисульфит натрия, может избежать деградации молекулярного веса. Кроме того, из недостатков этого метода можно отметить его дорогую стоимость [34, 35].

1.3.4 Гидроксид натрия и калия эффективно разрушают клеточную стенку, способствуя проникновению экстрагентов ПГА в клетку. Учитывая, что щелочи недороги и эффективны, их применения так же описывается в литературе. Очищенный ПГА, полученный по данному методу является более подходящим для биомедицинских целей и может уменьшить количество эндотоксина в полимере. Однако щелочи могут изменить физические и механические свойства ПГА, что обусловлено значительным гидролизом полимера и его снижение молекулярной массы. ПГА с чистотой около 91 % и выходом 93 % получали из рекомбинантной *E. coli*, содержащей ПГА-ген *S. necator* с использованием 0,1 М раствора NaOH или KOH при 30 °C в течение 1 ч. При использовании данного метода отмечались значительные потери ПГА и снижение молекулярной массы. Было показано, что использование гидроксида натрия на 25 % снижает стоимость экстракции при сравнении с методом расщепления поверхностно-активным веществом-гипохлоритом [36, 37].

1.3.5 Ферментативное расщепление представляет собой сложный процесс извлечения ПГА. Этот метод заключается в добавлении в клеточную биомассу ферментов для гидролиза клетки, которые содержат полимер. Различные типы ферментов используются в этом процессе, особенно протеазы. Такой метод привлекателен из-за мягких условий эксплуатации, высокой се-

лективности ферментов для гидролиза белков клеточной стенки бактерий и последующего лизиса, без воздействия на полимер и качество извлеченного полимера [38]. Протеазы трипсин, химотрипсин, папаин и бромелайн, α -глюкозидазы и лизоцим являются ферментами, изучаются как способные расщеплять ковалентные связи, аналогичные найденным в пептидогликан- β -1,4-гликозидных звеньях - самой жесткой структуры бактерий клеточной стенки. Наилучший результат - получение ПГА 89 % чистоты был достигнут с 2 % бромелайном при 50 °С и pH = 9,0. Эксперименты проводились также с панкреатином, что приводило к 90 % чистоты полимера [39]. Результаты показали, что применение ферментных препаратов для экстракции полимера является эффективным процессом, который помогает в разрушении клетки *Cupriavidus necator* [40].

Бразильскими исследователями был разработан метод извлечения ПГА, производимый *C. necator* с участием тепловой обработки, ферментативного гидролиза и восстановления полимера с хлороформом. Гликозидазы гидролизировали клеточный материал после термической обработки в автоклаве в течение 15 мин при 121 °С для последующей дестабилизации клеточной стенки и облегчения ферментативного гидролиза [38]. Извлечение ПГА было выполнено с добавлением хлороформа и последующего центрифугирования, в котором получали раствор полимера в растворителе. После испарения растворителя, произошло образование полимерной пленки с 94,5 % извлечением ПГА (с чистотой 91 %).

Таким образом, для получения ПГА с высоким показателем чистоты, наиболее приемлемым методом является экстрагирование хлорсодержащими растворителями. Предварительная обработка биомассы полярными растворителями, такими как этанол или ацетон, оказывается полезной для удаления липидов из биомассы и ослабления защитной функции клеточной стенки, что облегчает последующую экстракцию растворителем. Повторное растворение и осаждение полимера резко повышает чистоту окончательно полученного продукта [41].

1.4 Молекулярно - массовые характеристики полимера

Молекулярная масса является важной характеристикой высокомолекулярных соединений - она определяет технологические и физические свойства полимеров. В группе ПГА молекулярная масса является переменным параметром и может составлять от нескольких сотен до миллионов дальтон. Данная величина зависит от типа используемого продуцента, условий его выращивания, типа ПГА-синтазы, источника углеродного питания для бактерий, субстратов-предшественников для синтеза ПГА, наличия ферментов, которые гидролизуют полимер и уровень экспрессии ПГА-синтазы, длительности культивирования, pH среды и температуры, метода экстракции полимера из биомассы и применяемых растворителей [12, 42]. Прочность пленок из ПГА возрастает с увеличением их молекулярной массы. При этом выявлено, что в сополимерных композициях молекулярный вес основного полимера меняется пропорционально количеству вводимого полимера. Число мономерных звеньев, входящих в состав различных молекул одного и того же полимерного вещества различно, вследствие чего молекулярная масса макромолекул полимера также неодинакова. Поэтому при характеристике полимеров обычно говорят о среднем значении молекулярной массы. Данные по молекулярной массе ПГА достаточно противоречивы. Так, в работе [43] средневесовая молекулярная масса полимеров составила 300 кДа, в то время как при содержании поли-3-гидроксигексаноата 87,0 мол.% оказалась в два раза ниже – около 160 кДа. У образцов с низким содержанием ЗГГ 5,0 и 12,0 мол.% значение средневесовой молекулярной массы было выше, но незначительно – 635 и 440 кДа, соответственно. Такие результаты, могли бы свидетельствовать о том, что с увеличением включения фракции ЗГГ молекулярная масса сополимера снижается, однако в работе [44] Вонг с коллегами показал неоднозначность данного утверждения.

Молекулярно-массовое распределение полимера (полидисперсность) - является одной из важнейших характеристик высокомолекулярных соедине-

ний, которая отражает кинетический процесс полимеризации и определяет эксплуатационные характеристики полимеров, предсказывая пути его переработки и определяется соотношением количеств n_i макромолекул различной молекулярной массы M_i в данном полимере. Полидисперсность оказывает существенное влияние на физические характеристики полимеров, и прежде всего на механические свойства.

Повышенное содержание высокомолекулярных фракций в полимере сообщает ему более высокие прочностные характеристики, повышенную твердость и температуростойкость. Начало пластического течения таких полимеров, смещается в область более высоких температур. Полимеры с большим содержанием низкомолекулярных фракций имеют низкие прочностные параметры, и в целом обладают худшими механическими свойствами. Средняя молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение являются важными контрольными величинами при получении полимеров с нужными механическими свойствами [31].

1.5 Оптимизация первого этапа процесса экстракции: кинетика и моделирование

В связи с тем, что ПГА синтезируются при несбалансированном росте и используются клетками в качестве эндогенного депо энергии и углерода, получение высоких выходов по биомассе с высоким внутриклеточным содержанием полимера представляется проблематичным. Факторы, обеспечивающие суперпродукцию биополимера, видо- и штаммоспецифичны, поэтому основополагающей задачей для биотехнологии этих биомолекул является исследование и нахождение условий, максимизирующих выходы ПГА у конкретных штаммов. Учитывая сложность, а также многофакторность и многостадийность процесса экстракции ПГА из биомассы бактерий, необходимо выполнять оптимизацию технологии, основанную на регрессионном анализе многофакторного эксперимента первого этапа процесса экстракции. Для это-

го применяют различные подходы: Vox–Behnken design, планы эксперимента Бродского В.З. и др. Более современные работы обрабатываются при помощи специальных статистических программ, таких как MINITAB for Windows, Release 14 software, Statgraphics [4, 45]. Выделяются входные и выходные параметры анализируемого процесса. В работах, посвященных оптимизации параметров выведены уравнения, описывающие процесс, также представлен корреляционный анализ. Таким образом, выбор плана эксперимента для оптимизации параметров процесса экстракции ПГА представляет практическую значимость [45, 46].

Были выбраны факторы, и их значения, влияющие на выходные параметры: время, температура, концентрация растворителя (этанола) и соотношение растворитель:биомасса. В качестве выходных параметров выбраны следующие показатели: количество экстрактивных веществ, молекулярная масса и чистота полимера.

Таким образом, после сравнения существующих методик выделения ПГА, в магистерской работе был выбран метод выделения продуктов биотехнологического синтеза, который значительно снижает расходы реагентов и позволяет получать полимер высокой чистоты [2]. По изученным литературным источникам для получения регрессионных зависимостей был реализован симметричный ортогональный план главных эффектов три, предложенный В.З. Бродским [47].

2 Методическая часть

2.1 Исследуемые микроорганизмы

Объектами исследований были природные штаммы бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646, характеризующиеся способностью к синтезу ПГА. *C. eutrophus* B10646 зарегистрирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Бактериальные штаммы этого рода хорошо известны среди водородокисляющих бактерий как продуценты ПГА. Первоначально данные микроорганизмы были описаны как *Hydrogenomonas* [48]. Впоследствии они стали предметом частых таксономических реклассификаций: *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Wautersia*, *Cupriavidus* [49].

Тем не менее, систематическое название *Ralstonia* оставалось наиболее установленным в научном сообществе. Типовой вид – *Ralstonia eutropha* [50]. Благодаря своей метаболической универсальности *Ralstonia eutropha* может преобразовать широкий спектр возобновляемых гетеротрофных ресурсов в различные ценные соединения [50]. Поэтому штаммы *R. eutropha* рассматриваются как микроорганизмы, имеющие выдающийся биотехнологический потенциал [51]. Схема эксперимента представлена на рисунке 4.

2.2 Условия роста бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646

Бактерии выращивали в периодическом двустадийном режиме, разработанном ранее для синтеза ПГА [52]. Посевной материал получали путем ресуспендирования музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля при стартовой концентрации глюкозы 10 г/л. Для выращивания бактерий за основу принята среда следующего солевого состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9,1 г/л; KH_2PO_4 – 1,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г/л; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 г/л и сбалансированная кислотнo-солевая среда [53]. Источником железа служил раствор железа

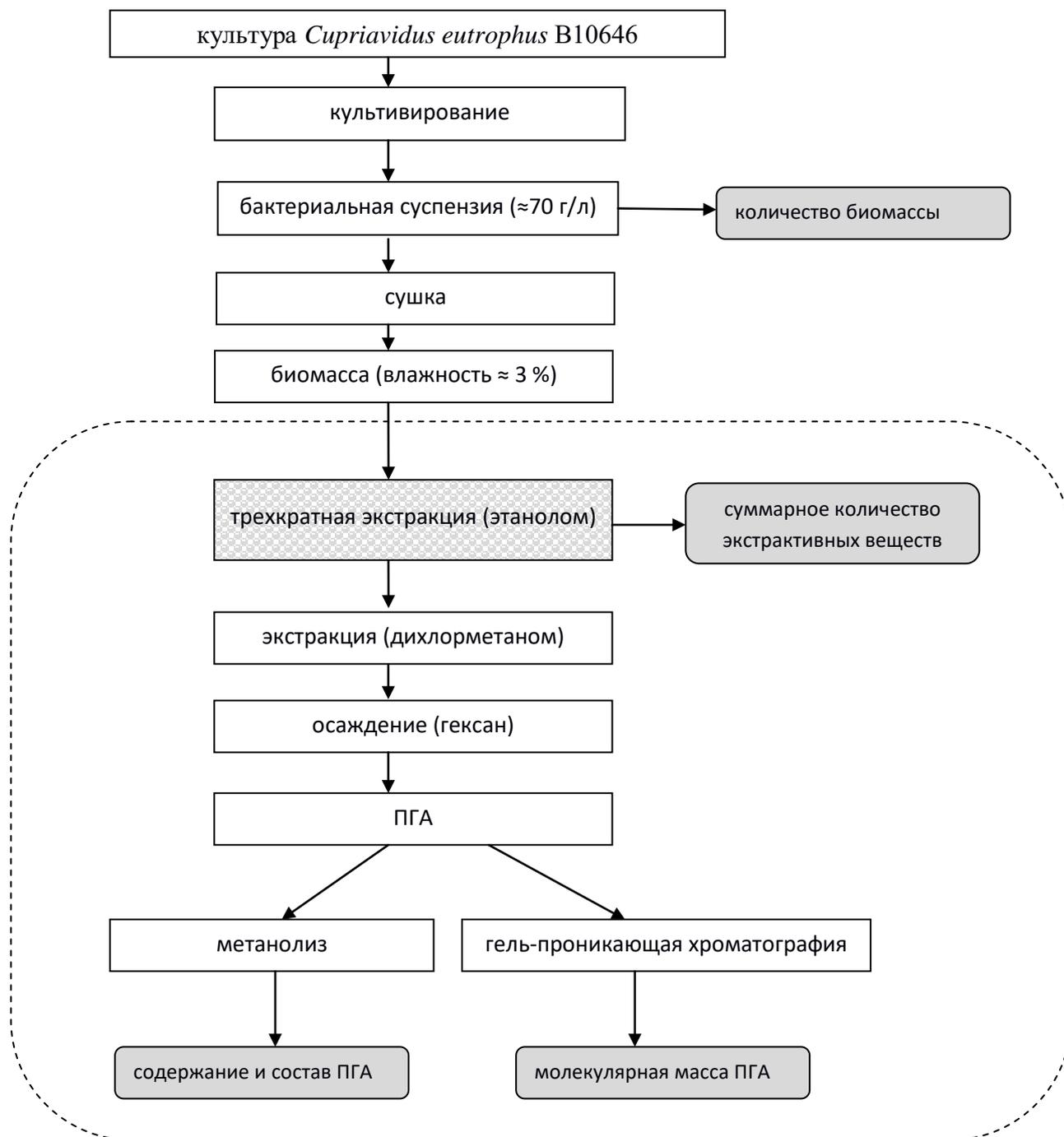


Рисунок 4- Схема эксперимента

лимоннокислого (5 г/л), который вводят из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводили по прописи Хоагланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0,288 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,050 г/л; NiCl_2 – 0,008 г/л. В качестве источника азота использовали мочевины. Сведения о сырье и материалах, используемых в процессе культивирования приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Сведения о сырье и материалах

| Наименование материала | Нормативная документация |
|--|--------------------------|
| Глюкоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) | ГОСТ 975-88 |
| Карбамид ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) | ГОСТ 6691-77 |
| Натрий фосфорнокислый двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) | ГОСТ 4172-76 |
| Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) | ГОСТ 4198-75 |
| Магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | ГОСТ 4523-77 |
| Железо лимоннокислое ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$) | ТУ6-09-01719-87 |
| Купорос медный ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) | ГОСТ 19347-99 |
| Марганец хлористый ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) | ГОСТ 612-75 |
| Никель хлористый (NiCl_2) | ГОСТ 4038-79 |
| Купорос цинковый ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | ГОСТ 8723-75 |
| Кобальт хлористый ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | ГОСТ 4525-77 |
| Кислота борная (H_3BO_3) | ГОСТ 9656 |
| Дихлорметан (CH_2Cl_2) | ГОСТ 9968-86 |
| Гексан (C_6H_{14}) | ТУ 2631-003-05807999-98 |
| Бутандиол-1,4 ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$) | ТУ 6-09-2822-78 |

Культивирование бактерий проводили в стерильном режиме на опытном производстве Сибирского федерального университета, с использованием

ферментёров фирмы Bioengineering (Швейцария) - объем аппарата 30 л (рабочий объем от 5 до 20 л) и 150 л (рабочий объем от 10 до 110 л).

В ходе экспериментов периодически отбирали пробы культуры (каждые 5 ч). Контроль оптической плотности и азота, определение содержания и состава полимера, определение сухой биомассы клеток.

2.3 Определение сухой биомассы клеток

Концентрацию клеток X , г/л, регистрировали весовым способом. Для этого брали аликвоты бактериальной суспензии, объемом 10-25 мл, центрифугировали 10 мин при 6000 об/мин; дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Пробы сушили при температуре 105 °С в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий в культуре определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

Удельную скорость прироста биомассы (X) и прироста ПГА рассчитывали по формуле 1:

$$\mu = \frac{\ln(X_2/X_1)}{t_2-t_1} \quad (1)$$

где μ - удельная скорость роста, ч⁻¹;

X_1 и X_2 – концентрации биомассы (ПГА) соответственно в начальный и конечный период;

(t_2-t_1) – период времени.

2.4 Выбор факторов для плана оптимизации

Снижение стоимости процесса экстракции ПГА является актуальной задачей для практической применимости технологии. На данный момент известные методы извлечения полимера из биомассы, которые не соответствуют многим требованиям, таким как расходы на реагенты, чистота получен-

ных ПГА и полнота их извлечения. Несовершенство методов ставит целью улучшение процессов экстракции и выделения эффективности этих процессов и уменьшения себестоимости конечного продукта.

Реализация многофакторного эксперимента позволит оценить влияния различных параметров на выходные характеристики продукта и обеспечить максимальный выход продукции с минимальными затратами. Поэтому необходимо определить входные параметры процесса экстракции позволяющие минимизировать время и температуру экстракции, использование органических растворителей в связи с их высокой стоимостью, и также обеспечивающие высокий выход и чистоту полимера с сохранением его структуры [54].

На основании предварительных исследований получены данные о влиянии ряда факторов на процесс экстракции. Важными факторами, оказывающими воздействие на полноту извлечения полимера и снижения количества примесей, степень чистоты ПГА, а также на молекулярно-массовые характеристики, являются температура и время спиртовой экстракции, концентрация растворителя и объемное соотношение биомассы и экстрагента.

2.5 Методика проведения математической обработки процессов экстракции ПГА

В магистерской работе для построения математической модели процесса, а также проверки ее адекватности и оценки влияния на процесс каждого учитываемого технологического фактора используем регрессионный анализ. Этот метод позволяет устанавливать значения факторов и диапазоны их варьирования по своему усмотрению, согласно технологическому процессу.

Для получения регрессионных зависимостей был реализован симметричный ортогональный план главных эффектов 3, предложенный В.З. Бродским [47]. Выбор этого плана определился следующими его достоинствами:

- для реализации данного плана необходимо небольшое число опытов.

- коэффициенты регрессии вычисляются независимо друг от друга с одинаковыми минимальными дисперсиями.

- полученное уравнение регрессии дает одинаковую погрешность выходного параметра на одном и том же расстоянии от центра плана.

В качестве основных факторов, влияющих на процессы экстракции, выбраны следующие:

X_1 – температура процесса экстракции, °C (30, 45, 60);

X_2 – время процесса экстракции, мин (30, 60, 90);

X_3 – концентрация этилового спирта, % (70, 83, 96);

X_4 – объемное соотношение биомассы и экстрагента (4:1; 6:1; 8:1)

Выбор независимых переменных и пределы их варьирования производился на основании литературных данных и предварительных экспериментов.

В качестве параметров оптимизации приняты:

Y_1 – содержание экстрактивных веществ, %;

Y_2 – молекулярная масса (ММ) ПГА, кДа;

Y_3 – чистота ПГА, %.

Выбран симметричный равномерный план [47]. Исходная матрица имеет следующий вид (таблица 2).

Таблица 2 – Исходная матрица

| Номер | F ₁ | F ₂ | F ₃ | F ₄ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 3 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| 4 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| 5 | 1 | 1 | 2 | 0 |
| 6 | 2 | 1 | 0 | 1 |
| 7 | 0 | 2 | 2 | 1 |
| 8 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| 9 | 2 | 2 | 1 | 0 |

Таблица 3 - Подставление в соответствии факторам F_i натуральных переменных X_i :

| i | Наименование факторов | Уровни F_i | Уровни X_i | Шаг |
|-----|---|-----------------|-----------------|----------------|
| 1 | Температура процесса экстракции, °С | 0 | 30 | $\lambda = 15$ |
| | | 1 | 45 | |
| | | 2 | 60 | |
| 2 | Время процесса экстракции, мин | 0 | 30 | $\lambda = 30$ |
| | | 1 | 60 | |
| | | 2 | 90 | |
| 3 | Концентрация этилового спирта, % | 0 | 70 | $\lambda = 13$ |
| | | 1 | 83 | |
| | | 2 | 96 | |
| 4 | Объемное соотношение биомассы и экстрагента | 0 | 4 | $\lambda = 2$ |
| | | 1 | 6 | |
| | | 2 | 8 | |

Таблица 4 - Матрица в натуральном виде

| Номер | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 |
|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 30 | 30 | 70 | 4 |
| 2 | 45 | 30 | 83 | 6 |
| 3 | 60 | 30 | 96 | 8 |
| 4 | 60 | 60 | 83 | 8 |
| 5 | 45 | 60 | 96 | 4 |
| 6 | 60 | 60 | 70 | 6 |
| 7 | 30 | 90 | 96 | 6 |
| 8 | 45 | 90 | 70 | 8 |
| 9 | 60 | 90 | 83 | 4 |

Для определения степени влияния отдельных технологических параметров на процесс экстракции нами рассматривались одномерные сечения поверхности отклика, которые получали из соответствующих уравнений регрессии с применением программы Microsoft Excel. Для этого одной из независимых переменных придавали ряд произвольных значений и, фиксируя остальные на нулевом уровне, находили соответствующий ряд значений функции отклика.

2.5.1 Обработка данных программного пакета Microsoft Office

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета Microsoft Office.

Планирование эксперимента применяется для изучения механизмов протекающих биотехнологических процессов и их оптимизации. Задачей планирования является выбор необходимых для эксперимента опытов, методов математической обработки их результатов и принятия решений. Планирование эксперимента предполагает активное вмешательство в процесс и возможность выбора в каждом опыте тех факторов, которые представляют интерес. Все способы воздействия на изучаемый объект обозначаются буквой X и называются факторами. Каждый фактор может принимать в опыте одно из нескольких значений, такие значения называются уровнями. При планировании эксперимента полученные результаты должны быть воспроизводимыми, а объект управляем.

По результатам факторного эксперимента описание функции отклика, будет представлен в виде линейного уравнения регрессии.

Расчет параметров линейной регрессии описано по ниже приведенной методике.

Уравнение множественной регрессии может быть представлено в виде:

$$Y = f(\beta, X) + \varepsilon, \quad (2)$$

где $X = X(X_1, X_2, \dots, X_m)$ - вектор независимых (объясняющих) переменных;

β - вектор параметров (подлежащих определению);

ε - случайная ошибка (отклонение);

Y - зависимая (объясняемая) переменная.

Теоретическое линейное уравнение множественной регрессии имеет вид:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_m X_m + \varepsilon, \quad (3)$$

β_0 - свободный член, определяющий значение Y , в случае, когда все объясняющие переменные X_j равны 0.

2.6.2 Обработка данных в пакете Statgraphics

В планировании эксперимента особое внимание уделяется способам отображения экспериментальной информации. В Statgraphics включен большой спектр графических процедур, которые позволяют подбирать, а также ясно и точно видеть особенности анализируемого материала, начиная от карт Парето и заканчивая трехмерными поверхностями отклика разного вида. Statgraphics plus for Windows включает более 250 статистических и системных процедур, применяющихся в бизнесе, экономике, маркетинге, медицине, биологии, технике и в других областях. Пакет имеет модульную структуру, каждый модуль имеет собственное меню. Меню Describe (Описание) содержит статистические методы анализа по одной и множеству переменных, процедуры подбора распределений, средства табуляции и кросс-табуляции данных. Меню Compare (Сравнение) включает методы сравнения двух и более выборок данных, процедуры одно- и многофакторного дисперсионного анализа. Меню Relate (Соотношения) содержит процедуры простого, полиномиального и множественного регрессионного анализа. Для расширения возможностей системы имеются дополнительные модули, инициализация которых осуществляется через меню Special (Специальные). К ним относятся следующие модули.

Модуль Quality Control (Контроль качества) предназначен для оценки эффективности всех звеньев производственного процесса и формирования

соответствующих карт. Модуль Experimental Design (Планирование эксперимента) помогает сформулировать критерий оптимальности плана эксперимента, подобрать наилучший план, организовать сбор и обработку требуемой информации. Модуль Time-Series Analysis (Анализ временных рядов) содержит описательные методы, процедуры сглаживания рядов, сезонной декомпозиции и прогнозирования. Модуль Multivariate Method (Многомерные методы) предназначен для изучения и раскрытия взаимоотношений множества факторов (переменных).

2.6 Методы выделения продуктов биотехнологического синтеза

Экстракция ПГА, полученных при культивировании бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 на глюкозном 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) [2]. Также, для осаждения возможно использование этанола.

Два основных шага для получения полимера, это, во-первых, изменение проницаемости клеточных мембран, что позволит высвободить и растворить молекулы ПГА. После выделения полимера, следует осаждение ПГА в виде осадка и его фильтрация. Извлечение полимера с помощью растворителей проходит без потери его качества за счет повышения проницаемости клеточной мембраны и последующей солюбилизации ПГА. Добавление к дихлорметану этилового спирта и проведение трёхкратной экстракции с нагреванием повышает выход ПГА.

2.7 Метод спиртовой экстракции

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). Этанол обезвоживает клетки и подвергает разрушению бислойные клеточные мембраны. Происходит агрегация липидов внутри нее и накопление воды, что приводит к снижению барьерных функций мембраны [2]. Процесс подготовки биомассы для дальнейшего извлечения из нее полимера проходит в несколько стадий.

1 Очистка биомассы от липидов и белковых фракций. Для этого использовался этиловый спирт. Экстракция этиловым спиртом проходит с использованием обратного холодильника на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Standard (Германия).

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

3 Экстракция биомассы органическим растворителем (дихлорметаном) проводится путем кипячения при перемешивании на магнитной мешалке с обратным холодильником про 40 °С.

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

6 Осаждение экстракта этанолом (соотношение «растворитель:биомасса» определяется номером реализуемого эксперимента в плане) и дальнейшая фильтрация полимера от осадителя.

2.8 Исследование содержания и состава ПГА

Внутриклеточное содержание полимера в клетках и его состав определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A с масс детектором Agilent Technologies 5975C («Agilent», США). Метанолиз проб проводили следующим образом: к навеске сухой биомассы (4,0–4,5 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0,5 мг бензойной кислоты/1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты и кипятили с обратными холодильниками в течение 2 ч 40 мин. По окончании метанолиза добавляли 1 мл дистиллированной воды. При этом происходило разделение жидкостей. Хлороформенный слой (нижний) использовали для анализа содержания и состава ПГА [55; 56].

2.9 Определение молекулярной массы ПГА

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_B) и среднечисловую (M_C) молекулярную массу, а также полидисперсность (ПД), растворяя образцы сополимерных ПГА навеской 10–12 мг в 2 мл хлороформа с дальнейшей их фильтрацией. Значение средней молекулярной массы сополимеров (M_C , Да) определялось по формуле:

$$M_C = \Sigma (N_i \times M_i / N) \quad (4)$$

где N_i – количество молекул массы i ;

N – общее количество молекул;

M_i – масса молекул длины i , Да.

Вес средней молярной массы сополимера (M_B , Да) определялся по формуле:

$$M_B = \Sigma (w_i \times M_i) \quad (5)$$

где w_i – доля массы.

Доля массы определяется по следующей формуле:

$$w_i = N_i \times M_i / \Sigma (N_i \times M_i) \quad (6)$$

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, вычисляли из формулы (7):

$$\text{ПД} = M_B / M_{\text{ч}} \quad (7)$$

Выводы

В связи с высокой значимостью процесса экстракции в общей технологической схеме получения ПГА проводились исследования, целью которых является повышение эффективности экстракции за счет определения влияния факторов на процесс извлечения продуктов биотехнологического синтеза.

Проведен биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646, в ходе которого получен образец биомассы с концентрацией клеток в культуре около 64 г/л. Содержание ПГА, накопленного в ходе биосинтеза составило около 70 % от а.с.м.

Исследовано влияние параметров обработки биомассы *C. eutrophus* В-10646 этанолом на выход и физико-химические свойства ПГА.

Предложены математические модели, описывающие влияние параметров процесса этапа спиртовой экстракции на выход ПГА, экстрактивных веществ, молекулярную массу и чистоту биополимера. Получены модели, показывающие возможное управление этим процессом.

С помощью программ статистической установлены зависимости, дающие представление о количественном влиянии каждого фактора на выход экстрактивных веществ, величину молекулярной массы и чистоту полимера в процессе экстракции:

- установлено, что на выход экстрактивных веществ наибольшее влияние оказывает температура экспозиции;

- для получения максимальных значений величины молекулярной массы необходимо длительное время экстракции и минимальное соотношение растворителя к биомассе, два других параметра являются незначимыми;

- модель, описывающая зависимость для чистоты ПГА показывает, что получение биополимера с высокой чистотой необходима комбинация двух факторов, оказывающих наибольшее влияние: времени экстракции и концентрации этанола.

Получены оптимальные значения технологических параметров проведения процесса экстракции биополимера в клетке: температура процесса экстракции $X_1 = 60$ °C; продолжительность процесса экстракции $X_2 = 30$ мин; концентрация растворителя $X_3 = 96$ %; соотношение растворитель:биомасса $X_4 = 4:1$.

Список литературы

1. Николаева Д. А. Биосинтез поли-3-гидроксибутирата разной молекулярной массы культурой *Azotobacter chroococcum* и его биодegradации [Электронный ресурс] : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Николаева Дария Александровна. - Москва, 2004 – 27 с. - Режим доступа: http://www.biopolymers.ru/publications/ref_2004_01.pdf.
2. Киселев Е.Г. Сравнительное исследование методов экстракции ПГА из биомассы бактерий / Е.Г. Киселев, А.В. Демиденко // Журнал Сибирского федерального университета. Биология.– Т. 7, № 2. – 2014.– С. 148-160.
3. Volova T. G. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriaviduseutrophus* B-10646 / T. G. Volova, E. G. Kiselev, E. I. Shishatskaya, Natalia O. Zhila, A. N. Boyandin, Daria A. Syrvacheva, O. N. Vinogradova, G. S. Kalacheva, A. D. Vasiliev, I. V. Peterson // Bioresource Technology 146 – 2013.–P. 215–222.
4. Salmiati Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification [Электронный ресурс] / Salmiati, Z. Ujang, M.R. Salim, G. Olsson // Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIR, 2009. Режим доступа: <https://www.researchgate.net/publication/237489392>
5. Lemoigne M. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide β-oxybutyric // Bull. Soc. Chim. Biol. -№ 8 - 1926. - P. 770-782.
6. Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // eXPRESS Polymer Letters. - 2011. - Vol.5. - №7. - P.620-634.
7. Nuti M.P. Influence of phenylacetic acid on poly-β-hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in *Azotobacter chroococcum* Beij / M.P. Nuti, M. Bertoldi, A.A. Lepidi // Can. J. Microbiol.– Vol. 18. – 1972. – P. 1257-1261.

8. Scott G. Degradable Polymers: Principles and applications [Электронный ресурс] / G. Scott, D. Gilead – 1995. – P. 271. Режим доступа: https://librarycatalog.bilkent.edu.tr/client/tr_TR/default/search/detailnonmodal?query=Polymers.&d=ent%3A%2F%2FSD_ILS%2F0%2FSD_ILS%3A1311175~ILS~0&ps=300
9. Bugnicourt E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez // Polymer Letters - Vol.8, № 11– 2014.–P. 791–808.
- 10 Pötter M. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16 / M. Pötter, M.H. Madkour, F. Mayer et al. // Microbiol. Sgm. – 2002. –Vol. 148. – P. 2413-2426.
- 11Ballard D.G.H. Formation of polymers of β -hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state / D.G.H. Ballard, P.A. Holmes, P.J.Senior. In: Recent advances in mechanistic and synthetic aspects of polymerization / M. Fontanille, A. Guyot, editors. – Bandol: NATO Asi Science Series C, 1987. – P. 293-314.
- 12 Rehm B.H.A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases: key enzymes of PHA biosynthesis / B.H.A. Rehm, A. Steinbüchel // In: Biopolymers online / A. Steinbüchel, Y. Doi, editors. – Weinheim: Wiley-VCH, 2005. – P. 173-215.
- 13 Chen et al. Production of fatty acids in *Ralstonia eutropha* H16 by engineering β -oxidation and carbon storage. [Электронный ресурс]/ Chen JS, Colón B, Dusel B, Ziesack M, Way JC, Torella JP // PeerJ 3:e1468, 2015. Режим доступа : DOI 10.7717/peerj.1468
- 14 Kessler, B. Synthesis, recovery and possible application of medium-chainlength polyhydroxyalkanoates: a short overview / B. Kessler, B. Witholt // Macromol. Symp. – 1998. – Vol. 130. – P. 245-260.

15 Tanaka K. Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus* [Электронный ресурс] / К.Танака, А. Ishizaki, Т. Канамару, Т. Kawano // РЕЖИМ ДОСТУПА : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.260450312>

16 Gumel, M. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* Bet001 isolated from palm oil mill effluent / M. Gumel, M.S.M. Anuar, Th. Heidelberg // PloS One. – 2012. – Vol. 7. – P. 1-8.

17 Thakor, N.S. Production of poly (β-hydroxybutyrate) by *Comamonas testosteroni* during growth on naphthalene / N.S. Thakor, M.A. Patel, U.B. Trivedi et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – Vol. 19. – P. 185-189.

18 Budde, C.F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains / C.F.Budde, S.L. Riedel, L.B. Willis et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77. – P. 2847-2854.

19 Lee, S.H. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell density cultivation of *Aeromonas hydrophila* / S.H. Lee, D.H. Oh, W.S. Ahn et al. // Biotechnol. Bioeng. – 2000. – Vol. 67. – P. 240-244.

20 Asrar, J. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) polymers / J. Asrar, H.E. Valentin, P.A. Berger et al. // Biomacromol. – 2002. – Vol. 3. – P. 1006-1012.

21 Brandl, H. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters / H. Brandl, R.A. Gross, R.W. Lenz et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – Vol. 54. – P. 1977-1982.

22 Vandamme, P., Coenye, T., 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 2285–2289

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

24 Anis S. N. S. Increased recovery and improved purity of PHA from recombinant *Cupriavidus necator* / Siti Nor Syairah Anis, Nurhezreen Md Iqbal, Sudesh Kumar & Amirul Al-Ashraf // *Bioengineered*. - 2013. - №4(2). - P. 115-118.

25 Jacquelin N. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates) / N. Jacquelin, C-W. Lo, Y-H. Wei, H-S. Wu, S. S. Wang // *Biochemical Engineering Journal*. - 2008. - № 39. - P. 15-27.

26 Fiorese M. L. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate / M. L. Fiorese, F. Freitas, J. Pais, A. M. Ramos, G. M. F. de Aragão, M.A.M. Reis // *Engineering in Life Sciences*. - 2009. - № . P. 454–461.

27 Wampfler B., Ramsauer T., Rezzonico S., Hirschler R., Köhling R., Thöny-Meyer L., Zinn M.: Isolation and purification of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHA) for medical applications using nonchlorinated solvents. *Biomacromolecules*, 11, 2716– 2723 (2010). DOI: 10.1021/bm1007663

28 Mohamed H. PHA Recovery from Biomass [Электронный ресурс] / Mohamed H. Madkour, Daniel Heinrich, Mansour A. Alghamdi, Ibraheem I. Shabbaj, Alexander Steinbüchel // *Biomacromolecules* 14– P. 25-30. – 2013.

29 Khan F. A. Separation of polyhydroxyalkanoates-producing bacterial strains using PHA synthase gene and their evaluation for PHA deposition / A. B. Khan, M. I. Khattak, O. M. Tarar, F. Habib, K. Jamil, A. Yasmin, S. Parvez // *Brazilian Archives of Biology and Technology*. - 2013. - Vol.4, №56. - P. 645-652.

30 Сырвачева Д. А. Микробиологический синтез и характеристика полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры среднецепочечного 3-гидроксигексаноата : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Сырвачева Дарья Анатольевна. - Красноярск, 2016. - 138 с

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

32 Yang Y.H. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) //Biotechnology letters. – 2011 – Т. 33 – №. 5 – С. 937-942.

33 Киселев Е. Г. Технико-технологические основы биосинтеза резервных полигидроксиалканоатов водородными бактериями : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Киселев Евгений Геннадьевич. - Красноярск, 2012. - 20 с.

34 Ramsay J.A. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment / J.A. Ramsay, E. Berger, B.A. Ramsay, C. Chavarie // Biotechnology Techniques - Vol. 4 -P. 221–226.– 2009.

35 A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus subtilis* MSBN17 [Электронный ресурс] / G. Sathiyarayanan, G. Saibaba, G. Seghal Kiran, Joseph Selvin // Режим доступа : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813013002237>

36 Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture / Y. Jiang, G. Mikova, R. Kleerebezem, L. AM van der Wielen, M. C Cuellar //AMB Express–P. 55-59.– 2015.

37 Choi J. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals / Jong-il Choi, Sang Yup Lee. - Vol. 62, №. 5. P. 546-553. – 2009.

38 Quines L. K. Métodos de extração de poli-hidroxiálcanoatos a partir de biomassabacteriana / L. K. M. Quines, M. Schmidt, K. Zanfonato, W. Schmidell, M. F. Gláucia // Aragoão - P.1207-1218. – 2015.

39 Kapritchkoff F. M. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha* / F.M. Kapritchkoff, P.A.Viott, R.C.P. Alli, M. Zuccolo, J.G.C Pradella, A.E. Maiorano, E. A. Miranda, A. Bonomi // Journal of biotechnology. – 2006. – Vol. 122, №. 4. – P. 453-462

40 Neves A. Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator* / A. Neves, J. Müller // Biotechnology Progress–P. 58-63. -2012.

41 Koller M. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass / Martin Koller, Horst Niebelschütz, Gerhart Braunegg // Engineering in Life Sciences. - 2013. - № 13. - P. 549-562.

42 Laycock, B. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoate / B. Laycock, P. Halley, S. Pratt et al. // Prog. Polym. Sci. – 2013. – Vol. 38. – P. 536-583.

43 Jian J. Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant *Aeromonas hydrophila* / J. Jian, Z.J. Li, H.M. Ye et al. // Bioresour. Technol. – 2010. – Vol. 101. – P. 6096-6102.

44 Wong, Y.M. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator* / Y.M. Wong, C.J. Brigham, C. Rha et al. // Bioresour. Technol. – 2012. – Vol. 121. – P. 320-327.

45 Wanga Q. Optimization of polysaccharides extraction from seeds of *Pharbitis nil* and its anti-oxidant activity [Электронный ресурс] / Q. Wanga, Y. Suna, B. Yanga, Z. Wanga, Y. Liua, Qi Caoa, X. Sunb, H. Kuanga // Carbohydrate Polymers. - № 102. – P. 460 - 466. – 2014. Режим доступа: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713012083>.

46 Xiong Z. Efficient extraction of intracellular reduced glutathione from fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol / Z. Xiong, M. Guo, Y. Guo, J. Chu, Y. Zhuang, S. Zhang // Bioresource Technology. - № 100. – P. 1011–1014. – 2009.

47 Таблицы планов эксперимента. Для факторных и полиномиальных моделей. Справочное издание Бродский В.З., Бродский Л.И., Голикова Т.И., Никитина Е.П., Панченко Л.А. - Под ред. В.В. Налимова. - М.: Металлургия, 1982. – 753 с.

48 Wilde E. Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas eutropha* / E. Wilde // Arch. Mikrobiol. – 1962. – Vol. 43. – P. 109-137.

49 Reinecke F. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers / F. Reinecke, A. Steinbüchel // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 16. – P. 91-108.

50 Volodina E. Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of *Ralstonia eutropha* H16 for applications in biotechnology / E. Volodina, M. Raberg, A. Steinbüchel // Critical Rev. Biotechnol. – 2015. – P. 1-14. DOI:10.3109/07388551.2015.1079698

51 Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, С. Уилльямс; пер. с англ.; под ред. Г.А. Заварзина. – 9-е изд., перераб. и доп. – М.: Мир, 1997. – 2 т.

52 Волова Т.Г. Получение и исследование микробных гетерополимерных полиоксиканоатов / Т.Г. Волова, О.Г. Беляева, Г.С. Калачева [и др.] // ДАН. – 1996. – Т. 347. – С. 256-258

53 Волова Т.Г. Полиоксиканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск: СО РАН, 2003. – 330 с.

54 Гавриленко А.К. Планирование и обработка эксперимента в пакете Statgraphics / Гавриленко А.К. – Екатеринбург: УрГУПС, 2012. – 30 с.

55 Braunegg, G. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass / G. Braunegg, B. Sonnleitner, R.M. Lafferty // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1978. – Vol. 6. – P. 29-37.

56 Brandl H. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters / H. Brandl, R.A. Gross, R.W. Lenz et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – Vol. 54. – P. 1977-1982.

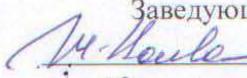
57 Prasad M.P. Production and isolation of polyhydroxyalkanoates from *Pseudomonas sp.* using waste cooking oil as a sole carbon source / Prasad M.P. and Rekha Sethi //International Journal of Advanced Biotechnology and Research. – Vol 4. - Issue 4. – 2013. – P.527-532.

58 Mitra Mohammadi. Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol / Mitra Mohammadi, Mohd Ali Hassan, Lai-Yee Phang, Hidayah Ariffin, Yoshihito Shirai, Yoshito Ando // BiotechnolLett. – 2012. – P.253–259.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова
« 18 » июня 20 18 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
Оптимизация метода экстракции биополимеров из биомассы
бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646

06.04.01 Биология

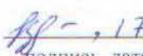
06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель


подпись, дата

доцент, к.т.н. Е.Г. Киселёв
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

С.Ю. Воронина
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

доцент, к.т.н. В.А. Кожухов
инициалы, фамилия

Красноярск 2018