

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
Исследование параметров процесса термической сушки биомассы штамма
Cupriavidus eutrophus В 10646
тема
06.04.01 Биология
код и наименование направления
06.04.01.01 Микробиология и биотехнология
код и наименование магистерской программы

Научный руководитель _____ доцент, к.т.н. С.В.Барановский

Выпускник _____ С.А. Хвостова

Рецензент _____ доцент, к.т.н. В.А.Кожухов

Красноярск 2017

Реферат

Магистерская диссертация по теме « Исследование параметров процесса термической сушки биомассы штамма *Cupriavidus eutrophus* В 10646 » содержит 67 страниц текстового документа, 17 иллюстраций, 3 таблицы, 65 использованных источников.

Ключевые слова: экстракция, полигидроксиалканоаты, полимер, биомасса бактерий, *Cupriavidus eutrophus*, термическая сушка.

Цель работы:

Целью данной работы является исследование влияния различных режимов сушки биомассы для нахождения оптимального варианта для промышленного использования.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- 1.Получить образцы биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646.
- 2.Исследовать влияние различных температурных режимов сушки биомассы бактерий на скорость процесса.
- 3.Установить влияние температуры и режима высушивания биомассы бактерий на выход и физико – химические свойства полимера.
- 4.На основании полученных результатов определить наиболее оптимальный режим сушки биомассы бактерий.

Актуальность настоящего исследования заключается в оптимизации процесса термической сушки биомассы с последующим выделением биополимера для повышения эффективности процесса экстракции и снижения экономической стоимости полимера как конечного продукта.

Содержание

Введение.....	5
1 Обзор литературы.....	7
1.1 Биоразрушаемые полимеры как замена традиционным синтетическим полимерам.....	7
1.2 Фазы выделения ПГА.....	12
1.3 Характеристика ПГА	13
1.4 Особенности процессов выделения ПГА	14
1.4.1 Способ расщепление микробной оболочки с помощью щелочи и гипохлорита натрия.....	16
1.4.2 Комбинированный способ выделения ПГА.....	17
1.4.3 Использование ферментов, детергентов для очистки и выделения ПГА.....	17
1.4.4 Экстракция ПГА с помощью органических и неорганических растворителей.....	20
1.5 Сложности экстракции сырой биомассы.....	22
1.6 Необходимость оптимизации процесса сушки.....	22
1.7 Сушка в микробиологическом процессе.....	25
1.8 Сушилки, применяемые в микробиологической промышленности.....	27
1.8.1 Вальцовые сушилки.....	27
1.8.2 Распылительные сушилки.....	29
1.8.3 Распылительная сушилка с центробежным распылением	30
1.8.4 Барабанные сушилки.....	31
1.8.5 Сублимационные сушилки.....	32
1.8.6 Термическая сушка биомассы.....	35
1.9 Выделение жизнеспособных микроорганизмов.....	36
1.9.1 Культурально - морфологические особенности штамма....	37

1.9.2	Культивирование бактерий (автотрофный, гетеротрофный режимы).....	39
1.9.3	Основные характеристики штамма.....	39
2	Материалы и методы.....	41
2.1	Сушильный шкаф Memmert UN 55, лиофильный шкаф Ilshin Bio Base (Корея).....	41
2.1.1	Определение влажности.....	42
2.2	Основные технологические стадии. Получение инокулята, биосинтез, сгущение, сушка.....	43
2.3	Стадия экстракции.....	44
2.4	Метанолиз образцов.....	47
2.5	Гель – хроматография белков.....	48
3	Результаты и обсуждения.....	51
	Заключение.....	59
	Список использованных источников.....	61

Введение

Синтетические полимеры получили широкое распространение с середины 1940-х годов и уже в скором времени заменили такие материалы, как стекло, дерево и даже металл, стали играть существенную роль в промышленности, экономике и оказывать влияние на состояние окружающей среды [1].

Столь широкое распространение пластмасс связано с их физико-химическими свойствами, а именно с их стабильностью и прочностью. Обратная сторона - глобальная экологическая проблема, загрязнение окружающей среды синтетическими пластмассами (полипропиленами и полиэтиленами), получаемыми в результате нефтеорганического синтеза. Не переработанные отходы складываются на мусорных свалках, тем самым занимая все больше плодородных земель, накопление основной части происходит в океанах и составляет приблизительно 300 млн. т. в год [51, 30]. Из-за устойчивости пластмасс в окружающей среде увеличилось количество твердых отходов. Также большую опасность представляет их сжигание, так как выделяются вредные вещества (как это происходит при сжигании поливинилхлорида, в результате чего выделяется ядовитое соединение - диоксин) [2].

Создание экологически чистых материалов, освоение материалов, включающихся в биосферные циклы круговорота (способных к разрушению до безвредных для природы продуктов), с полезными свойствами - это одна из ключевых проблем современности [43].

Развитие науки и техники приводит к всё более широкому внедрению в практику различных целевых продуктов, синтезируемых живыми системами. В последние годы всё более актуальными становятся работы по биополимерам (полимерам биологического происхождения). Главной целью данного направления является поиск и изучения новых биополимеров и получение фундаментальной основы для конструирования биологических систем, синтезирующих полимеры с заданными свойствами. Создание и изучение новых

биосовместимых полимерных материалов, необходимых для современных реконструктивных медико - биологических технологий на сегодняшний день является актуальной проблемой биотехнологии.

Наиболее интенсивно изучаемыми среди биоразрушаемых пластиков являются алифатические полиэфиры, особенно бактериально синтезированные, так называемые полигидроксиалканоаты (ПГА) [3].

Производство ПГА в будущем сыграет огромную роль в развитии различных сфер, к примеру, в медицине возможно создание транспортной системы доставки лекарств, производств по изготовлению искусственных органов, хирургических инструментов и многое другое, в сельском хозяйстве в качестве депонированной формы удобрений, пестицидов, гербицидов, в виде гранулированных, прессованных и пленочных форм. Также, его использование в промышленных предприятиях позволит создавать биodeградируемый упаковочный материал, одноразовую посуду и прочие полимерные изделия, не создающие угрозу экологии и разрушающиеся в природных условиях[53].

При получении биоразлагаемых полимеров важным технологическим этапом является выделение целевого продукта из бактериальной биомассы и его очистка. Поэтому необходимы исследования, направленные на совершенствование существующих методов экстракции.

1 Обзор литературы

1.1 Биоразрушаемые полимеры, как замена традиционным пластмассам

Производство пластических масс на современном этапе развития возрастает в среднем на 5 - 6 %, в 2016 году отметка превысила 245 млн. тонн. Их потребление на душу населения в индустриально развитых странах за последние 20 лет удвоилось, достигнув 85 - 90 кг. К концу десятилетия, как полагают, эта цифра повысится на 45-50 кг.

Насчитывается около 150 видов полимерных материалов, 30 % из них – это смеси различных мономеров. Для достижения определенных свойств и лучшей переработки в полимеры вводят различные химические добавки, ряд из них относится к токсичным материалам [4]. Такая высокая популярность пластмасс объясняется их легкостью, экономичностью и набором ценнейших потребительских свойств. Пластмассы являются серьезными конкурентами металлу, стеклу, керамике. Но наряду с этим возникает проблема с утилизацией отходов, которых существует свыше 400 различных видов, появляющихся в результате использования продукции полимерной промышленности.

Учитывая специфические свойства полимерных материалов (скорость их разложения чрезвычайно низка), проблема их утилизации носит, прежде всего, экологический характер. Однако в настоящее время проблема переработки отходов полимерных материалов обретает актуальное значение не только с позиций охраны окружающей среды, но и связана с тем, что в условиях дефицита полимерного сырья пластмассовые отходы становятся мощным сырьевым и энергетическим ресурсом [5]. Использование отходов полимеров позволяет существенно экономить первичное сырье (прежде всего нефть) и электроэнергию [6].

Вместе с тем, решение вопросов, связанных с охраной окружающей среды, требует значительных капитальных вложений. Стоимость переработ-

ки и уничтожения отходов пластмасс примерно в 8 раз превышает расходы на утилизацию большинства промышленных и бытовых отходов. Это связано со специфическими особенностями пластмасс, значительно затрудняющими или делающими непригодными известные методы уничтожения твердых отходов. Проблем, связанных с утилизацией полимерных отходов, достаточно много. Они имеют свою специфику, но их нельзя считать неразрешимыми.

На современном этапе развития общества возник новый подход к разработке полимерных материалов, диаметрально противоположный традиционному. Он имеет целью получение полимеров, которые сохраняют эксплуатационные характеристики только в течение периода потребления, а затем претерпевают физико-химические и биологические превращения под действием факторов окружающей среды и легко включаются в процессы метаболизма природных биосистем. Способность полимеров разлагаться и усваиваться микроорганизмами зависит от ряда их структурных характеристик. Наиболее важными являются химическая природа полимера, молекулярная масса, разветвленность макроцепи (наличие и природа боковых групп), надмолекулярная структура [7].

Природные и синтетические полимеры, содержащие связи, которые легко подвергаются гидролизу, обладают высокой способностью к биодеструкции. Присутствие заместителей в полимерной цепи часто способствует повышению биодеструктируемости, она зависит от степени замещения цепи, длины её участков между функциональными группами, и гибкости макромолекул. Важным фактором, который определяет стойкость полимера к биоразложению, является величина его молекул.

В то время как мономеры или олигомеры могут быть поражены микроорганизмами и служат для них источником углерода, полимеры с большой молекулярной массой являются устойчивыми к усвоению микроорганизмами. Биодеструкцию большинства технических полимеров, как правило, инициируют процессами небиологического характера (термическое и фотоокис-

ление, термолиз, механическая деградация и т.п.). Упомянутые деградационные процессы приводят к снижению молекулярной массы полимера. При этом возникают низкомолекулярные биологически ассимилируемые фрагменты, имеющие на концах цепи гидроксильные, карбонильные или карбоксильные группы.

Создание биоразрушаемых пластмасс основано на введении в цепь полимера биоактивирующих добавок, которые должны содержать функциональные группы, способных разлагаться под действием бактерий. Трудность заключается в том, что добавки вводят в полимер на стадии синтеза или переработки, а разрушение должно протекать после использования, но не во время переработки. Поэтому проблема заключается в создании активаторов разрушения, обеспечивающих определенный срок службы пластмассовых изделий без ухудшения качества. Активаторы должны быть нетоксичными и не повышать стоимость материала [8].

К биоразрушаемым полимерам относят:

Химически синтезированные полимеры - в эту категорию входят такие соединения, как полигликолевая кислота, полилактид, поли(ϵ -капролактон), поливиниловый спирт, поли(этилен-оксид). Данный вид соединений подвергается энзиматической либо микробиологической атаке. Так, например, полилактид – продукт конденсации молочной кислоты, в компосте биологически разлагается в течение одного месяца, также может усваиваться микроорганизмами, обитающими в морской воде. Тем ни менее, данный вид соединений не может составить сильную коммерческую конкуренцию традиционным пластикам [9].

Биоразрушаемые пластики, содержащие различные добавки - полимеры, в чей состав входят молекулы крахмала, целлюлозы, хитозана или протеинов. Наиболее широко, из ряда природных соединений в биоразлагаемых упаковочных материалах, используется крахмал. Биоразлагаемые пластические массы на основе крахмала обладают высокой экологичностью и

способностью разлагаться в компосте при 30°C в течение двух месяцев с образованием благоприятных для растений продуктов распада [8].

Полигидроксиалканоаты - полностью биоразрушаемые полимеры микробиологического происхождения, получаемые в одну стадию на различных углеродных субстратах. Это полиэфиры различных гидроксипроизводных жирных кислот, которые синтезируются большим количеством микроорганизмов как запасной источник энергии, в условиях, когда необходимые элементы питания, как азот или фосфор, лимитированы. Они обладают свойствами сходные с различными термопластиками, такими как полипропилен. Данный вид полимеров разрушается до конечных продуктов (воды и углекислого газа) в аэробных условиях и до метана в анаэробных условиях, микроорганизмами, обитающими в почве, море, озерах и сточных водах [9].

Таким образом, способность полимерных материалов к биодеструкции обусловлено главным образом их химическим составом, структурой и свойствами макромолекул.

Исследования в области создания биоразрушаемых полимеров важны для решения глобальных экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды отходами полимерных материалов.

Открытие и изучение полигидроксиалканоатов (ПГА) – полиэфиров микробиологического происхождения – являлось значимым событием для биотехнологии новых материалов[8].

Сферы применения данных полимеров потенциально широки и включают в себя восстановительную хирургию, клеточную и тканевую инженерию, трансплантологию, фармакологию, а также легкую и пищевую промышленность, коммунальное и сельское хозяйство и др.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – класс природных макромолекул (полимеров гидроксипроизводных жирных кислот), которые синтезируют прокариотические организмы в специфических условиях несбалансированного роста в качестве эндогенного депо энергии и углерода,

обладают многими свойствами, привлекательными для различных сфер, включая биомедицину. Привлекательность и перспективность ПГА обусловлена наличием весьма существенных преимуществ этого класса биоматериалов:

-высокая биосовместимость ПГА, в частности, поли-3-гидроксибутирата, связана с тем, что мономер, образующий этот полимер – 3-гидроксимасляная кислота – это естественный метаболит клеток и тканей организмов;

-ПГА не гидролизуются в жидких средах, т.к. деградация ПГА является истинно биологической и происходит клеточным и гуморальными путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого закисления тканей и, следовательно, выраженной воспалительной реакции;

-скорости биорезорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полигликолипидов, изделия из ПГА в зависимости от формы и места имплантации *in vivo* могут функционировать от нескольких месяцев до 2-3 лет более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;

-ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, получение различных мономеров зависит от подаваемого субстрата);

-сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водосодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина [1] .

ПГА являются внутриклеточным включением, процесс получения заключается в культивировании бактерий при избыточном содержании углеводных субстратов и лимитирования азотсодержащих.

Развитие технологий ПГА на сегодняшний день уже не ограничивается производством только медицинских материалов, они участвуют в качестве

заменителя пластика, косметики, материала для игрушек и наполнителей для водоочистных сооружений, на сегодняшний день ведется поиск дешевых субстратов, высокопроизводительных штаммов - продуцентов, а также способов удешевления технологий получения классов биополимеров [1].

В качестве дешёвых источников углерода используются: остаточные масла, пищевые отходы, жирные кислоты, масла для жарки, сыворотка, растительные масла (пальмовое, кокосовое, и т.д.), рапсовое масло, кленовый сахар, агропромышленные остатки. Также используются такие дешёвые субстраты как гидролизат крахмала и сыворотки [3].

Различные сельскохозяйственные культуры могут генерировать множество агропромышленных отходов из сахарного тростника, пшеницы и отрубей риса, растительного масла, очисток картофеля и различных фруктов, таких как апельсин, банан, и т.д. Среди них, сахарный тростник является одним из основных культур тропических стран. Жом сахарного тростника является основным побочным продуктом производства сахара. На каждые 10 тонн сахарного тростника, сахарный завод получает 3 тонны жома, он может быть использован в качестве источника углерода для производства ПГА [14].

1.2 Фазы выделения ПГА

ПГА являются внутриклеточным включением, процесс получения заключается в культивировании бактерий при избыточном содержании углеводных субстратов и лимитирования азотсодержащих.

Процесс выделения можно подразделить на три этапа:

1. на первом происходит транспорт источника углерода, необходимого для синтеза полимеров, из внешней среды в клетку, который катализируется специфическими ферментами транспортных систем, локализованными в цитоплазматической мембране или расположенными диффузно внутри клетки.

2. вторая фаза, включающая комплекс анаболических и катаболических реакций, конвертирует компоненты в гидроксиацил-СоА, тиоэфир которого является субстратом для ПГА – синтазы [11].

3. на третьем этапе, ПГА - синтаза (ключевой фермент биосинтеза данных полимеров), использует тиоэфиры как субстраты и катализирует образование эфирных связей между ними при высвобождении СоА.

Вторая фаза – очень существенна для процесса в целом, т.к. во время нее источник углерода конвертируется в субстраты, необходимые для синтеза ПГА [11].

Углерод, ассимилированный клетками тем или иным путем, превращается в пируват, который декарбоксилируется с образованием ацетил-СоА. Последний включается в реакции цикла трикарбоновых кислот, и при нарушениях в системах амфиболизма, вызванных дефицитом структурных элементов для синтеза белка, не становится предшественником аминокислот, а подвергается конденсации, далее восстанавливается с участием НАДН в реакции гидрирования в гидроксимасляную кислоту, которая подвергается полимеризации с образованием полигидроксипутирата [10].

Выделение происходит путём разрушения клеток, экстракции и осаждение ПГА органическими растворителями.

1.3 Характеристика ПГА

В последние 10-15 лет, производство биополимера стало одним из важнейших междисциплинарных научных направлений. Среди биоразлагаемых полимеров, которые уже разработаны или находятся в стадии разработки, различают алифатические полиэферы, полиамиды, сегментированные полиуретаны, полимеры молочной и гликолевой кислот (полилактиды и полигликолактиды), силикон, полиэтилентерефталаты, и, с недавних пор, полимеры из гидроксиалкановых жирных кислот (ПГА) [42].

В зависимости от длины углеродной цепи различают следующие виды ПГА:

- короткоцепочечные (shortchainlength, HA_{SCL}) – имеют в своем составе 3-5 атомов углерода;
- среднецепочечные (mediumchainlength, HA_{MCL}) – содержат от 6 до 14 углеродных атомов;
- длинноцепочечные (longchainlength, HA_{LCL}) – цепи состоят из 17-18 атомов углерода [32].

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

- способность образовывать высокопрочные высокоориентированные волокна и пленки;
- способность к большим длительно развивающимся деформациям;
- способность к набуханию и растворению.

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

1.4 Особенности процессов выделения ПГА

Существенную роль в общей стоимости производства играет способ выделения ПГА из клеточной биомассы. При его выборе необходимо учиты-

вать затраты на реагенты и эффективность извлечения. Экономические оценки показали, что затраты на выделение ПГА значительно уменьшаются с увеличением содержания полимера в клетке. Согласно этим расчетам, при 88%-ном содержании полимера стоимость выделения составит 0,92 \$, а при 50%-ном – 4,8 \$ США за 1 кг. Это удорожание обусловлено в основном использованием большего количества вещества для выделения полимера и увеличением затрат на вывозы отходов. Разработка более экономичных способов экстракции является важной задачей на пути создания эффективного производства ПГА.

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

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

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

Наибольшие трудности при выделении ПГА связаны с его ограниченной растворимостью в органических растворителях, в настоящее время для растворения ПГА используют хлороформ, дихлорметан, дихлорэтан и другие галогенпроизводные (патенты РФ № 2333962, US4358583, US4391766), а также имеются данные по использованию высококипящих растворителей этиллактата (патент ФРГ № 19712702), уксусного ангидрида (патент ГДР № 229428).

Недостатком применения высококипящих растворителей прежде всего являются высокие температуры, а следовательно, повышенные затраты на

экстракцию и их регенерацию, а также весьма вероятен гидролиз части ПГА под действием высоких температур, что снижает эффективность производства. Стоимость выделения ПГА с помощью экстракции растворителем может быть от 50% и выше общей себестоимости продукции. Такая высокая стоимость может быть значительно снижена с помощью разработанных способов выделения ПГА из клеток с высоким содержанием полимера недорогими химикатами.

1.4.1 Способ расщепление микробной оболочки с помощью щелочи и гипохлорита натрия

Биомассу бактерий можно предварительно обрабатывать щелочным раствором или раствором гипохлорита натрия, который солубилизирует молекулы, не содержащие полигидроксиалканоатов, оставляя сами молекулы ПГА неповрежденными. Затем, ПГА могут быть отделены от раствора центрифугированием.

Но в процессе обработки гипохлоритом натрия наблюдается серьезная деградация полимера, которая заключается в 50% снижении молекулярного веса. Эта технология довольно проста, однако, учитывая заметное снижение молекулярной массы ПГА вследствие использования гипохлорита натрия, который является сильным окислителем и содержит заметное количество хлора, и остается в выделенных гранулах ПГА, эта технология была модифицирована многими исследователями. Один из вариантов модификаций включает в себя использование дисперсионного раствора, изготовленного из гипохлорита натрия и хлороформа [45].

Однако при обработке возможна деструкция эфирных связей и снижение молекулярной массы полимера. Способ переваривания клетки щелочью (NaOH) используется для выделения ПГА, но есть вероятность того, что передержав клетки ПГА в щелочи, произойдет разрушение полимера. В неко-

торых случаях хлопья ПГА, выделенные из переваренных клеток, были дополнительно обработаны озоном или перекисью для удаления загрязняющих веществ.

1.4.2 Комбинированный способ выделения ПГА

Также, существует комбинированный способ выделения ПЗГБ с предварительным ферментативным расщеплением безполимерных структур: клетки (от 100 до 1000 мг сухой биомассы на 10 мл ферментов), имеющие различный полимерный состав, обрабатывали при температуре 30°C в течение 1 ч с различными химическими веществами. Клеточный раствор промывали дистиллированной водой и центрифугировали.

Далее, водой промывали клетки и добавляли к ним различные химические растворы. После смешивания клеток с растворами для расщепления безполимерных клеток, гранулы ПЗГБ отделяли от водной фракции центрифугированием при 2500 G в течение 20 мин. Выделенные гранулы ПЗГБ осторожно промыли дистиллированной водой (во избежание флотации полимерных гранул), снова провели центрифугирование и высушили на открытом воздухе.

В ферментативном расщеплении принимали участие следующие химические вещества: кислоты (HCl и H₂SO₄), щелочи (NaOH, кон и NH₄OH), поверхностно - активные вещества (диоктилсульфосукцинат натрия, гексадецилтриметиламмоний бромид, додецилсульфат натрия, полиоксиэтилен-трет-октил фенол, и полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат).

1.4.3 Использование ферментов, детергентов для очистки и выделения ПГА

Был открыт способ использования ферментов, свободных от химических добавок для выделения и очистки ПГА, ферментированного на грамотрицательных бактериях *Ralstonia eutropha* DSM 545. Изучены ферменты протеаз, такие как трипсин, химотрипсин, папаин и бромелайнβ-глюкоцидаза, целлюлаза и лизоцим.

В экспериментах, в которых последовал выбор ферментов, направленных на нахождение оптимальной температуры, pH и концентрации фермента, была достигнута высокая эффективность в солюбилизации безполимерной биомассы и, следовательно, в выделении и очистке ПГА. В результате экспериментов установлено, что протеазы оказались наиболее подходящими ферментами для солюбилизации и очистки ПГБ полимерных бактерий *R. Eutropha* (выход полимера при использовании трипсина составил 89 %). Высокая эффективность и низкая стоимость использования трипсина делают его перспективным ферментом для крупномасштабных производств.

Один из подходов получения полимера (который называют «безреагентным») заключается не в его экстракции из биомассы клеток, а в удалении загрязняющих компонентов (белков, углеводов).

Как известно, полимер ассоциируется в клетках в виде гранул, однако гранулы помимо полимера содержат белки ферменты, катализирующие реакции синтеза и биораспада полимерных цепей в клетке. Использование анионных детергентов, таких как додецилсульфат натрия, может привести к разложению любых нерастворимых веществ, таких как белки и липиды, а также к солюбилизации компонентов посредством включения в мицеллы[8].

Дальнейшее поступление ПАВ разрывает мембрану для того чтобы мицеллы проникли в фосфолипидный слой, что приведет к отделению клеточного мусора от ПГА. Еще одна функция ПАВ заключается в солюбилизации. ПАВ солюбилизует не только белки, но и другие, не содержащие ПГА структуры. Преимущество этого метода исходит из того, что поверхностно-

активные вещества проводят лизис клеток без ухудшения качества полимерных гранул.

Метод обработки биомассы детергентами отличается тем, что детергенты разрушают различные компоненты клетки, оставляют молекулы ПГА нетронутыми, что является главной целью процесса экстракции [37]. Например, после обработки биомассы *Ralstoni aeutropha* растворами додецилсульфата натрия различной концентрации и нагревания суспензии до 120°C удалось выделить гранулы полимера, содержащие только 3-4% примесей [48].

Также, проведено исследование, в котором получены образцы полимера с низким остаточным содержанием липидов (0,4 – 0,6 %). Однако в полимере помимо липидов и жирных кислот, зафиксировано наличие белковых веществ в концентрации до 6 %.

С целью повышения полноты извлечения полимера и снижения количества примесей в нем исследован комбинированный метод, при котором биомассу предварительно обрабатывали раствором 5% центрифугировали и отмывали водой. Далее проводили очистку дихлорметаном с последующим осаждением ПЗГБ гексаном. Для этого полимер, полученный на первой стадии, трёхкратно экстрагировали равными порциями дихлорметана в соотношении 1:10 при нагревании.

В полученных образцах примеси отсутствовали. Степень извлечения ПЗГБ составила 98 – 99 %. Молекулярная масса составила от $6,2 \cdot 10^5$ - $6,8 \cdot 10^5$ г/моль, коэффициент полидисперсности для образцов лежал в пределах 2,9 – 3,2. Найдены оптимальные параметры процесса: концентрация ДДС-На 5 %; температура 60°C, время обработки 40 мин [36]. Ещё одно исследование заключалось в оценке содержания остаточных белков после экстракции методом электронной микрофотографии.

После добавления додецилсульфата и перемешивания, содержание остаточного белка в выделенной пробе составляло около 80% от первоначального уровня и оно было снижено до 5% после термической обработки. Ника-

ких остаточных белков не было обнаружено после окончательного шага промывки дистиллированной водой. На рисунке 8 показаны гранулы ПЗГБ, полученные путем просвечивающей электронной микрофотографии до (а) и после (б) обработки.

Метод также имеет свои недостатки: низкая чистота извлекаемого полимера и высокая стоимость детергентов. Кроме того, метод требует большого количества детергентов на грамм ПГА для извлечения полимера и большого количества воды, чтобы произвести промывку биомассы [16].

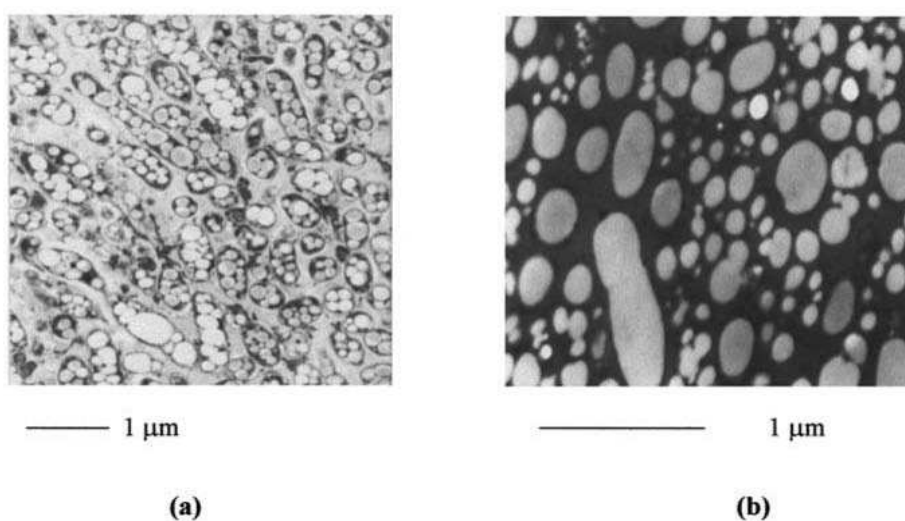


Рисунок 1 - Электронная микрофотография образца ПЗГБ до обработки (а) и после (б) после обработки [20].

Однако, есть и преимущества использования мыльных растворов: метод может быть применен для сырой биомассы непосредственно после культивирования, что исключает необходимость сушки полимера до экстракции [32]. Еще одно несомненное преимущество метода – отпадает необходимость в использовании токсичных растворителей [20].

1.4.4 Экстракция ПГА с помощью органических и неорганических растворителей

Экономические соображения процесса культивирования клеток часто ограничиваются долей содержания ПГБ в микроорганизмах, что требует использования большого количества растворителей для экстракции, из которых получается полимерный раствор, значительно упрощающий процесс разделения безполимерных композиций от самого раствора полимера.

Следовательно, если стоит цель получить полимерный продукт, свободный от таких растворенных примесей, необходимо провести предварительную стадию экстракции растворителем, в котором полимер не растворяется, чтобы удалить растворимые примеси перед экстракцией полимера или, другими словами, полимер должен быть селективно отделен от раствора, например, путем осаждения. Если концентрация раствора составит 5%, также, если 95% растворителя регенерируется для повторного использования, на извлечение 1 кг полимера уходит 1 кг растворителя. При более низких концентрациях или менее эффективной регенерации растворителей, для выделения полимера их потребуется еще больше [13].

Большинство процессов, разработанных для выделения ПГА из микробной биомассы, основаны на экстракции органическими растворителями, включая галогенированные углеводородные растворители, такие как хлороформ и дихлорметан [4,5]. Основным недостатком этих методов является наличие большого количества этих растворителей, что в свою очередь повышает стоимость производства и требует утилизации во избежание загрязнения окружающей среды [6].

Использование небольшого количества растворителей может привести к высокой вязкости полимерного раствора, если концентрация раствора составит $>5\%$ [48]. Недавно найден способ разрушения клеточной стенки сверхкритическим флюидом, флотацией растворенного воздуха и селективным растворением клеточной массы для выделения ПГА. Все эти методы являются перспективными альтернативами экстракции растворителем, но ни

один из них не обладает всеми необходимыми требованиями для эффективного и экономичного запуска масштабного производства.

Основными недостатками являются стоимость, надежность и масштабность [29].

1.5 Сложности экстракции сырой биомассы

Прямая экстракция сырой биомассы хлорорганическими растворителями сопряжена с рядом трудностей: вода, содержащаяся в клетках, препятствует проникновению растворителя и образует эмульсии, а липиды, переходящие вместе с полимером в экстракт, снижают ассоциативные свойства растворителя [42].

Вода, является основным количественным компонентом любого биологического объекта, так заключённая в клетках, она не только среда для протекания ферментативных реакций, но и структурный элемент мембран и биополимеров, выступает в роли мембрано - образующего фактора. По современным представлениям, возникновение мембранных структур – биомолекулярного липидного слоя со строго ориентированными молекулами фосфолипидов – возможно только в водной среде благодаря гидрофобным взаимодействиям [50].

Содержание воды в мембранах может достигать 50 %, при этом до 30 % находится в прочносвязанной форме. Мембрану представляют как вязкую гетерогенную двумерную жидкость, характеризующуюся высокой динамичностью. Процесс обезвоживания микроорганизмов всегда связан с определёнными изменениями, на популяционном уровне наблюдается уменьшение числа жизнеспособных клеток; на клеточном уровне обнаруживаются изменения на поверхности клетки, в ядре и мембранных структурах [52].

1.6 Необходимость оптимизации процесса сушки биомассы

В стоимости производства полигидроксиалканоатов (ПГА) существенная доля затрат приходится на способ выделения из клеточной биомассы. Полнота выделения, в свою очередь, зависит от режима обработки биомассы и способа экстракции. Большинство процессов выделения этих полимеров из клеток базируется на экстракции органическими галогенсодержащими растворителями (хлороформ, дихлорметан, дихлорэтан), использование которых позволяет получать не только полимер, но и имеет перспективу получения дополнительных продуктов в виде липидов и жирных кислот [49].

Во время сушки, в результате действия протеолитических ферментов происходит денатурация белков. При нагревании скорость ферментативных реакции увеличивается, повышение температуры на 10°C приводит к её двукратному увеличению; и, наоборот, при охлаждении скорость ферментативных процессов, снижается [50].

Нагревание выше определённой температуры приводит к полной инактивации ферментов. Обычно ферменты инактивируются за 5 мин при температуре 75°C. Существуют значительные отклонения, так некоторые ферменты инактивируются при температуре 40°C, в то время как другие не разрушаются и при 100°C. Кроме температуры на инактивацию ферментов оказывает влияние продолжительность воздействия [50]. Механизм устойчивости к высушиванию полагается на двойной фосфолипидный слой в мембранах, стабилизирующийся в течение водного стресса сахаром и ненасыщенными жирными кислотами [54]. Липиды – эффективные источники сохранения энергии, играющие важную роль структурных элементов клеточных мембран.

Около 1 % липидов образует сложные соединения с белком – липопротеины, являющиеся основными структурными элементами клетки [12]. Во время высушивания бактериальной биомассы липиды в присутствии кислорода подвергаются окислению [13].

В биотехнологии имеют дело с живыми микроорганизмами, а в ряде случаев для продукта требуется сохранение питательной ценности, биологической активности, жизнеспособности, следовательно, сушильные технологии, применяемые в производстве, должны соответствовать ряду технико-экономических параметров, таких как минимальная энергоёмкость, максимальная однородность сушки, минимальное время, минимальное влияние на конечный продукт. Данные параметры обеспечиваются пониманием базовых физических процессов, приводящих к обезвоживанию продуктов, соответствующих им технологий высушивания за счет оборудования, на котором указанные процессы и технологии могут быть реализованы.

Ранее проведённые исследования показали, что использование водных растворов детергентов позволяют проводить обработку сырой биомассы, однако данный метод не даёт возможность получить продукт высокой чистоты, поэтому на второй стадии приходилось проводить очистку продукта с помощью органических растворителей (дихлорметана и гексана) [16]. Данный метод связан с вовлечением в процесс больших количеств воды, а так же образованием большого объёма сточных вод загрязнённых детергентом и клеточными структурами, а так же не позволяет отказаться от органических растворителей, которые необходимо регенерировать [17].

В свою очередь биомасса кроме ПГА является источником липидов и жирных кислот, которые могут быть выделены на стадии экстракции органическими растворителями [18].

Содержащаяся вода в биомассе является препятствием для проникновения растворителя в клетку и приводит к снижению эффективности процесса экстракции. Так как вода - основной количественный компонент любого биологического объекта, она не только среда для протекания ферментативных реакций, но и структурный элемент.

Таким образом, при использовании органических растворителей, смешивающихся с водой для выделения полимера (готового продукта), вопросы высушивания биомассы в производстве стоят очень остро.

В целом, анализ литературы показывает необходимость оптимизации методов сушки бактериальной биомассы как необходимое условие повышения эффективности процесса экстракции органическими растворителями и снижения экономической стоимости полимера как конечного продукта биотехнологического процесса.

1.7 Сушка в микробиологическом процессе

Удаление влаги из полупродуктов микробного синтеза является одной из конечных операций в производстве. Сушка представляет собой весьма энергоемкий, сложный, взаимообусловленный комплекс химических, тепловых и диффузионных процессов. В промышленной микробиологии имеют дело с живыми микроорганизмами, а в ряде случаев для товарного продукта требуется сохранение не только качества, но и жизнеспособности препаратов. Главным при этом является форма связи влаги с материалом, которая для продуктов микробиологического синтеза мало исследована. Продукты микробиологического синтеза применительно к процессу сушки могут быть классифицированы на два больших класса:

- продукты, которые при обезвоживании требуют сохранения жизнедеятельности микроорганизмов или высокой активности препаратов (антибиотики, средства защиты растений, ферменты);
- продукты, которые после высушивания требуют сохранения высокой питательной ценности (кормовые дрожжи, пищевой белок и т.д) [19].

Продукты микробиологического синтеза (с позиции реализации процесса сушки) разделены на две категории:

- вегетативные бактериальные культуры (бактерии, дрожжи, грибы, вирусы и т.п.);

- споро - образующие микроорганизмы (споры бактерий, белки, ферменты, аминокислоты, антибиотики и т.п.).

Для первой категории характерна высокая скорость гибели микроорганизмов в результате тепловой инактивации в сравнительно узком температурном диапазоне (40-60) °С независимо от вида культуры.

Материалы, отнесенные ко второй категории, обладают значительно более высокой термоустойчивостью и меньшей скоростью инактивации. Как установлено, для вегетативных бактериальных клеток, ферментов, вирусов и т.п. основным лимитирующим механизмом термоинактивации является термоденатурация клеточного белка, во втором случае можно предположить нарушение целостности структуры споры или макромолекулы вещества. Аналогично влиянию температуры проявляется и воздействие остаточного влагосодержания на жизнеспособность (сохранность) качественных показателей объектов сушки различной природы. Для материалов первой категории критическое влагосодержание составляет 50-70 %, причем большей устойчивостью обладают дрожжевые культуры и культуры бактерий, выращенные на твердых субстратах [19].

Высокой устойчивостью отличаются антибиотики и аминокислоты. Материалы, отнесенные ко второй категории, при низком остаточном влагосодержании сохраняют технологические показатели длительное время, тогда как вегетативные бактериальные формы склонны к снижению жизнеспособности во времени в зависимости от влагосодержания. Ко второй категории можно отнести также белковые и ферментные препараты, обладающие наряду с высокой термочувствительностью и достаточной устойчивостью, - конечная влажность порядка 5-6 % практически не снижает их ферментативной активности [20].

Строгое обоснование выбора метода и режима сушки с учетом получения желаемого качества конечного продукта может быть произведено лишь при тщательном анализе таких теплотехнических параметров процесса сушки, как длительность и скорость нагрева и охлаждения, скорость удаления влаги, реологические и гигроскопические свойства материала.

При рекомендации любого метода сушки необходимо задать температурный режим процесса. С позиций интенсификации тепломассопереноса, естественно, следует ориентироваться на максимальный тепловой потенциал, определяемый, в свою очередь, предельно допустимой для термоустойчивости материала температурой греющей среды. Производительность сушилки по высушенному материалу и количество влаги, удаляемое при сушке определяют из уравнений материального баланса.

1.8 Сушилки, применяемые в микробиологической промышленности

Четкой характеристики для классификации сушильных установок продуктов микробиологической промышленности не существует. Сушилки, применяемые в микробиологической промышленности, можно характеризовать по способу подачи продукта и теплоносителя в сушильные камеры, а также по гидродинамическим условиям их работы [21].

Наибольшее применение при обезвоживании продуктов биосинтеза нашли конвективные сушилки (вальцовые, ленточные, барабанные, распылительные, в кипящем слое и т.п.), реже используются контактивные сушилки.

1.8.1 Вальцовые сушилки

Вальцовые сушилки (рис. 1.) наиболее часто используются для сушки кормовых дрожжей с содержанием сухих веществ до 20-25 %. Процесс суш-

ки проводится при строгом контроле температурного режима во избежание денатурации белков. На вальцовых сушилках предел температуры теплоносителя составляет 70-80°C.

В барабан, который закрыт с торцов крышками, подается пар. У торцов барабанов сверху устанавливаются клинья, образующие между барабанами ванну, в которую непрерывно поступает концентрат биомассы. При вращении барабана клеточная биомасса смачивает их поверхность тонким слоем, который высушивается до влажности 8-10 % [21].

Сухая биомасса снимается с поверхности барабана ножами и осыпается в продольные шнеки, откуда подается на фасовку. Сушку кормовых концентратов, содержащих аминокислоты, такие, как лизин, гистидин, аргинин, триптофан, до влажности 8-10 % осуществляют на ленточных, распылительных и в кипящем слое сушилках. Схема ленточной сушилки представлена на рис. 1.а, б.

Пастообразная биомасса предварительно смешивается с наполнителем, а затем формуется в виде брикетов, которые подаются на транспортер ленточной сушилки. После сушки материал размалывается на молотковой дробилке. Применение ленточных сушилок целесообразно и том случае, когда влажный материал заранее отформован и сушка в таком виде является единственно приемлемой [21].

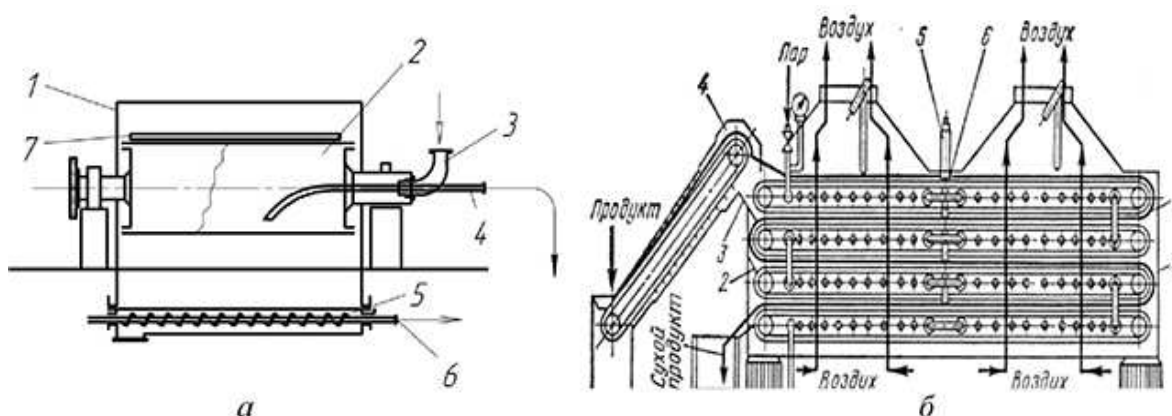


Рисунок 2 - Схемы сушилок: вальцовая (а) и ленточная (б);
 а: 1- кожух; 2 - барабан; 3 - штуцер подачи пара; 4 - штуцер вывода конденсата; 5 - шнек;
 б: 1 - конденсационный горшок; 2 - скребок для очистки ленты; 3 - щит; 4 - шибер для разравнивания продукта; 5 - термopара; 6 – психрометр; 7-лента; 8-калорифер (рис.Н.А.Войнова).

1.8.2 Распылительные сушилки

Способ сушки распылением обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами сушки. Процесс сушки протекает чрезвычайно быстро (15-30 с), частицы в зоне повышенной температуры имеют насыщенную поверхность, температура которой близка к температуре адиабатного испарения чистой жидкости. Благодаря мгновенной сушке и невысокой температуре распыленных частиц материала высушенный продукт получается хорошего качества. Например, не происходит денатурации белков, окисления, потерь витаминов и т.д. Этот метод часто применяется для сушки пищевых продуктов, органических солей и красителей, биологических и фармацевтических препаратов и других термочувствительных материалов [21].

При применении сушки распылением часто может быть значительно сокращен и полностью механизирован технологический цикл получения сухого продукта. В этом случае могут быть исключены такие процессы, как фильтрация, центрифугирование, размол. В распылительных сушилках можно достигнуть высокой производительности по высушиваемому материалу, при этом не требуется большого количества обслуживающего персонала. Высушиваемый материал в процессе сушки не соприкасается с поверхностями сушилки до тех пор, пока он не высохнет. Это упрощает разрешение проблемы коррозии и выбора материала для сушильной камеры. При других способах сушки влажный продукт соприкасается с металлическими поверхностями. В распылительных сушилках можно осуществить сушку в широких температурных пределах (60-1200) °С. При сушке распылением легко осуществить получение высушенного продукта, состоящего из различных сухих компонентов в определенных соотношениях, например при добавлении необходимого количества других материалов до сушки в основной материал [21].

Метод сушки распылением имеет и недостатки: большие удельные габариты сушильной установки при сушке с начальной температурой воздуха (100-150) °С; сравнительно дорогое и сложное оборудование для распыления и выделения высушенного продукта из отработанных газов.

1.8.3 Распылительная сушилка с центробежным распылением

Наиболее производительными являются распылительные сушилки, применяемые для сушки кормовых дрожжей. На рис. 2. представлена схема распылительной сушилки с центробежным распылением. Дрожжевая суспензия непрерывно подается под небольшим давлением в распылительный механизм к вращающимся дискам. За счет центробежной силы, возникающей при вращении диска, раствор в виде пленки перемещается с непрерывно возрастающей скоростью к периферии диска и сбрасывается в виде струек, распадающихся на мельчайшие капли размером (6-70) мкм.

Сушильный агент (нагретый воздух или дымовые газы, разбавленные воздухом) подается в сушильную камеру по газопроводу. При помощи направляющего аппарата создается большая скорость движения теплоносителя на входе в сушильную камеру и одновременно сообщается спиралеобразное направление.

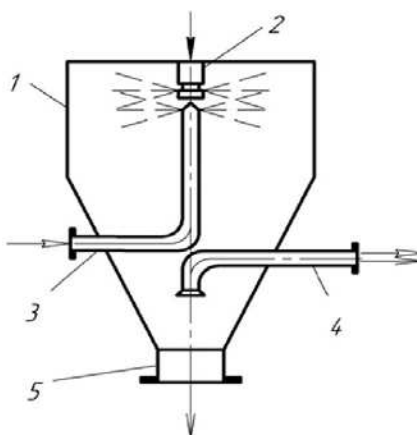


Рисунок 3 - Схема распылительной сушилки с центробежным распылением суспензии: 1 - корпус; 2 - распылительное устройство 3 - ввод теплоносителя; 4 - вывод теплоносителя; 5 - отвод готового продукта (рис. Н . А. Войнова).

1.8.4 Барабанные сушилки

Барабанные сушилки (рис. 3), работающие при атмосферном давлении применяют для сушки ферментных препаратов, органических кислот и других продуктов микробиологического синтеза. По сравнению с сушильными установками других типов, в сушилках барабанного типа потери ферментативной активности не превышают (10-15%).

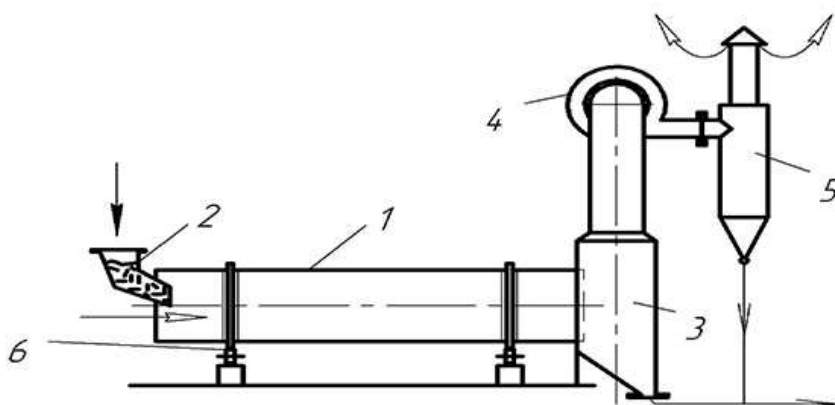


Рисунок 4 - Схема и фотография барабанной сушилки: 1 - барабан; 2 - бункер; 3 - разгрузочное устройство; 4 - вентилятор; 5 - циклон (рис. Н.А. Войнова).

Чаще всего сушка ведется подогретым воздухом при прямоточном или противоточном движении теплоносителя и продукта. Воздух, подаваемый в барабан, для сушки тщательно очищается. Обычно для этого применяют двухступенчатую фильтрацию, используются фильтры грубой и бактериальной очистки. Сушилка состоит из полого вращающегося цилиндрического корпуса 1, установленного на роликовых опорах 6 с углом наклона $(0,5-0,6)^\circ$ в сторону выгрузки продукта. Высушиваемый материал подается в бункер 2 и при помощи винтовой вставки поступает в полость корпуса, где проходит через ряд насадок, интенсивно перемешивается и контактирует с теплоносителем, что и обеспечивает процесс сушки [21].

Наиболее существенным противопоказанием применения метода псевдооживленного слоя является механическое нарушение целостности частиц (истирание, слипание). В трубчатых сушилках (рис. 4,б) используется прин-

цип пневмотранспорта твердых частиц (гранул) в трубе 3, при этом осуществляется удаление внешней влаги с поверхности высушиваемого продукта.

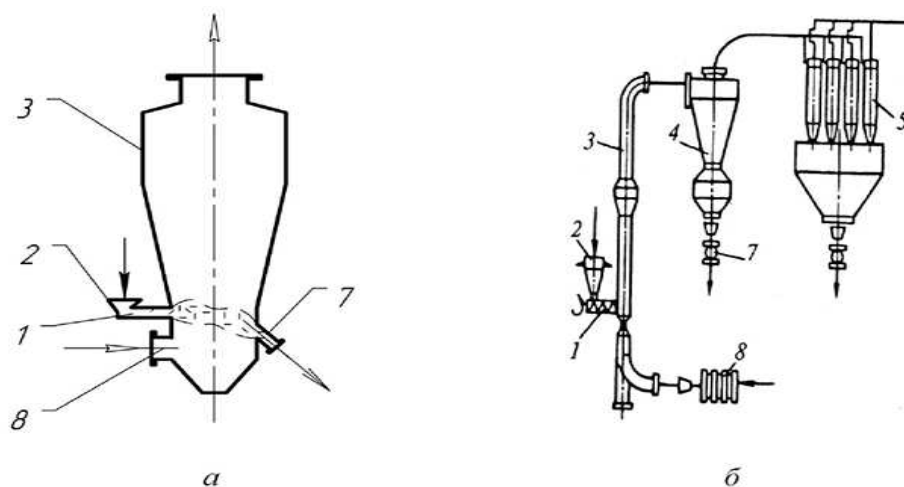


Рисунок 5 - Схемы сушилок: с псевдоожиженным слоем (а, б); пневмотранспортная трубчатая сушилка (в): 1 – питатель; 2 - бункер; 3 - корпус; 4 - циклон; 5 -фильтр; 7 - штуцер выхода продукта; 8 вход теплоносителя (рис. Н.А. Войнова)

1.8.5 Сублимационные сушилки

Сублимация (лиофилизация) - это переход твердого вещества при нагревании в газообразное состояние, минуя стадию жидкости. На выходе из сушилки отработанный теплоноситель поступает в циклон 5, а сухой продукт стекает в разгрузочное устройство 3. При диаметре корпуса сушилки 1,2 м и его длине 4,2 м производительность сушилки по культуре гриба достигает 1,5 тонн в сутки. Сублимационная сушка продуктов микробиологического синтеза представляет собой частный случай вакуумной дистилляции льда методом испарения из замороженного продукта. Проведение сублимационной сушки под вакуумом дает возможность значительно снизить температуру процесса и тем самым сохранить клеточные структуры в жизнеспособном состоянии.

Сублимационная сушка наиболее пригодна для живых микроорганизмов, некоторых видов ферментов и других термолабильных продуктов. В этом случае меньше всего инактивируются ферменты, хорошо сохраняется

жизнеспособность клеток. Преимущества рассматриваемой сушки: влага удаляется при низких температурах, что практически исключает термоинактивацию продукта; сохраняется стабильная структура материала (не происходит разрушения или конгломерации частиц); практически исключается удаление летучих компонентов высушиваемого материала, нарушение его химического состава; облегчается возможность получения сухого продукта в фасованном и стерильном виде.

Сублимационная сушка биологических продуктов состоит из стадий замораживания, сублимации, десорбции (досушивания). От скорости замораживания и конечной температуры продукта зависит процесс сублимации. Сублимационной сушке подвергают концентрат суспензии микроорганизмов, полученный из культуральной жидкости одним из механических способов обезвоживания (фильтрованием, центрифугированием).

В концентрированную суспензию микроорганизмов добавляют в определенном количестве так называемую защитную среду, которая предохраняет клетки от гибели при замораживании и последующем высушивании. В качестве защитных сред используют коллоидные и гидрофильные вещества (белки, аминокислоты, углеводы и др.), которые замедляют внутриклеточное образование льда, уменьшают концентрирование электролитов и защищают клетки от глубокого необратимого обезвоживания.

Замораживание биомассы приводит к физическим, биофизическим и биохимическим изменениям в клетке. В результате кристаллообразования при замораживании происходит повреждение и разрушение клеточных мембран и других структур клетки. Эти повреждения могут быть вызваны тремя основными причинами:

- механическим воздействием на клетки кристаллов льда;
- повышением концентрации электролитов, что вызывает денатурацию мембран;
- снижением разности концентраций веществ внутри и снаружи клетки.

Чтобы избежать денатурации белка в процессе замораживания подбирают оптимальные условия кристаллизации воды. Большое значение имеет скорость замораживания. При медленном замораживании образуются крупные кристаллы льда, имеющие меньшую поверхность испарения, чем мелкие кристаллы, образующиеся при быстром замораживании. Существует несколько способов замораживания биомассы:

- контактное замораживание на охлаждаемых полках;
- конвективное замораживание охлажденным газом;
- комбинированное замораживание.

Сублимационная сушильная установка (рис. 5.) состоит из сушильной камеры, конденсатора - десублиматора и вакуум-насосной системы.

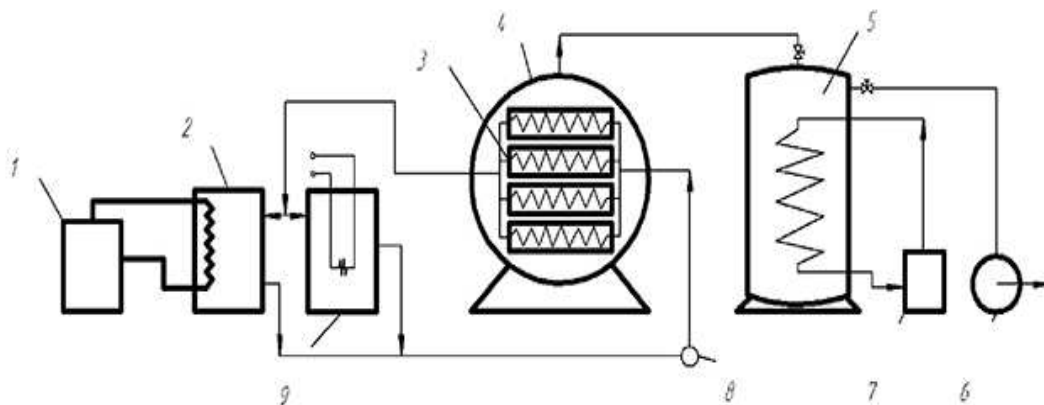


Рисунок 6 - Схема установки периодического действия: 1, 7 - холодильные установки; 2 - холодильник; 3 - полки; 4 - сублиматор; 5 - конденсатор; 6 - вакуум-насос; 8 -насос; 9 - емкость для нагрева теплоносителя (рис. Н.А. Войнова).

Проведение сублимационной сушки под вакуумом (остаточное давление 0,1-10 кПа) дает возможность значительно повысить температуру процесса и тем самым сохранить клеточные структуры в жизнеспособном состоянии. Сублимационная сушка - это сложный технологический процесс, который состоит из нескольких последовательных этапов: подготовки материала, замораживания, сушки сублимацией, упаковки высушенного продукта [21].

Сублимация - это переход твердого вещества при нагревании в газообразное состояние, минуя стадию жидкости. Сублимационная сушка продуктов микробиологического синтеза представляет собой частный случай вакуумной дистилляции льда методом испарения из замороженного продукта[21].

1.8.6 Термическая сушка

Термическая сушка – процесс, обеспечивающий значительное сокращение объема биомассы за счет выпаривания влаги. Осадок после термической сушки представляет собой сыпучий материал, влажностью 40%. Благодаря удалению из биомассы при сушке большей части влаги масс уменьшается в несколько раз.

Высушенные вещества, в отличие от исходных не обладают адгезией к металлам и другим материалам и не слипаются. Это значительно облегчает транспортировку и дальнейшую упаковку. Как правило, термической сушке подвергают биомассу после механического обезвоживания. Термическую сушку проводят в установках, состоящих из сушильного аппарата (сушилки, подогревателей, скрубберов, устройств бункеров)[21].

На каждом из этих этапов микроорганизмов могут потерять жизнеспособность, поэтому конечный результат зависит от строгости соблюдения технологии на всех этапах.

В лаборатории биотехнологии новых биоматериалов Сибирского Федерального Университета комплексные исследования закономерности микробного синтеза ПГА реализуются в течении ряда лет. Полученные результаты составляют научную и технологическую основу будущих исследований.

Опытно - промышленная технология реализуется в Сибирском Федеральном университете на тридцати и сто - пятидесяти литровых аппаратах – ферментерах. Исследуются связи между скоростью метаболических процессов, физиологической активностью и размерами особей в популяции, нахо-

дющейся в стадии аккумуляции, а также эндогенной деградацией полимера. Так как существенная доля затрат приходится на способ выделения полимера из клеточной биомассы, большую роль играет режим обработки биомассы и способ экстракции. Содержащаяся в биомассе влага является препятствием для проникновения растворителя и приводит к снижению эффективности процесса экстракции.

Таким образом, при использовании органических растворителей (не смешивающихся с водой), для выделения полимера, вопросы высушивания биомассы стоят очень остро [50].

1.9 Выделение жизнеспособных микроорганизмов

Технология получения биопрепаратов на основе жизнеспособных микроорганизмов более сложная, чем получение препаратов, содержащих биологически активные продукты жизнедеятельности микроорганизмов. Требуется сохранить жизнеспособность самих микроорганизмов или высокую биологическую активность их метаболитов (например, ферментов) до момента их применения. Число таких биопрепаратов непрерывно возрастает.

К ним относятся хлебопекарные дрожжи, средства защиты растений, многие бактерии, вирусы, антибиотики, ферменты и т.д. Технология получения биопрепаратов на основе жизнеспособных микроорганизмов более сложная, чем получение препаратов, содержащих биологически активные продукты жизнедеятельности микроорганизмов.

Получение биопрепаратов, содержащих жизнеспособные микроорганизмы, основано на способности микроорганизмов при обезвоживании прекращать заметную жизнедеятельность на длительное время и возобновлять ее при последующем обводнении. Такое состояние, когда метаболизм обратимо заторможен или приостановлен, называют анабиозом.

Задача получения биопрепаратов, содержащих жизнеспособные микроорганизмы, на первый взгляд, кажется простой. Микроорганизмы, выделенные из культуральной жидкости, необходимо высушить до определенной влажности, в некоторых случаях совместить с наполнителем или стабилизирующими добавками и расфасовать, в удобную для хранения и применения тару. Однако во время обезвоживания биомассы в клетках происходят существенные изменения. Эти изменения могут привести к образованию новых нежелательных соединений, к инаktivации биологически активных веществ и утрате жизнеспособности клеток.

Вода в концентрате биомассы находится как в свободном, так и в связанном состоянии. При сушке удаляется внеклеточная и внутриклеточная вода. Причем, если удаление из биомассы внеклеточной воды протекает сравнительно легко, то отделение воды, связанной с компонентами биомассы, требует значительно больше энергии и необходимо повышать температуру сушки, которая ограничивается термостойкостью микроорганизмов.

Главное требование, предъявляемое к технологии обезвоживания микроорганизмов - это сохранение их жизнеспособности. Поскольку все микроорганизмы являются термолабильными, их сушку следует проводить в мягком режиме, т. е. при невысокой температуре и небольшой продолжительности.

1.9.1 Культурально - морфологические особенности штамма

Культурально - морфологические особенности штамма: грамотрицателен, клетки-палочки (молодые - короткие, в стационарной фазе - разной длины, размеры $0.3-0.5 \times 1.2-2.0$ мк), подвижные (молодые - монотрихи, с возрастом - перетрихи). Слабоподвижен. Оптимум роста $30-31^{\circ}\text{C}$, pH 6,7-7,2. На агаризованной среде с пептоном (гетеротрофные условия роста) образуют морфологически однородные округлые колонии, светло-кремовые, непрозрачные со слегка волнистым краем диаметром 2- 4 мм. На минеральной

агаризованной среде (автотрофные условия роста) колонии мелкие (1,5-2,5 мм), светло-серые, полупрозрачные.

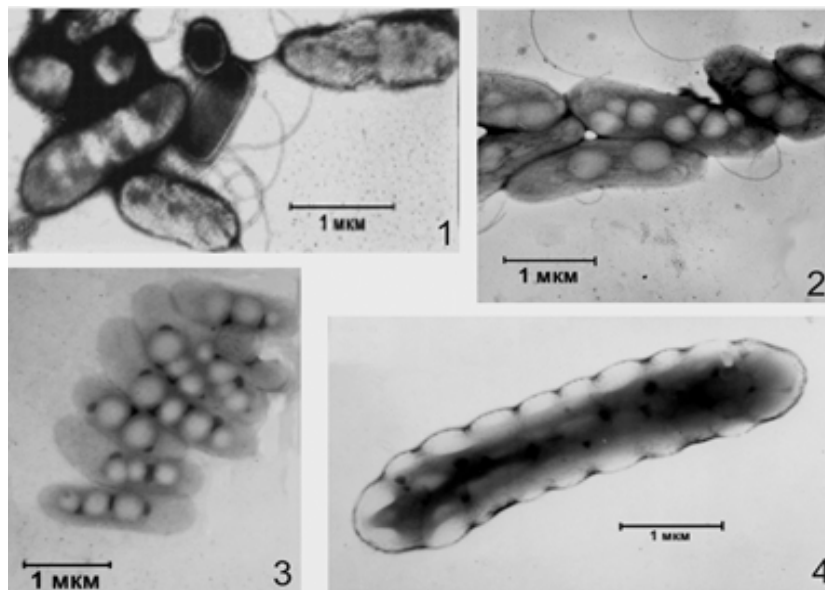


Рисунок 8 - Микрофотографии бактерии *Cupriavidus eutropha*

В жидкой питательной среде представляет однородную суспензию минеральная среда Шлегеля, содержащая в качестве источника углерода смесь монокарбоновых кислот (или сахара, органические кислоты, аминокислоты, спирты) при гетеротрофном росте, при автотрофии - смесь диоксида углерода, водорода и кислорода.

Облигатный аэроб. Факультативный хемолитоавтотроф. Оксидазоположителен. Гидролитическими ферментами не обладает. Желатину не разжижает. Крахмал не гидролизует. Обладает широким органотрофным потенциалом и способен в качестве источника углерода использовать: сахара (глюкоза, фруктоза), аминокислоты (аланин, серин, лейцин, гистидин, триптофан, глутаминовую, аспарагиновую, лизин), органические кислоты (щавелевую, лимонную, янтарную, фумаровую, уксусную, 3-и 4-масляную кислоту, пентапную, гексановую, октановую, нонановую), спирты (этанол, глицерин), 4-бутиролактон, CO_2 и CO . В качестве источника азота использует нитраты, соли аммония, карбамид, аминокислоты.

1.9.2 Культивирование бактерий (автотрофный, гетеротрофный режимы).

Культивирование бактерий проводят в стерильном режиме с использованием литровых колб, заполненных средой Шлегеля на 40-50% по объему на термостатируемой качалке или с использованием автоматизированного ферментационного комплекса BioFlo 110 («New Brunswick», США) объемом основных параметров культуры (рН, температура, концентрация кислорода и азота в культуре) на минеральной солевой среде.

В автотрофном режиме в качестве источника углерода и энергии используют смесь газов (CO_2 , H_2 , O_2) с соотношением компонентов как 1:2:7 по объему. Газовую смесь с помощью компрессора мембранного типа непрерывно прокачивают через культуру с расходом 10-14 л/мин. Контроль состава газовой смеси проводят в непрерывном режиме. Оптимальны для скорости роста значения рН 6.7-7.2, температура среды для размножения 29.5-31.5°C. Соотношение газов в смеси при автотрофном росте (% об.): диоксид углерода 5-10, кислород 10-25 (в зависимости от плотности культуры), водород от 30 до 70 (ингибирования нет).

При гетеротрофном режиме - исходная концентрация сахаров - 10-15 г/л с подпиткой культуры субстратом с использованием перистальтического насоса-дозатора, аэрация культуры - стерильным воздухом. При гетеротрофном росте - все параметры и среда Шлегеля аналогично автотрофному росту, источник углерода (сахара и/или органические кислоты) - 10-15 г/л.

1.9.3 Основные характеристики штамма

Ростовые характеристики: штамм растет на минеральной среде с сахарами или органическими кислотами, а также в атмосфере водорода, двуокиси

углерода и кислорода, специфических факторов роста и органических добавок не требуется.

Границы физиологического действия рН в диапазоне 4.4 - 8.6, штамм сохраняет способность к росту в диапазоне температур 20-41°C. Стабильно сохраняет свои характеристики при варьировании условий культивирования и сред : замена источника углерода и энергии, низкие или высокие значения активной реакции среды, повышение температуры до 35°C, использование в качестве ростового токсического субстрата - 4-бутиролактон и соли монокарбоновых кислот. На полной питательной среде удельная скорость роста - до 0.451/ч, продуктивность - до 2 г/л час, содержание общего азота - до 12%, белка - до 65%, при дефиците азота в среде накапливает полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот, полигидроксиалканоаты (ПГА),

Таким образом, для заявляемого штамма характерны:

- устойчивый продуктивный рост на средах различного состава;
- способность длительно сохранять активность в лиофилизированном виде;
- высокая активность ферментов, контролирующих синтез ПГА;
- способность к синтезу ПГА с высокими выходами;
- устойчивость к воздействию С - субстратов - стимуляторов синтеза гетерополимерных ПГА;
- способность к синтезу гетерополимерных ПГА, образованных различными мономерами с макровключениями последних;
- способность к синтезу ПГА, имеющих степень кристалличности ниже 50%.

Для реализации режима синтеза ПГА заявляемым штаммом, штамм *Cupriavidus eutrophus* ВКПМ В-10646 выращивают в периодическом режиме на среде Шлегеля в автотрофном режиме или гетеротрофно на сахарах или органических кислотах: на первом этапе при избытке углеродного субстрата на полной питательной среде; на втором этапе - в безазотной среде.

Для образования ПГА с различным составом мономеров в состав среды с помощью перистальтического насоса дозатора в культуру вносят дополнительный углеродный субстрат в виде солей кислот (масляной или валериановой, гексановой, октановой) или 4-буторолактон и др.

В зависимости от дозы подаваемого дополнительного углеродного субстрата и времени ферментации соотношение мономеров с различной длиной С- цепи в полимере варьируется в широких пределах, при этом синтезируются гетерополимерные ПГА, имеющие степень кристалличности 50% и менее.

2. Материалы и методы

2.1 Сушильный шкаф Memmert UN 55, лиофильный шкаф Ilshin Bio Base (Корея);

В работе использованы образцы бактериальной биомассы *Cupriavidus eutrophus* В10646, сушильный шкаф Memmert UN 55(Германия), представленный иллюстрацией, так как в нем возможно подобрать нужные для исследования температуры. Биомассу влажностью 50 – 60% помещают в нержавеющей поднос слоем не более 1,5 см. и высушивают в предварительно нагретом сушильном шкафу Memmert UN 55 при разных температурах до постоянной массы. Сушильный шкаф Memmert UN 55 с естественной циркуляцией воздуха предназначен для тепловой обработки: испытания материалов, выполнения сложных экспериментов, сушки или темперирования различных материалов, в том числе биологического назначения или электронных компонентов.

Сублимационное высушивание проводили в лиофильном шкафу Ilshin Bio Base (Корея); на первом этапе биомассу замораживали до постоянной температуры - 40°C, затем, на втором этапе биомассу сушили нагреванием до +20°C в камере под давлением 40Па. Сублимационная сушка наиболее пригодна для живых микроорганизмов, некоторых видов ферментов и дру-

гих термолабильных продуктов. В этом случае меньше всего инактивируются ферменты и хорошо сохраняется жизнеспособность клеток.

Показателем эффективности сушки служила остаточная влажность биомассы. Высушенную в сушильном шкафу биомассу для дальнейшей обработки измельчали в ступке.



Рисунок 9 - Сушильный шкаф Memmert UN 55



Рисунок 10 - Лиофильная сушилка Lyophil Pride LP10 (ilShin Bio Base CCo., Ltd., Корея)

2.1.1 Определение влажности

Влажность биомассы определяли методом высушивания при заданной температуре до постоянной массы. Бюксы с навеской в процессе сушки при использовании эксикатора и аналитических весов периодически взвешивались до отсутствия разницы в весе в результатах двух последних измерений.

Метод основан на способности исследуемого продукта, помещенного в сушильный шкаф, отдавать гигроскопическую влагу при температуре 100 - 105°C. В высушенный бюкс отвешивают $1 \pm 0,0005$ г измельченной биомассы.

Бюкс с навеской в открытом виде ставят в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 105 °С. Рядом с бюксом кладут крышку.

Высушивание проводят в течение 5 ч., после чего бюкс вынимают из сушильного шкафа пинцетом, закрывают крышкой, охлаждают в эксикаторе 20-30 мин и взвешивают на аналитических весах. Затем бюкс с навеской повторно помещают в сушильный шкаф и через 60 мин повторяют ту же операцию охлаждения и взвешивания. Так поступают до тех пор, пока не исчезнет разница между результатом двух последних взвешиваний.

2.2 Основные технологические стадии.

Получение инокулята, биосинтез, сгущение, сушка.

Музейная культура хранится в пробирках, затем смывается в колбы со средой Шлегеля и выращивается до необходимого количества и плотности посевного материала в термостатируемой качалке.

Следующая стадия – биосинтез. Полученный инокулят стерильно подается в ферментер, в котором происходит рост бактерий. В процессе биосинтеза в ферментер подаются питательные среды, а также регулируется подача воздуха, контролируется температура и обороты мешалки.

На заключительной стадии процесса, непосредственно для синтеза полимера, подача мочевины прекращалась.

После процесса биосинтеза биомасса сгущалась на ультрафильтрационной установке (для отделения белков и липидов), далее подвергалась центрифугированию для отделения биомассы от культуральной жидкости, а затем замораживалась.

Далее биомассу (влажностью 50 – 60%) помещали в нержавеющей поднос слоем не более 1,5 см и высушивали в предварительно нагретом сушильном шкафу Memmert UN 55 (представлен на иллюстрации) при разных температурах (60°C, 80°C, 105°C,) до постоянной массы. Для сублимацион-

ной сушки биомассу загружали на поддоны, предусмотренные технологией лиофильного шкафа.

2.3 Стадия экстракции

Для определения влияния температуры сушки биомассы на выход и физико - химические свойства полимера проводили процесс экстракции биомассы в два этапа. Два основных шага для получения полимера, это, во-первых, изменение проницаемости клеточных мембран, что позволит высвободить и растворить молекулы ПГА. Ряд факторов оказывает влияние на ведение экстракции (температура, время экстракции, количество и тип экстрагента, тип сырья, полученного в результате культивирования бактерий).

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

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

1. Очистка биомассы от липидов и белковых фракций. Экстракция этиловым спиртом проходит 1 час на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Standard (Германия) с использованием обратного холодильника. Количество веществ, извлекаемых этанолом, определяли путём отбора аликвоты в количестве 10 мл и высушиванием в выпарных чашках.

Выход экстрактивных веществ, извлекаемых этанолом (в процентах от сухой биомассы) рассчитывали по формуле $x = \frac{v \cdot (m_a - m_{ч})}{m_n} \cdot 10$, деленное на m_n , где V – объём полученного экстракта, мл; m_a и $m_{ч}$ – масса чашки с навеской и исходной чашки соответственно, г; m_n – масса сухой биомассы, взятой для экстракции, г;

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

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

4. Фильтрация экстракта с помощью воронки Бюхнера, склянки Бунзена, вакуумного насоса и бумажного фильтра «белая лента». Оставшийся шрот после экстракции анализируется на остаток полимера, жирных кислот.

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

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

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

Также, необходимо проанализировать спиртовой экстракт на липидный и белковый состав. Для этого полученный экстракт в пункте 5 максимально упаривается на роторном испарителе, затем центрифугируется для

получения спиртового фугата и твердого осадка, далее следует осаждение полимера в виде осадка и его фильтрация.

Извлечение полимера с помощью растворителей проходит без потери его качества за счет повышения проницаемости клеточной мембраны и последующей солюбилизации ПГА[17].

Представлена схема определения выхода полимера

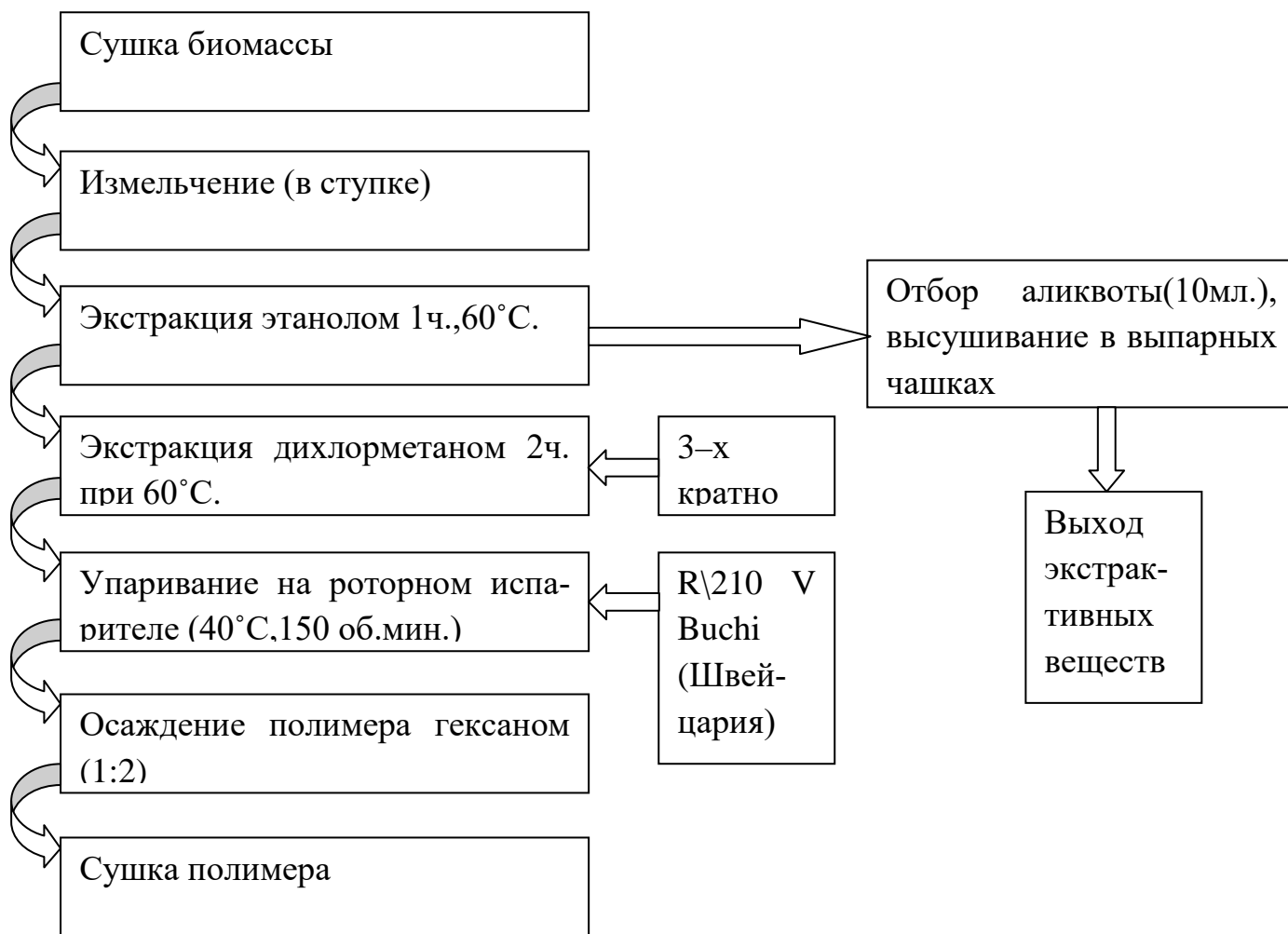


Рисунок 11 - Схема экстракции

Содержание полимера в исходной биомассе и наличие нежелательных примесей (прежде всего липидов и жирных кислот) в полимере, т.е. чистоту полимера контролировали с использованием газового хроматографа с хромато-масс-спектрометром (6890/5975С, Agilent Technologies, США) по общепринятым методикам после метанолиза проб [55].

2.4 Метанолиз образцов

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

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

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

1. Поместить пробы под обратный холодильник и зафиксировать резинками, опустить в водяную баню. Температура кипячения 80 °С.

2. Засечь время метанолиза – 5 ч после того, как в колбах начнёт образовываться сконденсированный хлороформ.

3. После 5 часового метанолиза залить в колбы по 3 мл дистиллята, взболтать и поставить в холодильник на сутки для расслоения получившейся смеси.

Для очистки проб перед непосредственной хроматографией потребуются:

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

- Вата;
- Сернистый натрий;

1. Перенести пробу из колбы в делительную воронку, колбу промыть 0,5 мл хлороформа и слить в делительную воронку.

1. Добавить дистиллята в делительную воронку, перемешать до образования нижнего слоя.

2. Нижний слой слить во вторую делительную воронку, добавить в неё дистиллят, перемешать и дать отслоиться.

3. Поместить в маленькую воронку вату, присыпать сверху сернистым натрием, воронку поместить в чистую колбу. Колбу закрепить в штативе.

4. Пропустить нижний слой из делительной воронки через слой сернистого натрия в маленькой воронке. Воронку промыть 0,5 мл хлороформа. Полученный хлороформенный слой используется для анализа в хроматографии.

Подготавливаем пробы к дальнейшему хроматографированию, для определения чистоты полимера.

2мл полимера + 2мл хлороформа = фильтрование.

2.5 Гель–хроматография белков

Гель - хроматографию использовали для разделения водорастворимых веществ на высокомолекулярную (белки) и низкомолекулярную фракции, а также для разделения водорастворимых белков на отдельные фракции [17].

Для разделения водорастворимых веществ использовали сефадекс G-150. Колонку 35 × 1,5 см заполняли сефадексом и за 2 - 3 ч перед работой переносили в холодную комнату. Водный экстракт предварительно концентрировали до содержания 20 мг/мл и переносили в колонку. В работе использова-

лась колонка диаметром 2 см и высотой 30 см. Объем наносимого образца не более 1 - 2 % объема колонки.

Скорость протекания элюента составляла 0,3 мл/мин. Контроль за выходом белковых фракций осуществлялся спектофотометрически при длине волны 280 нм на приборе СФ-26. Сбор фракций проводили с использованием автоматического фракционного коллектора FCC 60.

Представлена схема определения физико – химических свойств полимера

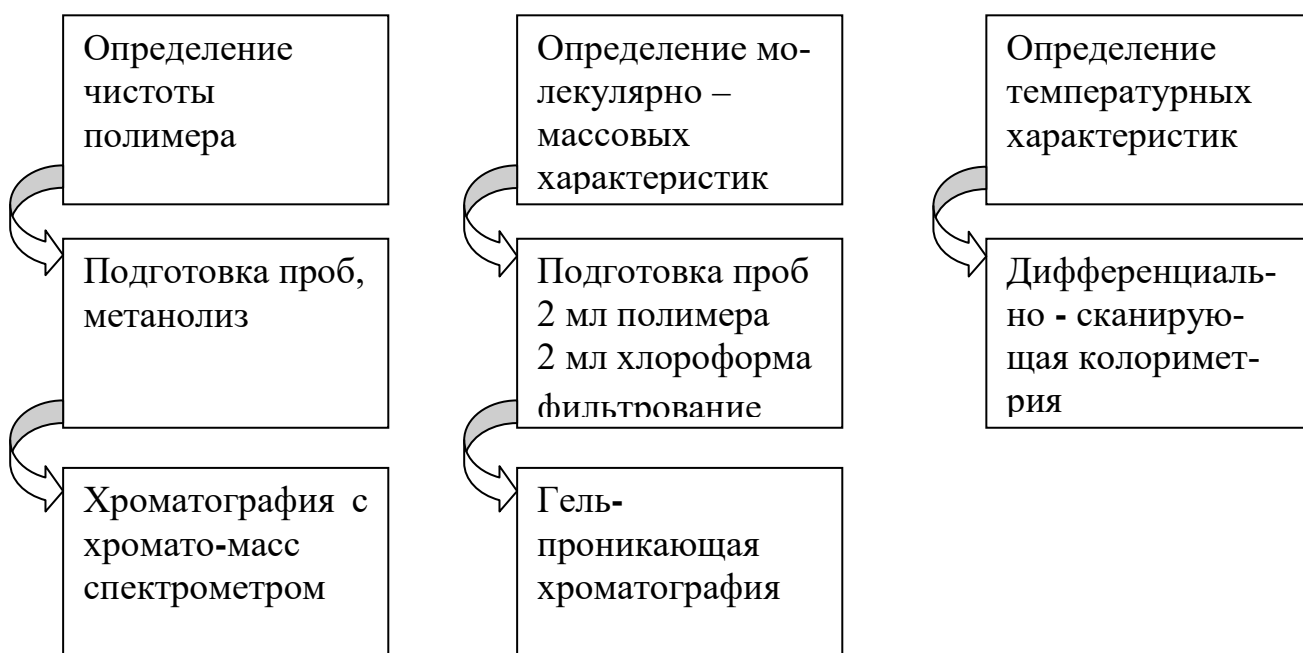


Рисунок 12 - Определение физико – химических свойств полимера

Нерастворенный клеточный материал отделяется путем нагревания вакуумного фильтра и охлаждения полученного горячего раствора, в результате чего получится полиэфирный гель. Однако, осадители, такие как вода, этанол, метанол, ацетон или их смеси, также могут быть добавлены в раствор, после чего полиэфир осаждают в виде кристаллов. Полиэфиры, отфильтрованные с помощью вакуумной фильтрации, дополнительно можно освободить от жидкости и осадить путем перемешивания остатка с осадителями, такими как вода, этанол, метанол, ацетон или их смеси.

Кристаллический осадок отфильтровывают и сушат. Поскольку все без исключения экстрагенты имеют высокие температуры кипения по сравнению с осадителями, они могут быть выделены из осадителей, например, путем дистилляции, соответственно, осадители и экстрагенты можно использовать вторично для экстракции и осаждения полиэфиров[35].

Таким образом, в первом этапе этанолом из высушенной измельченной биомассы удаляли липиды и жирные кислоты (T 55-60°C) и фильтровали, на втором – экстрагировали полимер дихлорметаном (1:4). Осаждение производили гексаном (1:2). Полученный полимер высушивали при комнатной температуре и взвешивали.

Показателем эффективности сушки служила остаточная влажность биомассы.

Количество веществ, извлекаемых этанолом, определяли путём отбора аликвоты в количестве 10 мл и высушиванием в выпарных чашках. Выход экстрактивных веществ, извлекаемых этанолом (в процентах от сухой биомассы) рассчитывали по формуле.

Молекулярную массу полимера определяли с использованием системы гель - проникающей хроматографии Agilent 1200 с набором полистироловых стандартов (Sigma, США). Находили значение средне - весовой, среднечисловой молекулярной массы и полидисперсности (Мв, Мч, ПД); температурные характеристики – методом дифференциально - сканирующей калориметрии на приборе DSC 1 (Mettler Tolloedo, Швейцария).

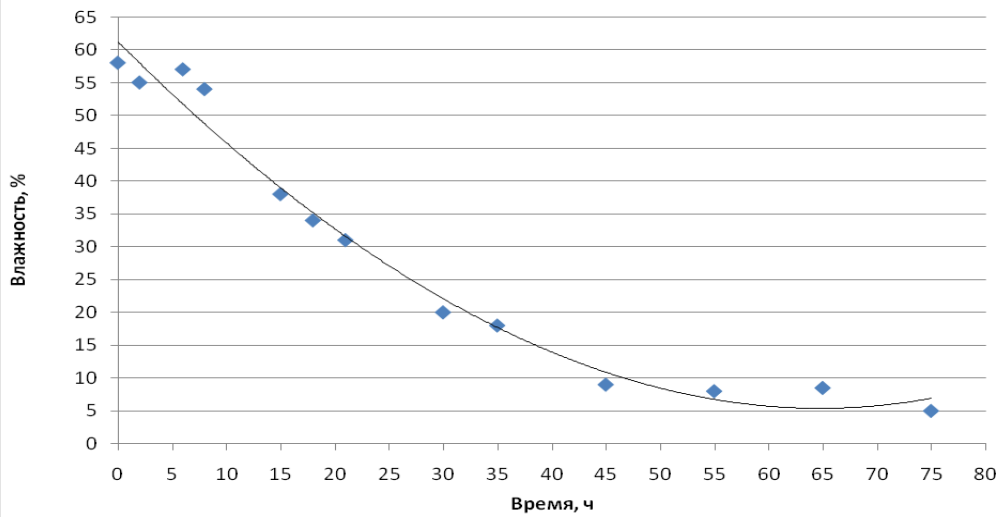
Эксперименты проведены в трех аналитических повторностях. Математическую обработку экспериментальных данных проводили стандартными методами; определяли средние значения результатов; рассчитывали отклонения от среднего значения для каждого результата; дисперсию, стандартное отклонение отдельного результата и стандартное отклонение среднего результата. Проверку надежности полученных результатов определяли по критерию Стьюдента при избранной доверительной вероятности $\alpha = 0,95$. Полу-

ченные результаты проверяли по одному из вышеописанных способов (по критериям максимального отклонения, Стьюдента) на наличие грубых ошибок. После исключения грубых ошибок производили повторную обработку результатов [50]. Для решения поставленных задач использовали программу MS Office Excel 2007 с встроенным пакетом анализа данных.

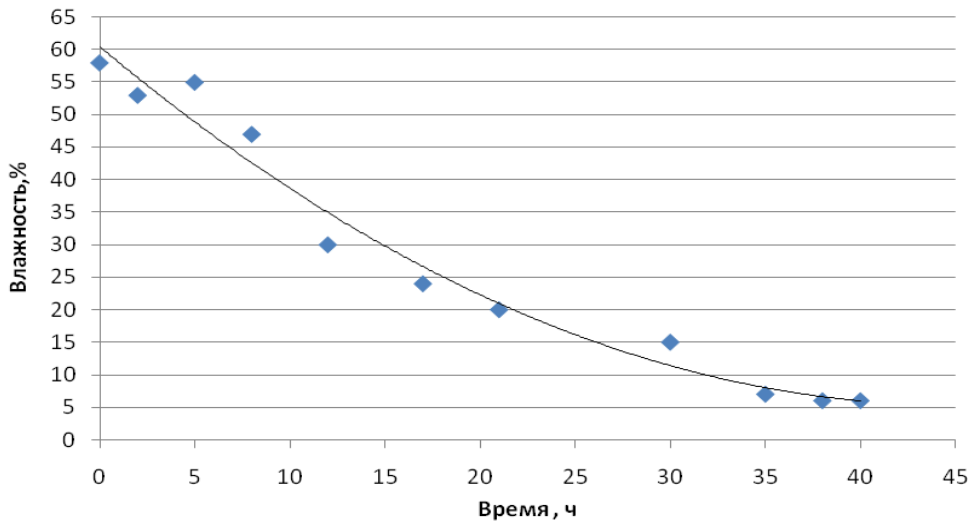
3 Результаты и обсуждения

При 60°C время сушки увеличилось до 75 часов, остаточная влажность биомассы варьировала от 6 до 8 - 10 %. Влажность исходной биомассы составила 57%, при этом в первые 8 часов активного испарения влаги не происходило, температура биомассы повышалась, однако влажность снижалась незначительно. Далее скорость сушки возрастала, достигая к концу периода прогрева максимальной величины. Кривая сушки биомассы при температуре 80°C внешне схожа с кривой сушки 60°C, но период процесса продолжался 40 ч. Наиболее быстро высушивание происходило при 105°C (рис. 8а), спустя 16 ч высушивания образцы не содержали влаги. Длительность процессов влияла на остаточную влажность биомассы, которая варьировала от 6 до 8–10 %.

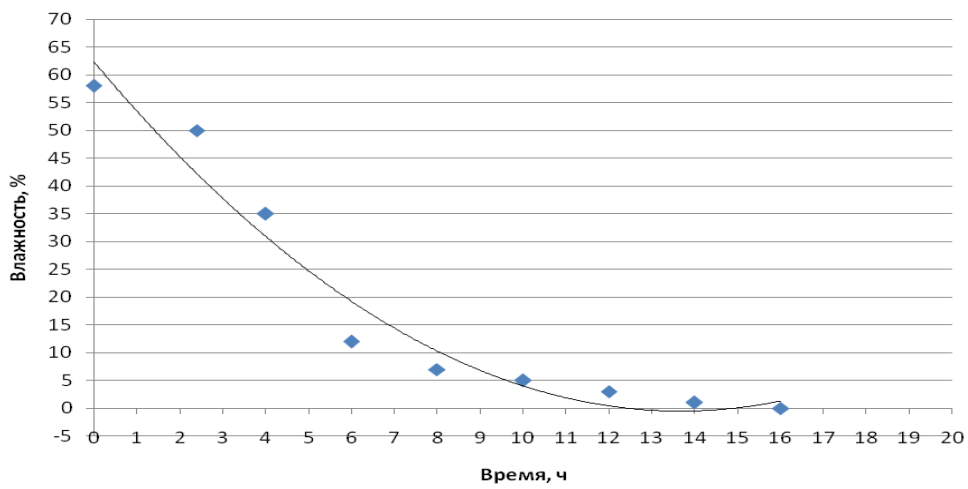
Сублимационная сушка продолжалась 50 часов, биомасса после сублимации в образцах содержала остаточную влагу не более 0,5%. Заморозка – первый этап сублимации, занимает около 5 ч. Активный процесс удаления свободной влаги продолжается 22 часа. Третий этап – заключительный, продолжается 21 час, происходит удаление молекулярно связанной воды.



а



б



в

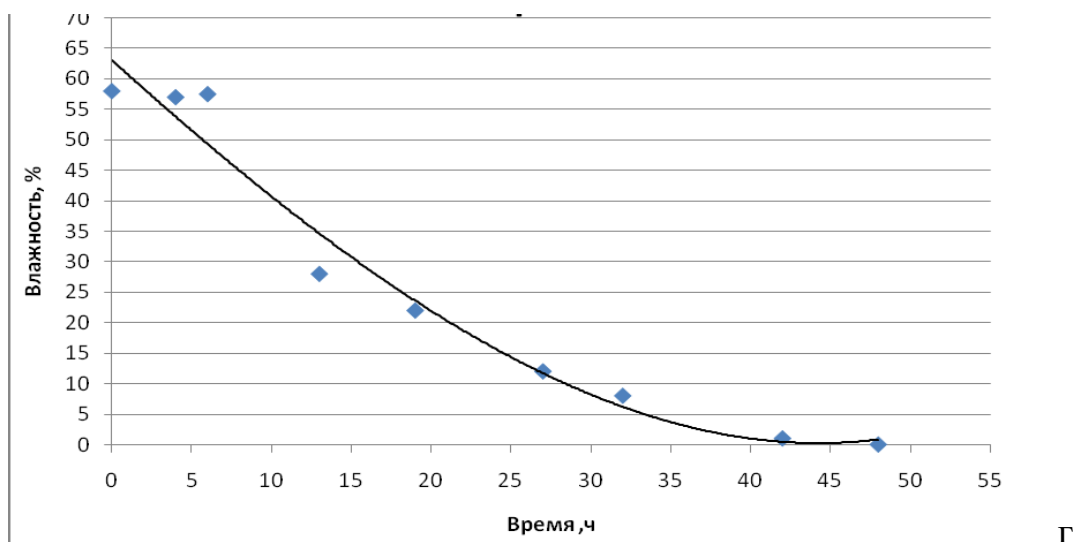


Рисунок 13 - Кривые сушки биомассы: а – высушенная при 60 °С; б - 80°С, в - 105 °С; г - высушенная сублимационно.

Графики составлялись по зафиксированным табличным данным

Таблица 1 - Данные для графиков

Температура сушки 60°С		Температура сушки 80°С		Температура сушки 105°С		Лиофильная сушка	
время	влажность	время	влажность	время	влажность	время	влажность
0	58	0	58	0	58	0	58
2	55	2	53	2,4	50	4	57
6	57	5	55	4	35	6	57,5
8	54	8	47	6	12	13	28
15	38	12	30	8	7	19	22
18	34	17	24	10	5	27	12
21	31	21	20	12	3	32	8
30	20	30	15	14	1	42	1
35	18	35	7	16	0	48	0
45	9	38	6	--	--	--	--
55	8	40	6	--	--	--	--
65	8,5	--	--	--	--	--	--
75	5	--	--	--	--	--	--

Наибольший выход полимера получен из образцов, высушенной сублимационно. Предполагается, что в результате сушки и экстракции этанолом

негативное воздействие на клеточные мембраны суммируется и становится критическим, приводит к более полному их разрушению. Одновременно отсутствие воды в системе способствует увеличению выхода полимера.

В работе с биомассой влажностью 50 – 60% (сырая биомасса) выделено менее 80 % полимера от его исходного содержания в биомассе. Неполнота экстракции связана с тем, что присутствие воды в биомассе при предварительной экстракции спиртом не приводит к полному разрушению клеточной стенки, вода приводит к разбавлению растворителя и стабилизации клеточных мембран. В данной системе жидкость, до 20 % которой находится в клетках бактерий в связанном состоянии, образует мембраны и препятствует проникновению растворителя в клетку [50]. Более средний выход полимера получен из образцов биомассы, высушенной при температуре 60°C и 80°C - 85,3 % и 83,4% соответственно.

В таблице 2 приведены данные выхода полимера из различных образцов биомассы.

Таблица 2- Выход полимера из различных образцов биомассы

Наименование	Липиды и жирные кислоты, %	Выход полимера, %	Чистота полимера, %
Исходная биомасса, влажность 57%	2,5	78,7	99,7
Биомасса, высушенная при 60 °С	3,2	85,3	98,9
Биомасса, высушенная при 80 °С	2,9	83,4	98,8
Биомасса, высушенная при 105 °С	2,8	24,9	99,3
Лиофильно высушенная биомасса	2,5	95,3	99,8

Выход полимера из биомассы, высушенной при 105°C значительно меньше - 24,9%. Причиной низкого выхода является деструктивное воздействие свободных радикалов, образующихся при денатурации белков (под влиянием высокой температуры), углеводов, пептидов и других соединений, а также возрастающее окисление кислородом [54].

В пользу данного суждения свидетельствует и тот факт, что при анализе на ДСК (дифференциально – сканирующем колориметре) пробы влажной биомассы пик плавления полимера не зафиксирован, но хорошо читается на пробе с сухой биомассой того же самого образца.

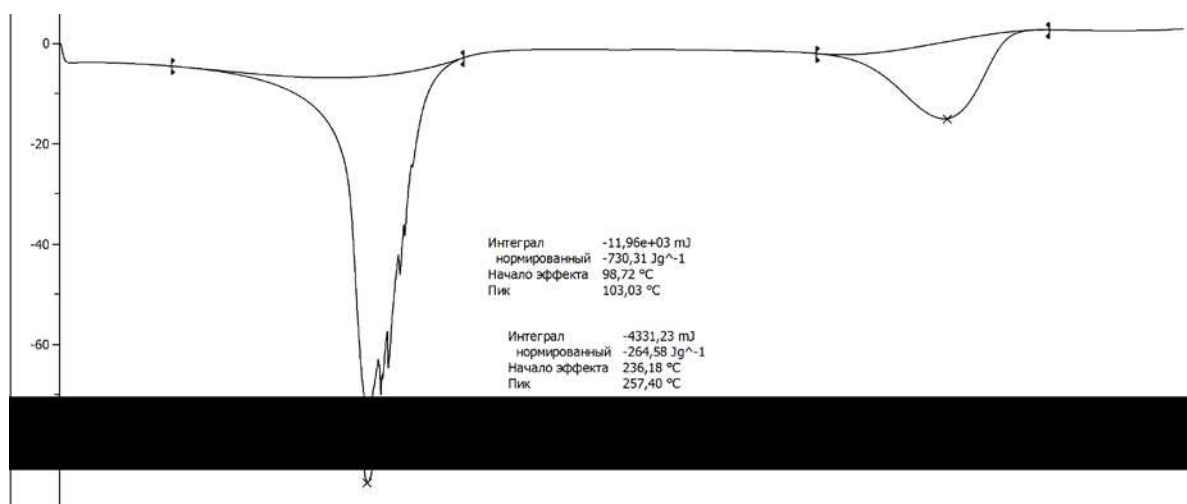


Рисунок 14 - Анализ ДСК - в сырой биомассе пик плавления не обнаружен;

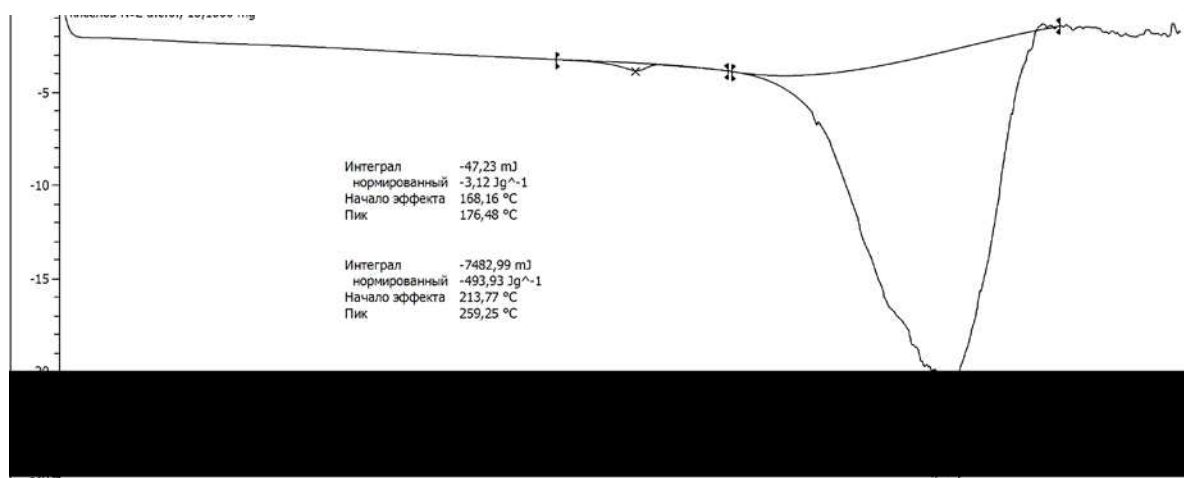


Рисунок 15 – Анализ ДСК – в сухой биомассе пик плавления 176,48 °C

В таблице 3 приведены молекулярно - массовые характеристики выделенных образцов полимеров. Образцы, выделенные из биомассы, высушенной при повышенных температурах, имели более низкие показатели, существенно отличающиеся от образцов, выделенных из исходной (Мч 232 кДа и Мв 951 кДа) и лиофильно высушенной биомассы (214 кДа и 959 кДа).

Более низкая молекулярная масса присутствует у образца полимера, выделенного из биомассы, высушенной при 105 °С (53 кДа и 238 кДа). Средние показатели зафиксированы у образцов биомассы, высушенных при 60°С и 80°С, 104 кДа и 332 кДа, 115 кДа и 357 кДа соответственно. Снижение молекулярной массы образцов, так же как и низкий выход полимера, свидетельствует о его значительной деструкции.

Таблица 3 – Молекулярно - массовые характеристики полученных образцов полимера

Наименование	Мч, кДа	Мв, кДа	ПД	Ткр, °С	Тпл, °С	Тдр, °С
Исходная биомасса, влажность 57%	232	951	4,1	99,0	173,1	280,8
Биомасса, высушенная при 60°С	115	357	3,1	71,7	171,2	284,1
Биомасса, высушенная при 80°С	104	332	3,7	74,2	169,5	284,2
Биомасса, высушенная при 105°С	53	238	4,5	58,3	165,1	283,6
Леофильно - высушенная биомасса	214	959	4,5	97,7	173,9	284,2

Примечание:

Мч – среднечисловая молекулярная масса;

Мв – средневесовая молекулярная масса;

ПД – полидисперсность;

Ткр – температура кристаллизации;

Тпл – температура плавления;

Тдегр – температура термической дегградации.

Наблюдается, что чем выше температура сушки, тем ниже значение молекулярной массы полимера. Чем выше содержание высокомолекулярных

фракций в полимере, тем более высокие у него прочностные свойства, повышенная твердость и температуростойкость. Показано, что образцы, высушенные сублимационно, имеют оптимальные данные по среднечисловой и средневесовой молекулярной массе.

Наряду со снижением молекулярно - массовых показателей изменяются температурные характеристики образцов полимера.

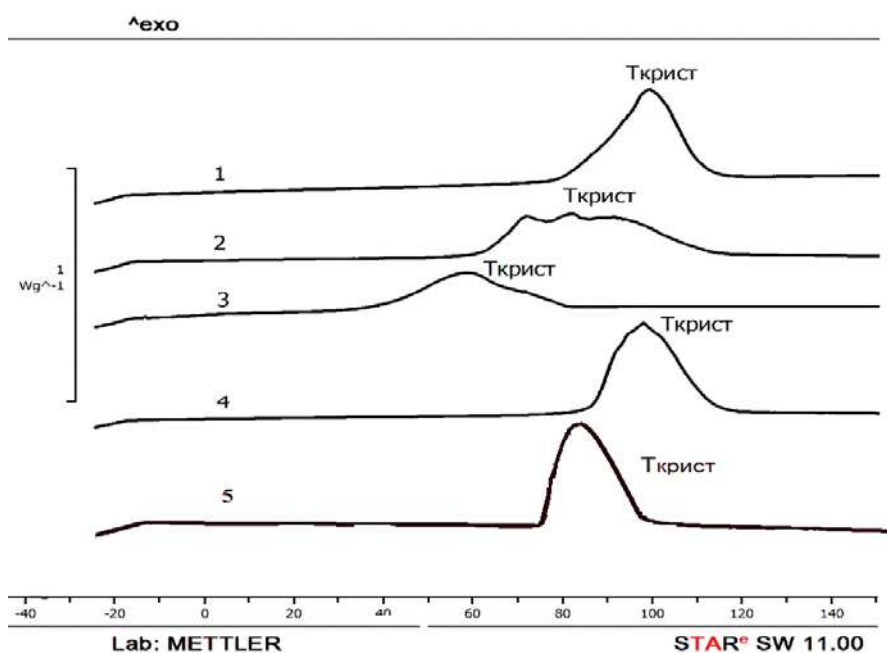


Рисунок 16 - Температура кристаллизации

- 1 – полимер, выделенный из исходной биомассы;
- 2 – полимер, выделенный из биомассы, высушенной при 60°C;
- 3 – полимер, выделенный из биомассы, высушенной при 105°C;
- 4 – сублимационно высушенный полимер;
- 5 – полимер, выделенный из биомассы, высушенной при 80°C.

Температура кристаллизации полимера, выделенного из исходной биомассы, составила 99°C. Пик имеет правильную форму и чёткие границы, что дает возможность предположить образование крупных кристаллических структур в полимере в процессе кристаллизации. У образцов, высушенных температурной сушкой, 60°C и 80°C температура кристаллизации составила 71,7 и 58,3°C соответственно. Образцы биомассы, высушенные при температуре 105°C имеют пиком кристаллизации неправильную форму с широкими

границами, что может свидетельствовать об образовании кристаллитов различного размера, или о возможных дефектах кристаллической решётки.

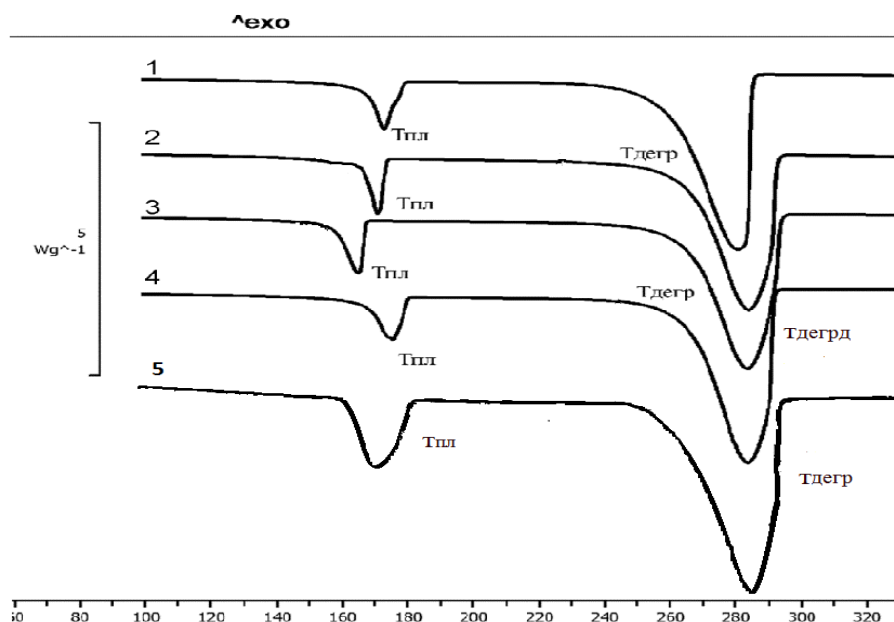


Рисунок 17 - Температура плавления и термической деградации при температурной сушке

- 1 – полимер, выделенный из исходной биомассы;
- 2 – полимер, выделенный из биомассы, высушенной при 60°C;
- 3 – полимер, выделенный из биомассы, высушенной при 105°C;
- 4 – сублимационно высушенный полимер;
- 5 – полимер, выделенный из биомассы, высушенной при 80°C.

Температура плавления у всех выделенных образцов варьировала от 165,1 до 173,9°C. Температура термической деградации находилась в пределах 280-285 °C.

Заключение

1. Путем культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646 в лаборатории биотехнологии новых биоматериалов получены образцы биомассы бактерий.

2. Установлено, что с увеличением температуры высушивания биомассы скорость и степень деструкции полимера возрастают. Высокая температура сушки биомассы бактерий негативно сказывается на полноте экстракции, а также качественных и количественных характеристиках полимера. В результате протекающих процессов деструкции, снижаются молекулярно-массовые и температурные характеристики полимера. Таким образом, использование высокотемпературной сушки в процессе производства ПГА возможно только в щадящем температурном режиме, что напрямую связано с увеличением времени процесса. Кроме того, применение на производстве высокотемпературной сушки потребует использования измельчительного оборудования.

3. Сублимационное высушивание биомассы минимизирует негативное воздействие на качественные характеристики полимера и обеспечивает наиболее полную экстракцию. Сублимационная сушка не приводит к изменению молекулярно – массовых характеристик полимера, не требует измельчения биомассы и обеспечивает наиболее полный выход полимера.

Благодарность

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

Список литературы

1. Волова, Т.Г. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие для самостоят. работы [для студентов программы подг. 020400.68 «Биология»] / Сиб. федерал. ун-т ; сост.: Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. - Красноярск : СФУ, 2013. - 73 с.
2. Noisshiki Y., Komatsuzaki S. Medical materials for soft tissue use // Japanese Patent Application. № JP 7275344 A2. 1995.
3. Волова Т.Г. Физико-Химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения. / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов, А. Д. Васильев, А. Г. Суковатый, А. J. Sinskey // Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2013, том 55, № 7, с. 775–786.
4. Вторичные ресурсы: проблемы, перспективы, технология, экономика: Учеб. пособие / Г. К. Лобачев [и др]; – Волгоград, 1999. – 180 с.
5. Вторичное использование полимерных материалов / под ред. Е. Г. Любешкиной. – М., 1985. – 192 с.
6. Одесс, В. И. Вторичные ресурсы: хозяйственный механизм использования / В. И. Одесс. – М.: Экономика, 1988. – 159 с.
7. Васнев, В. А. Биоразлагаемые полимеры. Высокомолекулярные соединения / В. А. Васнев. – Сер. Б. М., 1997. Т. 39. № 12. С. 2073 – 2086.
8. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов: Учеб. пособие / А. С. Клинков, П. С. Беляев, М. В. Соколов. – Тамбов: ТГТУ, 2005. – 80 с.
9. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // Proc. Biochem., 2004. – V. 40. – P. 607 – 619.
10. Anderson, A.J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A. J. Anderson, E. A. Dawes // Microbiol. Rev., 1990. – V. 54. – P. 450 – 472.

11. Волова, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Красноярск.: СО РАН, 2002. – 267 с.
12. Beker M.J., Blumberg J.E., Ventina E.J., Rapoport A.J. (1984) Characteristics of cellular membranes of rehydration of dehydrated yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19: 347–352
13. Perelman A., Matsukawa R., Schlosberg M., Cohen B.-S., Fostik-Magyar C., Dubinsky Z. (1998) Natural antioxidant activity in some microalgal species. *Israel-Journal-of-Plant-Sciences*, 46: 169-176
14. Hrabak O (1992) Industrial production of poly-beta-hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol Rev* 103:251–255
15. Choi J., Lee S.Y. Factor affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999, b. – Vol. 51. – P. 13–21.
16. Войнов Н.А., Волова Т.Г., Зобова Н.В., Маркова С.В., Франк Л.А., Шишацкая Е.И. (2009) Современные проблемы и методы биотехнологии. Красноярск, Электронное учебное пособие ИПК СФУ, 418 с. [Voinov N.A., Volova T.G., Zobova N.V., Markova S.V., Frank L.A., Shishatskaya E.I. (2009) Modern Problems and methods of biotechnology. Krasnoyarsk, Electronic textbook IPK SFU, 418 p. (in Russian)]
17. Киселев Е.Г., Демиденко А.В. (2014) Сравнительное исследование методов экстракции ПГА из биомассы бактерий. *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*, 7: 148–160 [Kiselev E.G., Demchenko A.V. (2014) A comparative study of extraction methods of PHAs from bacterial biomass. *Journal of Siberian Federal University. Biology*, 7: 148-160 (in Russian)]
18. Li Y., Naghdi F.G., Garg S., Adarme-Vega T.C., Thurecht K.J., Ghafor W.A., Tannock S., Schenk P.M. (2014) A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microbial Cell Factories*, 13:14

19. Кунилова Т.М. (2008) Анализ существующих типов оборудования и технологий сушки. Процессы и аппараты пищевых производств, электронный журнал. Санкт-Петербург: СПбГУНиПТ, 1 [Kunilova T.M. (2008) Analysis of the existing types of drying equipment and techniques. Processes and devices of food manufactures, e-zine. St. Petersburg: SPbGUNiPT 1 (in Russian)]
20. Бергельсон Л.Д. (1975) Биологические мембраны: факты и гипотезы. М., Наука. - 182 с. [Bergelson L.D. (1975) Biological membranes: facts and hypotheses. Moscow, Nauka, 182 p. (in Russian)]
21. Источники: <http://medbe.ru/materials/problemy-i-metody-biotekhnologii/sushilki-v-biotekhnologicheskoy-promyshlennosti/>
© medbe.ru Н.А. Воинов, Т.Г. Волова.
22. Патенты РФ № 2333962, US4358583, US4391766.
23. Вторичное использование полимерных материалов / под ред. Е. Г. Любешкиной. – М., 1985. – 192 с.
24. Page W. J., Cornish A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate // *Applied and environmental microbiology*. – 1993. – Т. 59. – №. 12. – С. 4236-4244.
25. Фомин В.А., Гузеев В.В. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования // *Пластические массы*. – 2001. – № 2. – С. 42-46.
26. Mantelatto P.E., Nazareno A., Sertori D (2013) US Patent 8357508 B2. Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cellular biomass.
27. Шершнева А. М. и др. Конструирование микрочастиц на основе реторбируемых полимеров Биопластотан с применением метода распылительной сушки. – 2014.
28. Вайнберг Р. Ш. и др. Теплофизические проблемы и практические результаты повышения энергоэффективности извлечения и термообработки высокомолекулярных биополимеров // *Промышленная теплотехника*. – 2007.

29. Волова Т. Г. и др. Фундаментальные основы производства применения биodeградируемых полигидроксиалканоатов. – 2012.
30. Stein R.S. Polymer recycling: opportunities and limitations // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – V. 89. – P. 835-838.
31. Бергельсон Л.Д. (1975) Биологические мембраны: факты и гипотезы. М., Наука. – 182 с. [Bergelson L.D. (1975) Biological membranes: facts and hypotheses. Moscow, Nauka, 182 p. (in Russian)]
32. Steinbüchel A., Valentin H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids // FEMS Microbiol Lett. – 1995 b. – V. 128. – P. 219-228.
33. Рупек, Биопластики: перспективы в России (2014) (<http://rupec.ru/analytics/30616/>)
34. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов: Учеб. пособие / А. С. Клинков, П. С. Беляев, М. В. Соколов. – Тамбов: ТГТУ, 2005. – 80 с.
35. Вторичное использование полимерных материалов / под ред. Е. Г. Любешкиной. – М., 1985. – 192 с.
36. Одесс, В. И. Вторичные ресурсы: хозяйственный механизм использования / В. И. Одесс. – М.: Экономика, 1988. – 159 с.
37. Васнев В. А. Биоразлагаемые полимеры. Высокомолекулярные соединения / В. А. Васнев. – Сер. Б. М., 1997. Т. 39. № 12. С. 2073 – 2086.
38. Волова, Т.Г. Физико-Химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения. / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов, А. Д. Васильев, А. Г. Суковатый, А. J. Sinskey // Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2013, том 55, № 7, с. 775–786.
39. Yu J., Chen L. X. L. Effective Recovery and Purification of Polyhydroxyalkanoates by Selective Dissolution of Cell Mass // Biotechnology progress. – 2006. – Т. 22. – №. 2. – С. 547-553.
40. Одесс, В. И. Вторичные ресурсы: хозяйственный механизм использования / В. И. Одесс. – М.: Экономика, 1988. – 159 с.

41. Вайнберг Р. Ш. и др. Теплофизические проблемы и практические результаты повышения энергоэффективности извлечения и термообработки высокомолекулярных биополимеров // Промышленная теплотехника. – 2007.
42. Волова Т. Г. и др. Фундаментальные основы производства и применения биodeградируемых полигидроксиалканоатов. – 2012.
43. Волова Т. Г., Volova T. G. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов. – 2014.
44. Волова, Т.Г. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие для самостоят. работы [для студентов программы подг. 020400.68 «Биология»] / Сиб. федерал. ун-т ; сост.: Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. - Красноярск : СФУ, 2013. - 73 с.
45. Noisshiki Y., Komatsuzaki S. Medical materials for soft tissue use // Japanese Patent Application. № JP 7275344 A2. 1995.
46. Page W. J., Cornish A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate // Applied and environmental microbiology. – 1993. – Т. 59. – №. 12. – С. 4236-4244.
47. Stein R.S. Polymer recycling: opportunities and limitations // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1992. – V. 89. – P. 835-838.
48. Steinbüchel A., Valentin H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids // FEMS Microbiol Lett. – 1995 b. – V. 128. – P. 219-228.
49. Киселев Е. Г. и др. Техничко-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов. – 2012.
50. Харчук И.А. (2005) Анабиоз: основные понятия и сопровождающие его процессы. Экология моря, 70: 62 – 78 [Kharchuk I.A. (2005) Cryostasis: basic concepts and the accompanying processes. Sea Ecology, 70: 62 – 78 (in Russian)]
51. Фомин В.А., Гузеев В.В. Биоразлагаемые полимеры, состояние и перспективы использования // Пластические массы. – 2001. – № 2. – С. 42-46.

52 . Mantelatto P.E., Nazareno A., Sertori D (2013) US Patent 8357508 B2. Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates (PHAs) from cellular biomass.

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

54. Singh S.C., Sinha R.P., Hader D.P. (2002) Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria. *Acta Protozoologica*, 41: 297–308.

55. Zhila N.O., Kalacheva G.S., Volova T.G. (2015) Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources. *Process Biochemistry*, 50: 69–78

ИСТОЧНИК

56. Жила, Н.О. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Н. О. Жила, Т. Г. Волова, Г. С. Калачева // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2014. - № 2. - С.161-173.

57. Калачева Г. С Состав жирных кислот липидов *Wautersia eutropha* в условиях активного синтеза полигидроксиалканоатов / Г. С. Калачева, Т. Г. Волова // Микробиология. Т 76. - 2007.- № 5. С.1-7

58. Султыгова А. К. Синтез биodeградируемых полимеров на основе полиэфиров /А. К. Султыгова, М. Б. Бекбузаров, Б. А. Темирханов, З. Х. Султыгова // Химия и химическое образование. XXI век. - 2014. - С. 158-161

59. Anis S. Increased recovery and improved purity of PHA from recombinant *Cupriavidus necator* S. N. S Anis, N. M. Iqbal, S. Kumar, A. Al-Ashraf // *Bioengineered*. - 2013. - № 4(2). - Pp. 115-118.

60. Gumel A. M., Annuar M. S. M., Chisti Y. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2013. – Т. 21. – №. 2. – С. 580-605.

61. Heinrich D. Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite / D. Heinrich, M. H. Madkour, M. A Al-Ghamdi², I.I. Shabbaj, A. Steinbüchel // *AMB Express*. - 2012. - № 2. - 6 P.

62. Neves A. Use of Enzymes in Extraction of Polyhydroxyalkanoates Produced / A. Neves, J.Müller // *Biotechnol Prog*. - 2012. - № 6. - Pp. 1575-1580

63. Muruga P. A new biological recovery approach for PHA using mealworm, *Tenebrio molitor* / P. Murugana, L. Hana, C-Y. Ganb, F. H.J. Maurerc, K. Sudesh // *Journal of Biotechnology*. - 2016. - №239. - Pp. 98-105.

64. Saharan B. S. Bioplastics-for sustainable development: a review / B. S. Saharan, A. and D. Sharma // *International Journal of Microbial Resource technology*. – 2012. – №. 1. – Pp 11-23.

65. Vizcaino-Caston I. Development of a rapid method to isolate polyhydroxyalkanoates from bacteria for screening studies / I. Vizcaino-Caston, C. A. Kelly, A. V. L. Fitzgerald, G. A. Leeke, M. Jenkins // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. - 2016. №. 1. - Pp. 101-104.

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

УТВЕРЖДАЮ
/ Заведующий кафедрой
Т.Г.Волова
« 19 » июня 20 17 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование параметров процесса термической сушки биомассы штамма
Cupriavidus eutrophus В 10646

тема

06.04.01 Биология

код и наименование направления

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель Барановский 19.06.17 доцент, к.т.н. С.В.Барановский

Выпускник Хвостова 19.06.17 С.А. Хвостова

Рецензент Кожухов 16.06.17 доцент, к.т.н. В.А.Кожухов

Красноярск 2017