


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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующая кафедрой

  
Т. Г. Волова

« 30 » июня 2020 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Использование мелассы в качестве субстрата для биосинтеза ПГА  
тема

Руководитель



ст. преподаватель, к.б.н.

А.В. Демиденко

Выпускник



А.Л. Ильющенко

Красноярск 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Полигидроксиалканоаты - биополимеры микробного происхождения .....	6
1.2 Биосинтез ПГА .....	9
1.3 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА .....	13
1.4 Меласса как источник углерода в промышленности .....	16
1.5 Обработка мелассы для роста клеток .....	18
2 Материалы и методы .....	21
2.1 Объект исследования - <i>Cupriavidus eutrophus</i> В-10646.....	21
2.2 Подготовка инокулята .....	21
2.3 Анализ проб .....	22
2.3.1 Измерение оптических показателей культуры .....	22
2.3.2 Определение сухой биомассы клеток .....	23
2.3.3 Определение концентрации фруктозы .....	24
2.3.4 Определение концентрации глюкозы .....	25
2.3.3 Определение содержания аммонийного азота.....	25
2.4 Расчет кинетических параметров роста культуры .....	26
2.5 Культивирование бактерий с использованием мелассы.....	26
2.5.1 Предварительная обработка мелассы .....	27
2.5.2 Удаление сухих веществ $H_2O_2$ .....	27
2.5.3 Кислотный гидролиз мелассы .....	28
2.5.4 Щелочный гидролиз мелассы.....	28

2.6	Микробиологический контроль.....	28
2.7	Выделение полимера .....	29
2.8	Определение содержания в клетках состава ПГА.....	29
2.9	Статистическая обработка данных.....	30
3	Результаты и обсуждения.....	31
3.1	Культивирование <i>Cupriavidus Eutrophus</i> B-10646 на нативной мелассе.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2	Культивирование <i>Cupriavidus Eutrophus</i> B-10646 на очищенной и гидролизованной мелассе.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2.1	Очищение мелассы .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2.2	Гидролиз мелассы .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2.3	Культивирование <i>Cupriavidus Eutrophus</i> B-10646 .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
	<b>Закладка не определена.</b>	
	ВЫВОДЫ.....	31
	Список использованных источников .....	32

## ВВЕДЕНИЕ

Объемы выпуска пластмассовых изделий на основе нефти неуклонно растут, при этом неразлагающиеся продукты производства оказывают высокую нагрузку на окружающую среду, поскольку они накапливаются в водоемах, почве и свалках в течение многих лет. Радикальным решением проблемы является создание и освоение широкой гаммы полимеров, способных при соответствующих условиях подвергаться биодegradации с образованием безвредных для живой и неживой природы веществ [1].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой группу микробиологических сложных полиэфиров с термопластичными свойствами, аналогичными свойствам обычных полиолефинов, с тем преимуществом, что они являются биоразлагаемыми, биосовместимыми и производятся из возобновляемых источников, что делает их очень перспективными материалами для промышленного применения. Тем не менее, значительная разница в стоимости между ПГА и пластмассами нефтехимического происхождения представляет собой серьезное препятствие для частичной замены последних. В настоящее время коммерчески доступные ПГА производятся в промышленности с использованием чистых микробных культур (как в дикой форме, так и рекомбинантных штаммов) и чистых, как правило, дорогих субстратов. Цена в основном зависит от стоимости субстрата, составляя около 40% от общих затрат на производство [2].

В настоящее время чистая фруктоза и глюкоза являются основными источниками углерода, используемыми для крупномасштабного производства. Поэтому выбор источника углерода является одним из ключевых факторов, определяющих его экономическую целесообразность при крупномасштабном производстве. Использование недорогих, но богатых питательными веществами материалов в качестве субстрата для ферментации, является наиболее жизнеспособной стратегией снижения производственных затрат. Многие исследования были проведены по

производству ПГБ с использованием побочных промышленных продуктов, таких как сыворотка, меласса, глицерин, целлюлозный материал.

Для экономичного производства ПГА, использование более дешевых возобновляемых источников углерода на агропромышленной основе, таких как меласса, становится все более привлекательным. Меласса является побочным продуктом переработки сахара и может использоваться в качестве относительно дешевого источника углерода [3].

**Цель работы:** исследование возможности использования мелассы в качестве углеродного субстрата для роста бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646.

**Задачи:**

1. Исследовать способность роста бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 на мелассе.
2. Подобрать методы гидролиза и очистки мелассы для культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646.
3. Оценить влияние метода гидролиза на продуктивность исследуемого штамма.
4. Определить способность исследуемого штамма утилизировать азотистые вещества, входящие в состав мелассы.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Полигидроксиалканоаты - биополимеры микробного происхождения**

Начиная с 1950-х годов изделия из синтетической пластмассы стали играть важную роль в современном обществе благодаря их исключительным свойствам и отличным характеристикам. Они заменяли традиционные материалы, такие как металл и дерево, в различных отраслях промышленности и повседневной жизни. Пластмассы на основе нефти чрезвычайно устойчивы к химическому воздействию, разложению микроорганизмов, в результате чего имеют длительный срок службы.

Однако, несмотря на свои полезные качества, они накапливаются в окружающей среде и представляют серьезную опасность для здоровья человека, дикой жизни и водной среды обитания. Из-за медленного темпа деградации на свалках чрезвычайно сложно найти подходящий метод для утилизации такого пластика. Сжигание отходов является дорогостоящим способом и приводит к выделению токсичных побочных продуктов. Для решения этих проблем, начались обширные исследования в области биотехнологии. Биоразлагаемые полимеры или биополимеры появились в качестве потенциального заменителя традиционных пластиков. Экономичное производство этих полимеров поможет снизить потребности в синтетических пластмассах и обеспечить будущее с альтернативными экологичными материалами [4].

Из всего многообразия можно назвать две наиболее общие классификации биополимеров:

1. в зависимости от типов разложения пластиков

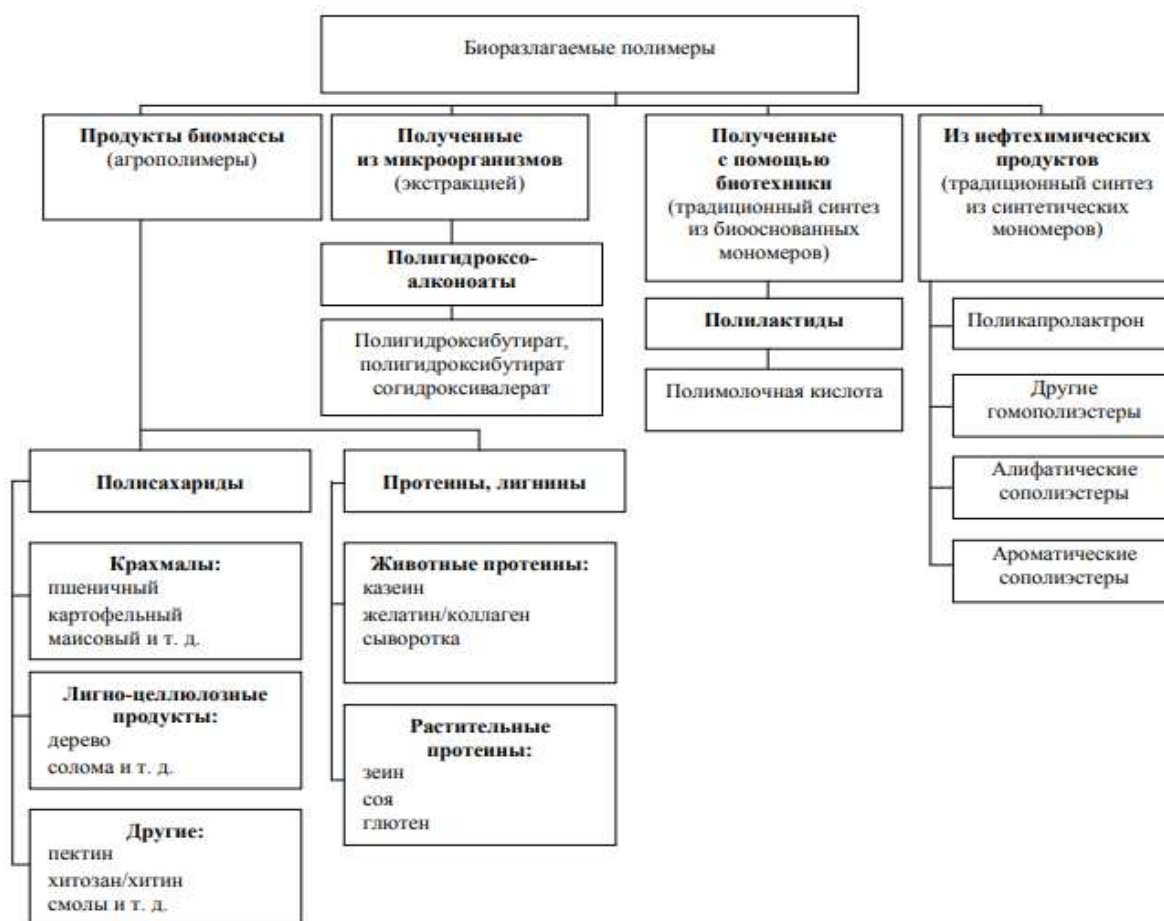
- 1.1. биологически разлагаемые полимеры – природные полимеры и вещества, получаемые на основе природных полимеров: целлюлоза, крахмал,

натуральный каучук, полибутиролактон. Они подвергаются минерализации на 100 %;

1.2. полимеры, подверженные биологической деструкции, – синтетические полимеры (сложные полиэфиры и полиамиды);

1.3. материалы, которые могут подвергаться биологической эрозии, – сополимеры и смеси полимеров, содержащие в своем составе материалы первой группы (сополимеры этилена с винилацетатом, сополимеры этилена и пропилена, сополимеры этилена и винилового спирта, полиэтилен с крахмалом и пр.);

## 2. В зависимости от метода синтеза полимеров (рисунок 1)



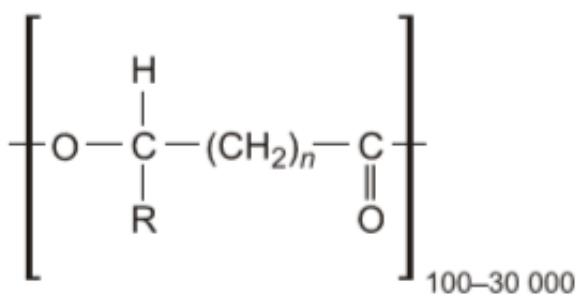
**Рисунок 1 – Классификация биологически разлагаемых полимеров**

[Ошибка! Закладка не определена.]

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой семейство биоразлагаемых полимеров, синтезируемых микроорганизмами, которые

используются в клетке в качестве источника энергии. ПГА - это сложные полиэферы гидроксиалкановых кислот, которые вырабатываются различными видами бактерий в условиях ограничения питательных веществ, таких как фосфор, азот, кислород или магний, с сопутствующим избытком источника углерода [5]. Бактерии накапливают ПГА в цитоплазме, в виде гранул размером от 0,2 до 0,5 мкм., хотя их форма, размер, структура и физические свойства зависят от организма-производителя и условий культивирования, все полиэферы являются термопластичными, нерастворимыми в воде, нетоксичными, относительно устойчивыми к гидролитическому разложению, биосовместимыми и биоразлагаемыми [6].

Основные структуры ПГА проиллюстрированы на рисунке 2 [7].



$n = 1$	R = водород	– поли (3-гидроксипропионат),
	R = метил	– поли (3-гидроксипропионат),
	R = этил	– поли (3-гидроксивалерат),
	R = пропи́л	– поли (3-гидроксигексаноат),
	R = пентил	– поли (3-гидроксиоктаноат),
	R = нонил	– поли (3-гидроксидодеcanoат),
$n = 2$	R = водород	– поли (4-гидроксипропионат),
$n = 3$	R = водород	– поли (5-гидроксивалерат).

**Рисунок 2 – Общая структура полигидроксиалкананоатов [7]**

По длине углеродной цепи условно все ПГА можно разделить на 3 группы:

- 1) короткоцепочечные (3–5 атомов углерода);
- 2) среднецепочечные (6–14 атомов углерода);
- 3) длинноцепочечные (более 17 атомов углерода)



Различие между классами главным образом связано с субстратной специфичностью ПГА синтаз, которые могут осуществлять полимеризацию с определенным диапазоном длины углерода. Например, синтазы штаммов *P. oleovorans* полимеризуют оксикислоты, содержащие от 6 до 14 атомов углерода, тогда как синтаза *A. eutrophus* из 3–5 атомов углерода [8].

Полигидроксиалканоаты обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом, а также характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью. ПГА обладают термопластичными свойствами. При нагревании молекулярные цепи в ПГА легко сдвигаются относительно друг друга, в результате этого материал размягчается и приобретает текучесть. Данное технологическое свойство имеет большую коммерческую ценность, так как позволяет получать из ПГА разнообразные изделия и материалы с использованием различных методов (прессования, экструзии и др.) [7].

Потенциальные сферы применения ПГА широки и могут включать сельское и коммунальное хозяйство, радиоэлектронику, фармакологию. Особо перспективны эти полимеры для разработки изделий и устройств медико-биологического назначения, включая возможность получения нетканых и одноразовых изделий, шовных и перевязочных материалов, контролируемых систем доставки лекарственных средств, матриц для клеточной и тканевой инженерии, элементов для восстановительной хирургии и трансплантологии [9].

## **1.2 Биосинтез ПГА**

Успешное крупномасштабное производство ПГА зависит от трех ключевых факторов: стоимость субстрата, последующая обработка полимера и разработка всего биопроцесса в целом. Процессы промышленного производства ПГА, как правило, разработаны с использованием граммотрицательных штаммов *Cupriavidus necator* и *Alcaligenes latus*. Главным

преимуществом этих бактерий является высокий выход полимера и способность биосинтеза ПГА на различных субстратах [10]. Огромные усилия были направлены на развитие синтеза полимеров на основе грамположительных штаммов, таких как *Bacillus* sp. и *Corynebacterium glutamicum*. Отсутствие липополисахаридного слоя этих бактерий позволяет получать ПГА с минимальным уровнем очистки. Подобное сырье является идеальным для сферы медицинских применений [7].

Помимо естественных штаммов для производства ПГА все чаще используют высокоурожайные рекомбинантные штаммы. Однако при работе с микроорганизмами важно обеспечить стабильность плазмид, прежде чем сконструированный штамм можно будет использовать для крупномасштабного производства. В противном случае существует риск того, что она может потерять свою функцию в течение нескольких циклов ферментации. Кроме того, для поддержания стабильности плазмиды обычно требуется добавление дорогих антибиотиков в среду, что не очень подходит для экономичного крупномасштабного производства. В таком случае используют другие стратегии, например создание ауксотрофного мутанта с делецией и последующее дополнение этой мутации плазмидой, содержащей удаленный ген [11]. Рекомбинантная *E.coli* обычно используется для производства ПГА из-за ее удобства для генетических манипуляций, быстрого роста, высокой конечной плотности клеток и способности использовать недорогие источники углерода [12].

Использование термофильных или термотолерантных штаммов создает ценовые преимущества для промышленного производства ПГА. Так как подобные бактерии работают при средней и повышенной температуре, это ускоряет скорость реакции, что снижает затраты на охлаждение, нагревание и снижает вероятность перекрестного загрязнения другими микроорганизмами.

Другим способом снижения стоимости ферментации является развитие производства на недорогих и возобновляемых углеродных субстратах,

включая отходы и побочные продукты сельского хозяйства и промышленных источников, вместо чистых и рафинированных субстратов. Природа микроорганизма, метаболический путь, составляющие среды и стратегия биопроцесса являются важными факторами, контролирующими выход и качество полимера [13].

*Cupriavidus necator*, она же *R. eutropha* или *A. eutropha* - наиболее изученная бактериальная культура для биосинтеза ПГА. Imperial Chemical Industries были первыми, кто использовал этот бактериальный штамм для производства сополимера PNBV под торговой маркой Biopol. В настоящее время бактериальная ферментация *C. necator* представляет наиболее экономически эффективный процесс, и даже если производство переключается на другие бактерии или сельскохозяйственные культуры, в этих процессах могут использоваться гены этой культуры [14].

ПГА является идеальным материалом для хранения углерода благодаря его низкой растворимости и высокой молекулярной массе, вызывающей незначительный осмотический стресс для бактериальных клеток. После синтеза сложных полиэфиров они служат источником углерода и энергии во время голодания. Однако содержание ПГА в большинстве бактерий низкое и составляет от 1 до 30 % клеточной массы. ПГА хранятся внутри клеток в виде дискретных гранул диаметром 0,2–0,5 мкм. Взвешенные в цитоплазме включения содержат от 5 до 10 % воды и в основном аморфны. Каждая гранула окружена фосфолипидной монослойной мембраной, в которой находятся белки, включая ПГА-синтазу и деполимеразу. Предполагается, что другие белки (фазины) участвуют в стабилизации аморфного гидрофобного ПГА внутри цитоплазмы гидрофильных клеток. Белки и другие клеточные компоненты вокруг гранул ПГА влияют на восстановление и очистку биополиэфиров из клеточной массы [15].

Пути биосинтеза ПГА прямо или косвенно связаны со многими центральными метаболическими путями, включая гликолитические и пентозофосфатные пути, цикл Кребса и пути биосинтеза и расщепления

аминокислот и жирных кислот. Из 14 путей биосинтеза ПГА, о которых сообщалось до настоящего времени, ацетил-КоА является важным ключевым предшественником для биосинтеза. Первый охарактеризованный, а также лучший репрезентативный путь - это способ синтеза поли (3-гидроксибутирата), включающий три стадии реакции, катализируемые ацетил-СоА-ацетилтрансферазой ( $\beta$ -кетотиолаза; PhaA), ацетоацетил-СоА-редуктазой (PhaB) и РНА-синтазой (PhaC). PhaA катализирует конденсацию двух молекул ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА, который, в свою очередь, превращается в (R) -3-гидроксибутирил-КоА [(R) -3-НВ-СоА] с помощью PhaB. Наконец, PhaC полимеризует (R) -3-НВ-СоА в растущую цепь. Этот путь биосинтеза широко изучался у различных микроорганизмов. Однако подробные молекулярные механизмы биосинтеза ПГА остаются неясными из-за отсутствия структурной информации о ферментах. Интересно, что *S. псагатор*, содержит две ацетил-СоА-ацетилтрансферазы. Хотя эти два фермента опосредуют одни и те же каталитические реакции, они имеют различную субстратную специфичность. PhaA может катализировать реакцию конденсации только двух молекул ацетил-КоА, тогда как  $\beta$ -кетотиолаза катализирует реакцию конденсации ацетил-СоА и ацил-СоА с различной длиной углерода, таких как ацетил-КоА, пропионил-КоА и бутирил-КоА [16].

Во время, когда доступны источники углерода и другие питательные вещества в среде, бактерии растут нормально, и в этом случае происходит ингибирование 3-кетотиолазы из-за свободного коэнзима-А из цикла Кребса. Однако во время отсутствия питательных веществ доступ ацетил-КоА в цикл Кребса жестко контролируется, а его избыток направляется на синтез молекул ПГБ. Создание других мономерных звеньев ПГА было зарегистрировано путями, регулирующими метаболизм жирных кислот, в котором  $\beta$ -окисление играет решающую роль. Во втором пути биосинтеза ПГА используются субстраты, которые могут быть далее полимеризованы РНА-синтазой псевдомонад, такой как *P. aeruginosa*. Промежуточное

соединение пути  $\beta$ -окисления, транс-2-еноил-КоА, далее превращается в (R) - гидроксиацил-КоА под действием (R) -специфической еноил-КоА-гидратазы в *A. Caviae*. Путь III биосинтеза ПГА использует простые и структурно связанные субстраты, такие как глюкоза, сахароза и фруктоза для биосинтеза мономера PHAs. Фермент, кодируемый геном *phaG* (ацил-АСР-СоА трансацилаза), превращает промежуточные соединения (R) -3-гидроксиацил, в белок ацильного носителя через КоА [14].

### **1.3 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА**

Несмотря на удивительные свойства ПГА, они по-прежнему несопоставимы с пластиками на нефтяной основе, поскольку стоимость их производства в 5–10 раз выше [17]. Большинство источников углерода, используемых для обычного производства ПГА, представляют собой чистое сырье, состоящее из чистых углеводов (глюкоза, сахароза, мальтоза, крахмал), жирных кислот и их производных, метанола и алканов. С точки зрения производственных затрат, стоимость углеродного субстрата является основным фактором, составляющим до 50% от общей себестоимости. Поэтому желательно найти дешевое альтернативное углеродное сырье, чтобы увеличить коммерческую привлекательность ПГА [18].

С этой точки зрения, для производства ПГА и его сополимеров используется широкий спектр субстратов, включая побочные продукты промышленных производств: жиры и масла, лигноцеллюлозное сырье, сельскохозяйственные и бытовые отходы, глицерин, сахара и сточные воды.

Одним из перспективных источников углерода является сыворотка, побочный продукт производства сыра и казеина составляет до 90% объема переработанного молока. Половина этой сыворотки превращается в полезные продукты для человека и животных, а оставшая часть обычно выбрасывается в окружающую среду. Были предприняты попытки использовать сыворотку в качестве источника углерода для роста бактерий в качестве дешевого

субстрата для производства ПГА. Сообщалось о выходе РНА 1,27 г / л с выходом биомассы 5,0 г / л с использованием *P. Hydrovovora* [19]. Конверсию лактозы также получали генетической модификацией *S. necator* путем введения генов *lacZ* (кодирующей  $\beta$ -галактозидазу), *lacI* (кодирующей репрессор *lac*) и *lacO* (оператор *lac*) *Escherichia coli* [20].

Значительное количество отходов образуется в индустрии быстрого питания. Растительное масло, используемое для жарки, нуждается, как правило, в надлежащей утилизации, которая нуждается в большом количестве кислорода. Отработанные масла являются подходящими субстратами для производства ПГА. Было показано, что *S. necator* дикого типа эффективно накапливает полимер из отработанных масел (до 57%) [21], отработанного рапсового масла (62%) [22], и отработанного масла для жарки [23].

Отходы и остатки сельскохозяйственных культур состоят из огромного количества растительной биомассы, потенциально ценной для переработки. Как известно, зеленые растения накапливают энергию в виде крахмала, который может использоваться в качестве сырья для ПГА. Однако обычно крахмал требует предварительной обработки гидролизом для получения глюкозы. Путем превращения осахаренного отработанного картофельного крахмала в условиях периодической ферментации с подпиткой была достигнута высокая плотность клеток *R. eutropha*, с содержанием ПГБ 55%. Таким образом, демонстрируя большой потенциал такого сырья на основе крахмала [24].

В настоящее время отходы глицерина образуются в огромных количествах в качестве основного остатка от производства биодизеля. Сырой глицерин, полученный в результате реакции переэтерификации, составляет почти 10% от конечной массы биодизеля. Поскольку мировое производство биодизеля значительно возросло с 10 млрд. литров в 1999 году до примерно 31 млрд. литров в 2016 году, неочищенное производное глицерина также производится в соответствующих больших количествах. Как следствие,

рыночные цены на глицерин упали, что делает его привлекательным источником для производства микробных ПГА [25]. В 2014 M.I. Campos et al. исследовали штамм *Cupriavidus necator* IPT 026 в процессе культивирования с использованием сырого глицерина в качестве углеродного субстрата. В результате эксперимента максимальный выход ПГА составил 2,81 г/л, максимальный выход биомассы составил 4,34 г/л [26]. А уже в 2018 сообщалось о достигнутых показателях по урожаю общей биомассы 110г/л и выходу полимера 76,1% [27].

Перспективным источником для производства ПГА также могут выступать отходы сахарной промышленности. Европейский Союз является крупнейшим в мире производителем свекловичного сахара, в результате чего годовой объем производства составляет около 17 млн. тонн. При этом свекловичный сахар составляет всего 20% мирового производства сахара, а остальные 80% производятся из сахарного тростника. Тростник и свекла имеют почти одинаковое содержание сахара (обычно 15% против 18%), но при этом они отличаются по содержанию несахаров (2,5% и 5% соответственно) и волокон (5% и 10%) [28].

Россия входит в десятку ведущих производителей сахарной свеклы во всем мире.<sup>29</sup> Сахарная свекла обычно содержит от 15 до 20% сахарозы на кг свеклы. Приблизительно от 85 до 90% экстрагированного сахара можно извлечь путем кристаллизации, а остальное остается в некристаллизованном сиропе - мелассе, которая считается самой большой потерей на сахарном заводе. Из-за высокой вязкости, ее трудно кристаллизовать. Поэтому она отделяется от системы в резервуары для предотвращения накопления несахаров (примесей), а затем продается по низкой цене как побочный продукт завода. На основании литературных данных можно рассчитать, что 7 т сахарной свеклы перерабатываются для получения 1 т сахара и от 0,25 до 0,35 т патоки.<sup>30</sup> Исходя из примерно  $17 \cdot 10^6$  т свекловичного сахара, производимого в расчете, в год производится  $6 \cdot 10^6$  т мелассы. При этом ожидается, что в развивающихся странах, особенно в странах Азии, будет

наблюдаться дальнейший рост уровня потребления сахара, а значит, и количество мелассы также будет увеличиваться [29].

Меласса уже используется в качестве субстрата для ряда дрожжевых ферментаций, таких как производство лимонной кислоты, глутамата и ацетона, или в качестве удобрения для почвы, кормовой добавки для крупного рогатого скота, ароматизатора в некоторых продуктах или в качестве сырья для биоэтанола [31,32]. Об успешном производстве ПГБ из патоки сообщалось у *Bacillus* sp. [33].

#### 1.4 Меласса как источник углерода в промышленности

Из-за большого содержания сахарозы в мелассе, ее активно используют в качестве сырья для приготовления питательных сред в микробиологической промышленности. Однако меласса имеет сложный и непостоянный химический состав (таблица 1).

Таблица 1 – Химический состав свеклосахарной мелассы [35]

Показатели	Содержание, % к массе		
	минимальное	максимальное	среднее
Сухие вещества	61	86	75-77
Сахароза	40	55	45
Инвертный сахар	0,1	10	0,5-1,2
Раффиноза	-	2,5	0,5-1
Сумма сбраживаемых сахаров	43	57	46-48
Доброкачественность	56	75	62-65
Зола (за вычетом кальциевой)	4	10	6,6-7,5
K <sub>2</sub> O	1	5,5	2,5-3,5
MgO	0,001	1	0,1-0,24
CaO	0,1	2	0,5-0,8



Азот	Общий	0,5	2,3	1,1-1,5
	аминный до гидролиза	0,1	0,5	0,2-0,35
	аминный после гидролиза	0,3	0,8	0,5-0,6
Летучие кислоты		0,3	1,8	0,5-1
SO <sub>2</sub>		0,01	0,05	0,03
Буферная емкость		14	40	22-27
Цветность		0,4	12	2,2-3,2

Сухие вещества мелассы представлены такими компонентами как: сахара, азотистые и безазотистые органические вещества, минеральные вещества. Темно-коричневый цвет патоки обусловлен содержанием пектиновых веществ, которые переходят в результате переработки свеклы, а также красящих веществ, которые образуются в результате меланоидиновой реакции и щелочном разложении моноз. Плотность мелассы составляет 1,35-1,40 [34,35].

Основным условием благополучного сбраживания мелассы является ее надлежащая подготовка, которая заключается в антисептировании, осветлении, подкислении и добавлении химикатов для питания дрожжей. В качестве антисептиков добавляют хлорную известь, сульфенол, формалин, пентохлорфенолят натрия [36]. Для производства дрожжей мелассу предварительно антисептируют, разбавляют водой в соотношении 1:1-1:4 и подкисляют серной или соляной кислотой до pH = 4-5. Затем патоку очищают в центрифугах, фильтр-прессах, кларификаторах и стерилизуют кратковременным нагреванием до 120-140 С° [37,35].

Однако различия между отдельными партиями мелассы обычно велики, что меняет характер роста и свойства выращиваемых на них дрожжей. Решение проблемы состоит в эффективном освобождении мелассы от коллоидных частиц и карамелей. Так, например, существует способ очищения мелассы с помощью перекиси водорода и перманганата калия,

благодаря которому из патоки адсорбируются сахара и достигается эффект обесцвечивания [38].

### **1.5 Обработка мелассы для роста клеток**

Среди бактерий, продуцирующих биополимер, выделяется *Cupriavidus necator*, способный накапливать до 90% своей клеточной массы в ПГБ и использовать несколько субстратов в качестве источника углерода. Хорошо известно, что продуцирование ПГБ *C. necator* имеет две фазы: первая фаза характеризуется ростом численности бактерий в сбалансированных условиях, и вторая фаза, в которой происходит продуцирование ПГБ с ограничением одного компонента, такого как азот или фосфор. Этот штамм приобрел способность метаболизировать глюкозу путем спонтанной мутации, а также он способен потреблять фруктозу, глицерин и органические жирные кислоты. Однако сообщается, что *C. necator* не способна метаболизировать сахарозу [39].

Следовательно, предварительная обработка патоки необходима для гидролиза сахарозы до ее мономера глюкозы и фруктозы. Для гидролиза могут быть использованы химический, ферментативный и комбинированный методы [40].

Гидролиз сахарозы можно проводить с использованием соляной кислоты при 70-80 °С или с помощью инвертазы при 30-45 °С и рН 4,6. Ферментативный катализ требует меньше энергии, чем кислотный процесс, однако эти затраты компенсируются небольшой стоимостью соляной кислоты. Таким образом, предварительная обработка кислотно-катализируемым гидролизом имеет преимущества, поскольку она может снизить стоимость производства на затраты энергии в отличие от использования фермента. Однако загрязнение окружающей среды, связанное с токсичными побочными продуктами, такими как фурфурол и гидроксиметилфурфурол - циклические производные глюкозы и фруктозы,

подвергшиеся воздействию низкого рН и высокой температуры, следует учитывать при проведении обработки [41].

С целью сравнения эффектов различных предварительных обработок патоки в исследовании Dalsasso и др. были испытаны четыре метода: кислотный (серная или хлористоводородная кислоты) и ферментативный (инвертаза или пекарские дрожжи). Для этого мелассу разбавляли дистиллированной водой (1: 1) с последующим центрифугированием. Среди кислотных методов HCl показал более высокую производительность, достигая выхода гидролиза 92%, тогда как выход H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> составлял 50%. Однако наблюдалось образование осадка, который указывал на потерю сахаров, в дополнение к возможному образованию нежелательных побочных продуктов, которые могут быть токсичными для метаболизма бактерий. Инвертазный гидролиз показал наибольший выход, достигнув 90% конверсии, выход 75% был получен с помощью метода *S. Cerevisiae* [40].

В исследовании Sen, K. Y и др. обработку мелассы начинали с центрифугирования разбавленного раствора при 3500 × g в течение 15 минут и фильтрации с использованием фильтровальной бумаги. Полученный раствор затем обрабатывали микроволновым нагревом, серной кислотой, соляной кислотой, гидротермальной кислотой, гидроксидом калия. Самое низкое содержание фруктозы и глюкозы было показано в щелочной обработке, при этом показатель оказался даже ниже, чем в необработанной мелассе, очевидно из-за реакции Милларда и щелочной деградации фруктозы и глюкозы в смесь гидроксильной кислоты [42]. Наибольший выход полимера  $0.78 \pm 1.35$  г/л был достигнут с использованием мелассы, предварительно обработанной серной кислотой, которую затем переносили в автоклавный реактор гидротермального синтеза из нержавеющей стали на 600 мл и затем переносили в предварительно нагретую до 105 °C духовку с горячим воздухом в течение 1 часа. Также хороший результат ( $0.49 \pm 0.35$  г/л) был достигнут с использованием раствора мелассы, предварительно обработанного серной кислотой. Его готовили добавлением 5 мл 1 н. серной

кислоты в 100 мл необработанного раствора мелассы и инкубировали при 90 ° С на водяной бане в течение 1 часа. После инкубации и охлаждения раствор мелассы доводили до рН 7, используя 1 М раствор NaOH [43].

Также известны способы удаления цвета и некоторых микроэлементов (Fe, Ni, Zn) предварительной обработкой мелассы с использованием трикальцийфосфата<sup>44</sup>, активированного угля [45,46].

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования - *Cupriavidus eutrophus* B-10646**

Одним из наиболее исследуемых видов бактерий среди ПГА-продуцирующих микроорганизмов считают *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* (еще ранее *Hydrogenomonas*, *Alcanigenes*, *Ralstonia*)). Штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646 является одним из вариантов, выделенных из культуры глюкозоусваивающего штамма *Ralstonia eutropha* B-8562.

Данный вид обладает широким органотрофным потенциалом и в качестве источников углерода может использовать различные субстраты. Штамм получен в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза в Институте биофизики СО РАН зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Культурально-морфологические особенности: грамотрицательные, слабо подвижные клетки.

Ростовые характеристики: штамм растет на минеральной среде с сахарами или органическими кислотами, а также в атмосфере водорода, двуокиси углерода и кислорода, специфических факторов роста и органических добавок не требуется. Оптимум роста 30-31°C, pH 6,7-7,2 [47].

### **2.2 Подготовка инокулята**

Культивирование бактерий проводили в стерильном режиме с использованием стеклянных колб, заполненных средой Шлегеля на 40-50% по объему, на термостатируемой качалке при температуре 30°C. Для выращивания бактерий за основу был взят фосфатный буфер следующего состава:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 9;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1,5. Также в фосфатный буфер были добавлены следующие растворы:  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,025;

$\text{NH}_4\text{Cl}$ -1,0 (г/л)<sup>48</sup>. Микроэлементы готовились в соответствии прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,288;  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,03;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,08;  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,176;  $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{NiCl}_2$  – 0,008 (г/л). Азот подавался в форме мочевины, и, таким образом, регулирование pH не требовалось. В качестве источника углерода на начальном этапе использовали глюкозу и фруктозу концентрацией 20 г и 22,5 г на 1 л среды соответственно.

В дальнейшем бактерии культивировали в шейкере - инкубаторе Incubator Shaker Innova® серии «New Brunswick Scientific» при температуре 30°C и 200 оборотов (рисунок 3). В процессе культивирования периодически отбирали пробы для анализа.



**Рисунок 3 - Шейкер инкубатора Innova 44**

## **2.3 Анализ проб**

### **2.3.1 Измерение оптических показателей культуры**

Для измерения оптической плотности периодически производился отбор проб культуры, использовали фотоколориметр КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой  $\lambda=5440$  нм (длина оптического пути 1 мм).

### 2.3.2 Определение сухой биомассы клеток

Сухой вес биомассы культуры определяли весовым способом. Для этого аликвоты бактериальной суспензии объемом 50 мл, центрифугировали 10 мин при 6000g. Затем дважды отмывали клетки дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 100°C в сушильном шкафу в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

По полученным данным был построен калибровочный график зависимости количества биомассы от оптической плотности. С помощью него определяли неизвестные значения концентрации (рисунок 4).

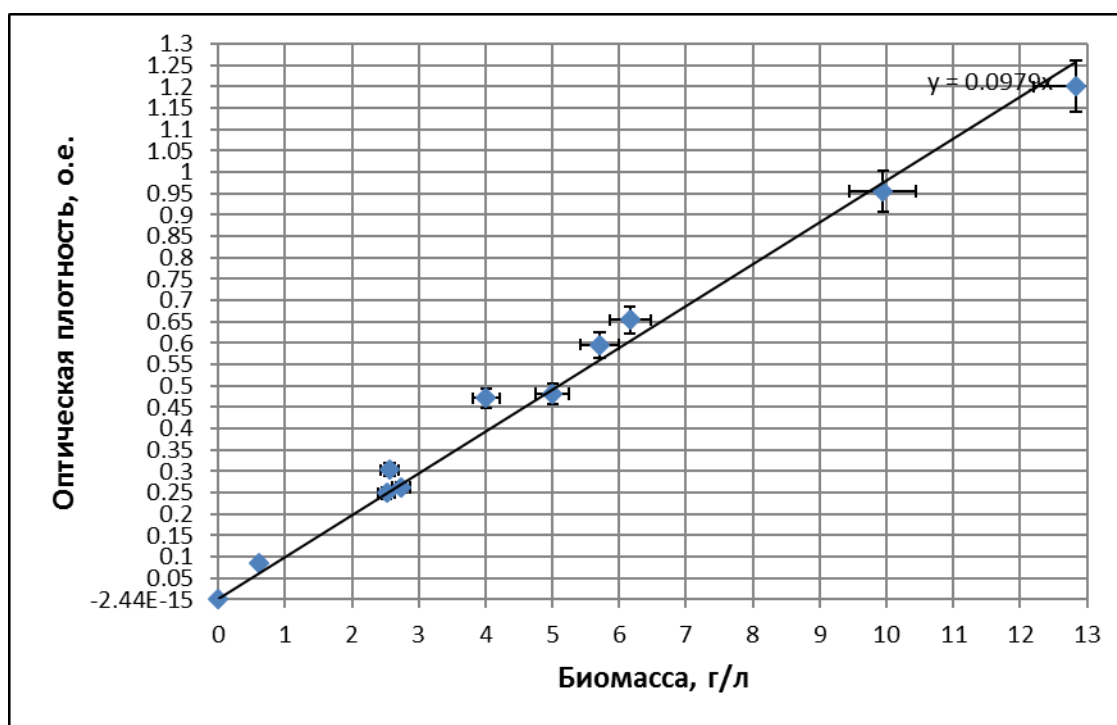


Рисунок 4 – Калибровочный график для определения концентрации биомассы *Cupriavidus eutrophus* B-10646

### 2.3.3 Определение концентрации фруктозы

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого культуральную жидкость, отделенную от клеток бактерий при центрифугировании, разводили в 50 раз, затем 1 мл пробы наливали в пробирку, куда добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 100 мл 95%-ного этилового спирта) и 3 мл раствора соляная кислота: дистиллированная вода в соотношении 5:1. В качестве контроля раствор, где 1 мл культуральной среды заменяли на дистиллированную воду. Пробирки с контролем и пробой помещали на водяную баню на 20 мин, при  $t=80^{\circ}\text{C}$ . По истечении этого времени контроль и пробу охлаждали до комнатной температуры и измеряли концентрацию фруктозы оптическую плотность на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 540 нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику (рис. 5).

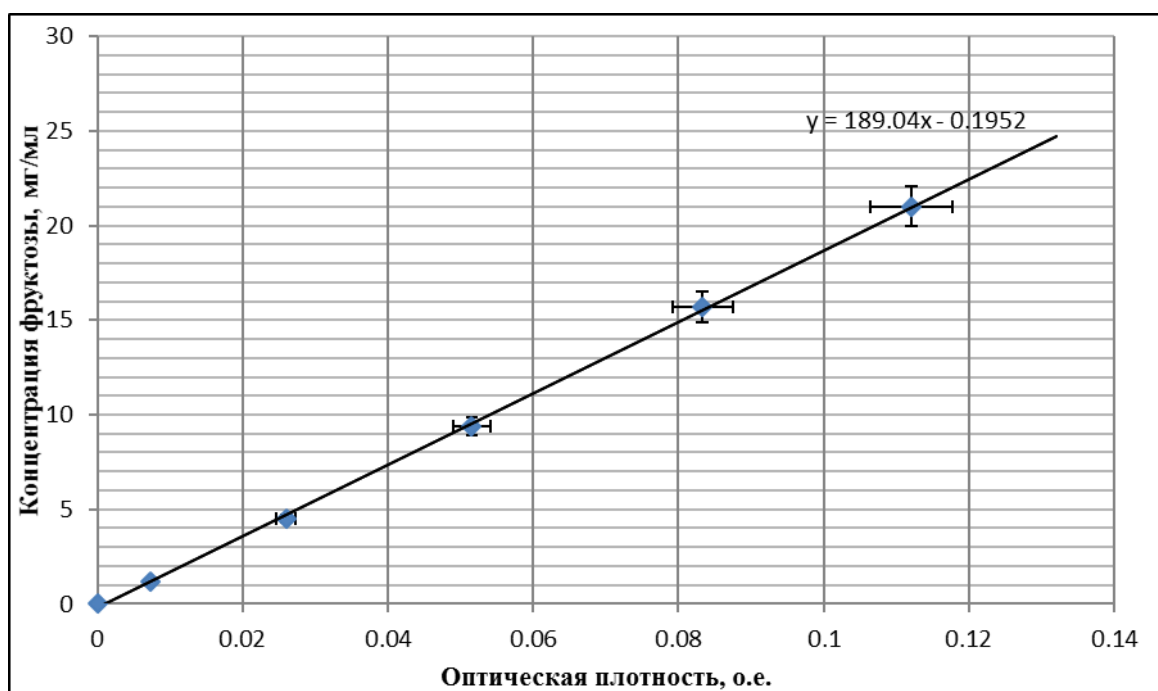


Рисунок 5- Калибровочный график для определения концентрации фруктозы



### 2.3.4 Определение концентрации глюкозы

Для количественного содержания глюкозы использовали ферментно-хромогенную смесь (ФХС): 1 таблетка на 100 мл дистиллированной воды, и фотоколориметр КФК-2МП, при  $\lambda=490$  нм (длина оптического пути 5мм).

2 мл культуры центрифугировали 2 минуты при 6000g. Далее 1 мл фугата разбавили дистиллированной водой в соотношении 1:4.

В три пробирки налили по 2 мл ФХС. В качестве контрольной пробы в первую пробирку добавили 40 мкл дист. воды. Во вторую пробирку добавили 40 мкл калибратора (калибровочная проба). В третью пробирку добавили 40 мкл разведенной жидкости (опытная проба). Оставили на 25 минут при комнатной температуре. По истечении времени измеряли оптическую плотность полученных растворов и определяли концентрацию глюкозы по формуле:

$$K = \frac{ОП_о}{ОП_к} \times 9 \quad (4)$$

где:

ОП<sub>о</sub> - оптическая плотность опытной пробы, о.е.;

ОП<sub>к</sub> - оптическая плотность калибровочной пробы, о.е.;

9 – концентрация глюкозы в калибраторе, г/л.

### 2.3.3 Определение содержания аммонийного азота

Содержание аммонийного азота определяли качественным методом. Для этого к 10 мл дистиллированной воды добавляли 1 мл фугата, каплю щелочи (33% раствора КОН) и 0,5 мл реактива Несслера. В результате полученный раствор изменял свой цвет в зависимости от содержания азота. В качественном методе окраску сравнивали со стандартом. При количественном методе анализа раствор заливали в кювету шириной 1 см и измеряли оптическую плотность при  $\lambda=400$  нм, концентрацию рассчитывали.

## 2.4 Расчет кинетических параметров роста культуры

Удельную скорость роста культуры ( $\mu$ ,  $\text{ч}^{-1}$ ) определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_k}{x_n}\right)}{\Delta t}, \quad (1)$$

где:

$x_n$  - начальная концентрация бактерий, г/л;

$x_k$  - конечная концентрация бактерий, г/л;

$t$  - время культивирования, ч.

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

$$Y = \frac{x_k - x_n}{S_k - S_n}, \quad (2)$$

где:

$x_n$  - начальная концентрация бактерий, г/л;

$x_k$  - конечная концентрация бактерий, г/л;

$S_n$  - начальное содержание используемого субстрата, г/л;

$S_k$  - конечное содержание используемого субстрата, г/л.

Удельную скорость синтеза полимера ( $\mu_\beta$ ,  $\text{ч}^{-1}$ ) определяли по формуле:

$$\mu_\beta = \ln\left(\frac{ПГА_k}{ПГА_n}\right) / \Delta t, \quad (3)$$

где:

$ПГА_k$ ,  $ПГА_n$  – конечная и начальная концентрация полимера в клетках,  $\text{кг/м}^3$ .

## 2.5 Культивирование бактерий с использованием мелассы

Для исследований была взята патока-меласса свекловичная с показателями, представленными в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Качественные показатели мелассы

Показатели	Содержание, %
Сахар	$\geq 46$
Сухие вещества	$\geq 78$
РН	$\leq 6,5$

Таблица 3 – Состав сухих веществ мелассы (1 кг)

Вещество	Содержание, гр.
Сырая зола	116
Сырой протеин	135
Сырой жир	3
Кальций	2,5
Фосфор	0,5
Натрий	7,6
Магний	0,2
Калий	54

### 2.5.1 Предварительная обработка мелассы

Мелассу разбавляли в мерном цилиндре дистиллированной водой в соотношении 1:1. Приготовленный раствор центрифугировали при  $5000 \times g$  в течение 15 минут и использовали в дальнейших экспериментах [44].

### 2.5.2 Удаление сухих веществ $H_2O_2$

При нагревании предварительно обработанного раствора мелассы до температуры  $55-65^\circ C$  добавляли 30%-ный раствор перекиси водорода в соотношении 45 мл мелассы:10 мл  $H_2O_2$ . Спустя сутки содержимое колбы центрифугировали от выпавшего осадка. Очищенную таким образом мелассу

использовали для щелочного и кислотного гидролиза, а далее в качестве субстрата для бактериальной культуры.

### **2.5.3 Кислотный гидролиз мелассы**

В предварительно обработанный раствор мелассы объемом 100 мл добавляли 5 мл однонормального раствора серной кислоты, затем полученную смесь выдерживали при 90°C на водяной бане в течение 1 часа. После инкубации и охлаждения раствор мелассы доводили до pH=7, используя 2М раствор КОН. Гидролизованную таким способом мелассу использовали для культивирования бактерий в эксперименте [43].

### **2.5.4 Щелочный гидролиз мелассы**

В предварительно обработанный раствор мелассы объемом 100мл добавляли 5 мл однонормального раствора гидроксида калия, затем полученную смесь выдерживали при 90°C на водяной бане в течение 1 часа. После инкубации и охлаждения раствор мелассы использовали для культивирования бактерий в эксперименте [43].

## **2.6 Микробиологический контроль**

Для проверки стерильности посевного материала и питательных сред необходимо производить высеив на агаризованную среду.

Работа по микробиологическому контролю включает четыре этапа:

- подготовка и стерилизация пептонного агара для посева в объеме 250мл на одну точку;
- подготовка и стерилизация посуды: 15 пробирок, заполненных водопроводной водой в объеме 9 мл, 10 чашек Петри, стеклянные пипетки, носики для автоматических пипеток;
- приготовление разведений;

- посев на плотную питательную среду в чашки Петри;
- визуальная оценка выросших колоний.

Бактерии штамма *Cupriavidus eutrophus B-10646* выглядят как изолированные, округлые колонии кремового оттенка, непрозрачные со слегка волнистым краем диаметром 2-4 мм.

## 2.7 Выделение полимера

Культуру бактерий объемом 450 мл центрифугировали 10 мин при 6000g. Затем отцентрифугированную биомассу перенесли в колбу объемом 250 мл и добавили этиловый спирт (96%) и дихлорметан объемом 100мл в соотношении 1:2 соответственно. Далее суспензию переместили на нагревательную плитку с магнитной мешалкой до получения однородной массы. Полученный раствор дважды отфильтровали с помощью вакуумного фильтра. В отфильтрованную жидкость добавили раствор гексана в соотношении 1:2 соответственно, далее снова отфильтровали. Полученный полимер высушили и взвесили. Выход ПГА рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ПГА} = \frac{\text{масса ПГА(г/л)}}{\text{биомасса(г/л)}} * 100\% \quad (6)$$

## 2.8 Определение содержания в клетках состава ПГА

Внутриклеточное содержание сополимера в клетках 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. Нижний хлороформенный слой использовали для анализа в хроматографии.

## **2.9 Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета Microsoft Excel 2013 для Windows 10.

### 3 Результаты и обсуждения

#### ВЫВОДЫ

1. Исследовали возможность роста *C. eutrophus* В-10646 на нативной и гидролизованной мелассе.
2. В результате экспериментов определили, что наибольшее удаление зольных веществ из мелассы достигается при использовании перекиси водорода (до 18%).
3. Исследованы показатели роста биомассы и выхода полимера на гидролизованной мелассе. Наибольшие показатели биомассы (5,46 г/л) и ПГА (72 %) были получены на мелассе, гидролизованной серной кислотой. На мелассе, гидролизованной щелочью, были достигнуты показатели роста биомассы 5,1 г/л и ПГА 60% .
4. В ходе исследования определили, что в мелассе находится недостаточное количество азотистых веществ для эффективного накопления биомассы *Cupriavidus eutrophus* В-10646.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

---

1. Raza, Z.A. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications / Z.A. Raza, S. Abid, I.M. Banat // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 2018. – V. 126. – P. 45–56.
2. Albuquerque, M. G. E. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses / M. G. E. Albuquerque, M. Eiroa, C. Torres, B.R. Nunes et al. // *Journal of Biotechnology*. – 2007. – V. 130. – №4. – P. 411–421.
3. Medjeber, N. Screening and production of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus megaterium* by the using cane and beet molasses as carbon sources / N. Medjeber, B. Abbouni, T. Menasria, A. Beddal et al. // *Der Pharmacia Lettre*. – 2015. – V. 7. – №6. – P. 102–109.
4. Kaur, L. Polyhydroxyalkanoates: biosynthesis to commercial production - A review / L. Kaur, R. Khajuria, L. Parihar, G.D. Singh // *Microbiol. Biotechnol. Food Sci*. – 2017. – V. 6. – №4. – P. 1098–1106.
5. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // *Progress in Polymer Science*. – 2000. – V. 25. – №10. – P. 1503–1555.
6. Anjum, A. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements / A. Anjum, M. Zuber, K.M. Zia, A. Noreen et al. // *In. J. Biol. Macromol*. – 2016. – V. 89. – P. 161–174.
7. Волова, Т.Г. Полиоксидоканоаты (ПОА) – Биоразрушаемые полимеры для медицины: монография / Т.Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая. - Новосибирск: Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.
8. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, A.K. Srivastava // *Process Biochemistry*. – 2005. – V. 40. – №2. – P. 607–619.



- 
9. Волова, Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов // Журнал СФУ. Серия: Биология. - 2014. - Т. 7. - №2. - С. 103–133.
10. Tan, G-Y.A. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review / G-Y.A. Tan, C-L. Chen, L. Li, L. Ge et al.// - 2014. - V. 6. - №3. - P. 706–754.
11. 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, C. Rha et al.// Appl. Environ. Microbiol. - 2011. - V. 77. -№9. - P. 2847–2854.
12. Chen, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry / G.-Q. Chen // Chemical Society Reviews. - 2009. - №38. - P. 2434–2446.
13. Kaur, G. Strategies for ~~large~~ production of polyhydroxyalkanoates / G. Kaur, I. Roy // Chem. Biochem. Eng. - 2015. - V. 29. - №2. - P. 157–172.
14. Kumar, M. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects / M. Kumar, R. Rathour, R. Singh, Y. Sun et al. // Journal of Cleaner Production. - 2020. - V. 263. - P. 121500.
15. Yu, J. Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources // J. Yu // Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. - 2007. - P. 585–610.
16. Sagong, H.-Y. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis / H-Y. Sagong, H.F. Son, S.Y. Choi, S.Y. Lee et al. // Trends in Biochemical Sciences. - 2018. - V. 43. -№10. - P. 790–805.
17. Kim, B.S. 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates / B.S. Kim // Enzyme Microb. Technol. - 2000. - V. 27. - №10. - P. 774–777. Sawin, J.L. Biomass Energy / J.L. Sawin, F. Sverrisson, K.

---

Seyboth, R. Adib et al. // Renewables Global Status Report. – 2017. – V. 21. – P. 45–52.

18. Aslan, A.K.H.N. Polyhydroxyalkanoates production from waste biomass /

A.K.H.N. Aslan, M.D.M. Ali, N.A. Morad, P. Tamunaidu // Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2016. – V. 36. – P. 1755-1315.

19. Koller, M. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora* / M. Koller, R. Bona, E. Chiellini, E.G. Fernandes et al. // Bioresour. Technol. – 2008. – V. 99. – №18. – P. 4854–4863.

20. Povo, S. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose / S. Povo, P. Toffano, M. Basaglia, S. Casella // Bioresour. Technol. – 2010. – V. 101. – №20. – P. 7902–7907.

21. Taniguchi, I. Microbial production of poly (hydroxyalkanoate)s from waste edible oils / I. Taniguchi, K. Kagotani, Y. Kimura // Green Chem. – 2003. – V.5. – P. 545–548.

22. Obruca, S. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil / S. Obruca, O. Snajdar, Z. Svoboda, I. Marova // World J. Microbiol Biotechnol. – 2013. – V. 29. – №12. – P. 2417–2428.

23. Verlinden, R.A. Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator* / R.A. Verlinden, D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams et al. // AMB Express – 2011. – V. 11. – №1. – P. 2191-2255.

24. Haas, R. Production of poly (3-hydroxy butyrate) from waste potato starch / R. Haas, B. Jin, F.T. Zepf // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2008. – V. 72. – №1. – P. 253–256.

25. Sawin, J.L. Biomass Energy / J.L. Sawin, F. Sverrisson, K. Seyboth, R. Adib et al. // Renewables Global Status Report. – 2017. – V. 21. – P. 45–52.

---

26. Campos, M. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations / M. Campos, T. Figueiredo, L. Sousa, J. Druzian // *Industrial Crops and Products*. – 2014. – V. 52.– P. 338–346.

27. Демиденко, А. В. Технология биосинтеза полигидроксиалканоатов на глицерине и реализация опытного производства : дис. ... канд. биолог. наук : 03.01.06 / Демиденко Алексей Владимирович. – Красноярск, 2018. – 142 с.

28. Rajaeifar, M. A., (2019). A review on beet sugar industry with a focus on implementation of waste-to-energy strategy for power supply / M.A. Rajaeifar, S.S. Hemayati, M. Tabatabaei, M. Aghbashlo et al. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2019. – V. 103. – P. 423–442.

29. Gray, R. Sugar update. Annual Russian Federation / R. Gray // *Global Agricultural Information Network*. – 2017.– P.1–23.

30. Asadi, M. Beet-Sugar Handbook / M. Asadi. - New Jersey, 2006. – 866 p.

31. Gopal, A.R. Molasses for ethanol: The economic and environmental impacts of a new pathway for the lifecycle greenhouse gas analysis of sugarcane ethanol / A.R. Gopal, D.M. Kammen // *Environ. Res. Lett.* – 2009. – V. 224. –№4. – P. 1748-9326.

32. Saxena, R. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review / R. Saxena, D. Adhikari, H. Goyal // *Renewable Sustainable Energy Reviews*. – 2007. – V. 13. –№1. – P. 167-178.

33. Santimano, M.C. PHA production using ~~cost~~ agro- industrial wastes by *Bacillus* sp. strain COL1/A6 / M.C. Santimano, N.N. Prabhu, S. Garg // *Research Journal of Microbiology* – 2009. – V. 4. – P. 89–96.

34. Бекер, М.Е. Введение в биотехнологию / М.Е. Бекер. – Москва : Пищевая промышленность, 1978. – 231 с.

- 
35. Яровенко, В.Л. Технология спирта / В.Л. Яровенко, В.А. Маринченко, В.А. Смирнов. – Москва : Колос-пресс, 2002. – 465 с.
36. Халаим, А.Ф. Технология спирта : учебное пособие / А.Ф. Халаим. - Москва : Пищевая промышленность, 1972. – 192 с.
37. Шнайдман, Л.О. Производство витаминов из растительного и животного сырья / Л.О. Шнайдман. – Москва : Пищепромиздат, 1950. – 323 с.
38. Пат. №2301266 Российская Федерация, МПК51 С 13 J 1/02. Способ очистки мелассы / А. А. Славянский, М. Б. Мойсеяк, И. С. Орехова. - № 2005140028/13; заяв. 22.12.05; опуб. 20.06.07, Бюл. №17. – 4 с.
39. Arikawa, H. Polyhydroxyalkanoate production from sucrose by *Cupriavidus necator* strains harboring csc genes from *Escherichia coli* W / H. Arikawa, K. Matsumoto, T. Fujiki // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – V. 101. –№20. – P. 7497-7507.
40. Dalsasso, R. R. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate / R. R. Dalsasso, F.A. Pavan, S. E. Bordignon, G.M.F. de Aragao et al. // *Process Biochemistry.* – 2019.– V. 85. – P. 12-18.
41. Tomotani, E.J. Inverted sugar syrup attained from sucrose hydrolysis using a membrane reactor / E.J. Tomotani, M. Vitolo // *Brazilian J. Pharm. Sci.* – 2010.– V. 46. – P. 571-577.
42. Yang, B.Y. Alkaline degradation of invert sugar from molasses / B.Y. Yang, R. Montgomery // *Bioresour. Technol.* – 2007. – V. 98. – №16. – P. 3084-3089.
43. Sen, K. Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source / K. Y. Sen, M. H. Hussin, S. Baidurah // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* – 2018. – V. 17. – P. 51-59.

---

44. Küçükaşık, F. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. / F. Küçükaşık, H. Kazak, D. Güney, I. Finore et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – V. 89. – P. 1729–1740.

45. Wu, L. Green synthesis of isomaltulose from cane molasses by *Bacillus subtilis* WB800-pHA01-*palI* in a biologic membrane reactor / L. Wu, S. Wu, J. Qiu, C. Xu et al. // *Food Chemistry*. – 2017. – V. 229. – P. 761-768.

46. Gojgic-Cvijovica, G.D. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium / G.D. Gojgic-Cvijovica, D.M. Jakovljevic, B.D. Loncarevica, N.M. Todorovica et al. // *International Journal of Biological Macromolecules* January. – 2019. – V. 121. – P. 142-151.


47. Пат. №2439143 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С 12 Р 7/62. Штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* ВКПМ В-10646 – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения / Т. Г. Волова, Е.И. Шишацкая. - № 2010146514/10; заяв. 15.11.10; опуб. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 13 с.

48. Schlegel H. A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies / H.G. Schlegel, H. Kaltwasser, G. Gottschalk // *Arch. Microbiol.* –1961. – № 38. – P. 209-222.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующая кафедрой

  
Т. Г. Волова

« 30 » июня 2020 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Использование мелассы в качестве субстрата для биосинтеза ПГА  
тема

Руководитель



ст. преподаватель, к.б.н.

А.В. Демиденко

Выпускник



А.Л. Ильющенко

Красноярск 2020