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

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Волова
« _____» июня 20 ___ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Интенсификация процесса экстракции ПГА из биомассы бактерий

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

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

Выпускник _____ А.А. Шмидт

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

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме: «Интенсификация процесса экстракции ПГА из биомассы бактерий» содержит 62 страницы текстового документа, 10 иллюстраций, 8 таблиц, 4 формулы и 70 использованных источников.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОМАССА, ИЗМЕЛЬЧЕНИЕ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ, ЭКСТРАКЦИЯ, ПОЛИГИДРОКИАЛКАНОАТЫ, ПОЛИМЕР, *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS* B10646.

Цель работы: Интенсификация процесса экстракции биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 путем измельчения и фракционирования.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

1. Провести биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 и получить образцы биомассы для дальнейших исследований;

2. Исследовать процесс измельчения высушенной биомассы бактерий, получить фракции биомассы и установить их физико-химических свойства;

3. На основании полученных результатов исследований, предложить способ интенсификации процесса экстракции на производстве ПГА.

Актуальность исследования заключается отсутствии обоснованной методики подготовки биомассы к стадии экстракции. Ввиду этого, предложен новый способ подготовки биомассы бактерий *C. eutrophus* B-10646 к экстракции посредством измельчения и фракционирования. Данный метод позволит не только увеличить выход полимера, но и осуществить возможность эффективного использования всей бактериальной биомассы.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение..... 5

1 Обзор литературы..... 7

1.1 Полигидроксиалканоаты как альтернатива синтетическим полимерам. 7

1.2 Производство и стоимость ПГА на мировом рынке..... 8

1.3 Характеристика полигидроксиалканоатов..... 11

1.4 Методы экстракции полигидроксиалканоатов..... 17

1.4.1 Предварительная обработка бактериальной биомассы..... 18

1.4.2 Экстракция растворителями..... 19

1.4.2.1 Применение галогенсодержащих растворителей..... 20

1.4.2.2 Использование не галогенных растворителей..... 20

1.4.3 Химическое расщепление..... 23

1.4.4 Ферментативное расщепление..... 25

1.4.5 Механическое разрушение..... 25

1.4.6 Гомогенизация под высоким давлением..... 26

1.4.7 Сверхкритичниые флюиды..... 27

1.4.8 Биологическое извлечение ПГА..... 27

2 Объект и методы исследования..... 29

2.1 Биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646..... 29

2.1.1 Получение инокулята..... 29

2.1.2 Биосинтез бактерий в ферментере-инокуляторе..... 29

2.1.3 Сгущение и центрифугирование..... 30

2.1.4 Сублимационная сушка..... 30

2.2 Объект исследования..... 31

2.3 Методы исследования..... 31

2.3.1 Измельчение бактериальной биомассы..... 31
2.3.2 Фракционирование бактериальной биомассы..... 31
2.3.3 Определение влажности фракций бактериальной биомассы..... 32
2.3.4 Исследование минерального состава фракций бактериальной биомассы..... 33
2.3.5 Исследование состава жирных кислот липидов бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646..... 34
2.3.6 Определение количества экстрактивных веществ во фракциях в бактериальной биомассе..... 35
2.3.7 Выделение ПГА из фракций бактериальной биомассы..... 35
2.3.8 Термический анализ образцов полимера, выделенных из фракций бактериальной биомассы..... 36
2.3.9 Исследование молекулярно-массовых характеристики образцов полимера, выделенных из фракций бактериальной биомассы..... 36
2.3.10 Статистическая обработка результатов..... 36
3 Результаты..... 38
3.1 Размол и фракционирование бактериальной биомассы..... 38
3.2 Определение влажности бактериальной биомассы..... 39
3.3 Определение количества и состава экстрактивных веществ во фракциях бактериальной биомассы..... 41
3.4 Исследование выхода, молекулярно-массовые характеристики и термический анализ полимера во фракциях бактериальной биомассы.. 45
3.5 Исследование минерального состава бактериальной биомассы..... 48
3.6 Экономическое обоснование выбора метода измельчения и фракционирования..... 50
Заключения..... 53
Список использованных источников..... 54

ВВЕДЕНИЕ

Экологическим проблемам развития человеческого общества в настоящее время уделяется большое внимание такими организациями, как ООН, ЮНЕСКО, Российским обществом защиты прав потребителя и др. Одной из важнейших экологических проблем является утилизация твердых синтетических полимерных отходов, которые считаются наиболее токсичными, а, следовательно, экологически опасными. Синтетические пластмассовые отходы чрезвычайно медленно разлагаются и ассимилируются в естественных условиях (до 80 лет), являясь серьезным фактором загрязнения окружающей среды. Особую опасность представляет пластмассовая тара разового использования, сельскохозяйственные пленки различного назначения и упаковочные материалы, которые обычно не попадают в общую систему сбора, составляя так называемый пластмассовый мусор [21].

В общей сложности объем мирового производства пластмассы резко увеличился с 1,5 млн. тонн в 1950 году до 245 млн. тонн в 2008 году, ежегодный прирост составлял 9%. Из-за их универсальных свойств очень сложно сократить потребление пластмассовых изделий, но можно заменить пластмассы на основе нефти альтернативными материалами, которые имеют свойства, подобные полимерам, но разрушаемые после их выброса [32].

В этом плане, активно изучаемыми в настоящее время, в связи с их биоразрушаемостью, являются полигидроксиалканоаты (ПГА) - полиэфиры, синтезируемые микроорганизмами при лимитировании роста элементами конструктивного метаболизма [3].

Однако, сравнение ПГА с другими эквивалентными коммерциализированными материалами (например, синтетические полимеры или нефтехимические пластики) показывает, что ПГА достаточно дорогие

материалы [11].

Отчетные экономические анализы для различных систем промышленного производства показывали, что стоимость ПГА составляла от 2,65 до 5 долл США/кг, а получаемые из нефтехимического сырья пластмассы стоят около 1,57-1,67 долл/кг. Это несоответствие в расходах в значительной степени объясняется затратами на источник углерода для бактерий и последующую обработку. Так, по подсчетам, затраты на экстракцию и очистку ПГА составляют до 50 % от общих затрат на все технологические процессы [58]. На протяжении многих лет было разработано множество методов восстановления ПГА, но ни один из этих методов не привел к значительным экономическим улучшениям [70]. Кроме того, в настоящий момент нет обоснованной методики подготовки биомассы к стадии экстракции, которая позволила бы не только увеличить выход полимера, но и осуществить возможность эффективного использования всей бактериальной биомассы.

Цель работы: Интенсификация процесса экстракции биомассы бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 путем измельчения и фракционирования.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

1. Провести биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 и получить образцы биомассы для дальнейших исследований;

2. Исследовать процесс измельчения высушенной биомассы бактерий, получить фракции биомассы и установить их физико-химических свойства;

3. На основании полученных результатов исследований, предложить способ интенсификации процесса экстракции на производстве ПГА.

1 Обзор литературы

1.1 Полигидроксиалканоаты как альтернатива синтетическим полимерам

Полимеры, поддающиеся биологическому разложению, были разработаны несколько десятилетий тому назад, но их полномасштабное применение разворачивается только сейчас как в медицине, так и в быту [23].

Существует два основных типа биополимеров: полимеры, производимые биологическими системами (микроорганизмами) и химически синтезированные полимеры на основе биологического сырья (аминокислоты, сахара, жиры) [67]. Лидером по объемам выпуска среди разрушаемых биопластиков сегодня являются полилактиды - полимеры на основе молочной кислоты которую можно получать химическим и биотехнологическим способами. Помимо полилактидов, другим перспективным биопластиком рассматриваются полигидроксиалканоаты (ПГА) [5].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутри клеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода [11]. ПГА действует как идеальное соединение для хранения из-за его нерастворимости внутри бактериальной цитоплазмы и оказывает незначительное увеличение осмотического давления [27]. Было показано, что бактерии, содержащие полигидроксиалканоаты, могут выживать во время голодания по сравнению с теми, у кого нет ПГА, поскольку этот запас энергии замедляет клеточный автолиз и, следовательно, его смертность [34].

ПГА синтезируются в ходе сложного многоступенчатого

биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты [12]. Среди всех биопластиков они уникальны тем, что они полностью вырабатываются и разрушаются живыми клетками, а так же имеют широкий спектр использования [54, 34], например, для создания упаковок (контейнеры, пленки), средств личной гигиены (подгузники и т. д), печати (тонеры), электронных изделий (мобильные телефоны и др), а так же медицинских устройств (нити для швов, пластыри, ортопедические штифты, адгезионные барьеры, стенты, нервные направляющие, каркасы костного мозга и др.) [65, 35].

Способность к продукции ПГА обнаружена у 300 различных бактерий [49]. В общем, ПГА-продуцирующих бактерий можно разделить на две группы в соответствии с условиями культивирования, необходимыми для синтеза полимера. Первая группа требует ограничения основного питательного вещества(в). Бактерии этой группы включают *Cupriavidus necator, Rhodopseudomonas palustris* и *Methylobacterium organophilum*. Вторая группа синтезирует ПГА наряду с ростом в среде культивирования. Сюда можно отнести *Alcaligenes latus* и рекомбинантную *E. coli*, содержащие гены биосинтеза ПГА [25]. Так же в производстве полигидроксиалканоатов используют смешанные микробные культуры (ММС) [43], они не требуют стерильных условий и имеют более широкий метаболический потенциал, чем отдельные штаммы [37].

1.2 Производство и стоимость ПГА на мировом рынке

За рубежом продвижением и коммерциализацией технологий синтеза ПГА занимаются многие фирмы и компании в промышленно развитых странах. Основой для развития этого направления работ являются колебания цен на нефть с прогнозируемой исчерпаемостью ее запасов, что в конечном счете должно заставить человечество перейти на экологически чистые полимерные

материалы, получаемые за счет возобновляемых ресурсов [9].

Среди активных разработчиков процессов производства ПГА – различные фирмы, компании и корпорации, включая Монсанто Ко, Metabolix Inc., Tepha, Procter & Gamble, Berlin Packaging Corp., Bioscience Ltd., BioVentures Alberta Inc., Merck, выпускающие полимеры под марками Biopol®, BiopolTM, TephaFLEXTM, DegraPol/btc®, NodaxTM (таблица 1) [19].

Таблица 1 – Зарубежные компании, ориентированные на производство ПГА [9].

Компания	Типы ПГА	Масштаб производства (т/год)	Период времени	Применение
«ICI» (Великобритания)	ПЗГБ/ЗГВ)	300	1980-1990 гг.	Упаковка
«Chemie Linz» (Австрия)	П(ЗГБ)	20-100	1980-е гг.	Упаковка, доставка лекарств
«Biomers» (Германия)	П(ЗГБ)	Неизвестно	1990-е гг. до настоящего времени	Упаковка, доставка лекарств
«BASF» (Германия)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	Пилотный масштаб	1980-е гг. до 2005 г.	Смешивание с Ecoflex
«Metabolix» (США)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	Неизвестно	1980-е гг. до настоящего времени	Упаковка
«Tepha» (США)	Различные ПГА, в т.ч. ПЗГБ/4ГБ)	Неизвестно	1990-е гг. до настоящего времени	Медицинские бноимпланты|
«ADM» (США) (с «Metabolix»)	П(ЗГБ), ПЗГБЗГВ)	50 000	с 2005 до настоящего времени	Сырье
«P&G» (США)	Среднецепочечные ПГА	Изготавливает по контрактам	1980-е гг. до настоящего времени	Упаковка
«Meredian» (США)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	10 000	с 2007 г. до настоящего времени	Сырье

«Канека» (Япония) (с P&G)	П(ЗГБ), ПЗГБ/ЗГВ)	Неизвестно	1990-е гг. до настоящего времени	Упаковка

Окончание таблицы 1

Компания	Типы ПГА	Масштаб производства (т/год)	Период времени	Применение
«Mitsubishi» (Япония)	П(ЗГБ)	10	1990-е гг.	Упаковка
«Biocycles» (Бразилия)	П(ЗГБ)	100	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Bio-On» (Италия)	ПГА	10 000	с 200S до настоящего времени	Сырье
«Zhejiang Tian Ап» (Китай)	ПЗГБ/ЗГВ)	2 000	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Jiangmen Biotech Ctr» (Китай)	П(ЗГБ/ЗГГ)	Неизвестно	1990-е гг.	Сырье
«Yikeman. Shandon» (Китай)	П(ЗГБ)	3 000	с 2005 г. до настоящего времени	Сырье
«Tiangin Northen Food» (Китай)	П(ЗГБ)	Пилотный масштаб	1990-е гг.	Сырье
«Shantou Lianyl Biotech» (Китай)	Различные ПГА	Пилотный масштаб	1990-е до 2005	Упаковка н медицина
«Jian Su Nan Tian» (Китай)	П(ЗГБ)	Пилотный масштаб	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Shenzhen OBioer» (Китай)	Различные ПГА	Неизвестно	с 2004 г. до настоящего времени	Неясно

Производства ПГА на сегодняшний день осваивают или планируют практически все развитые страны, однако решающим для начала широкомасштабного получения и применения является снижение их стоимости [4]. К примеру, из-за относительно высокой стоимости производства по

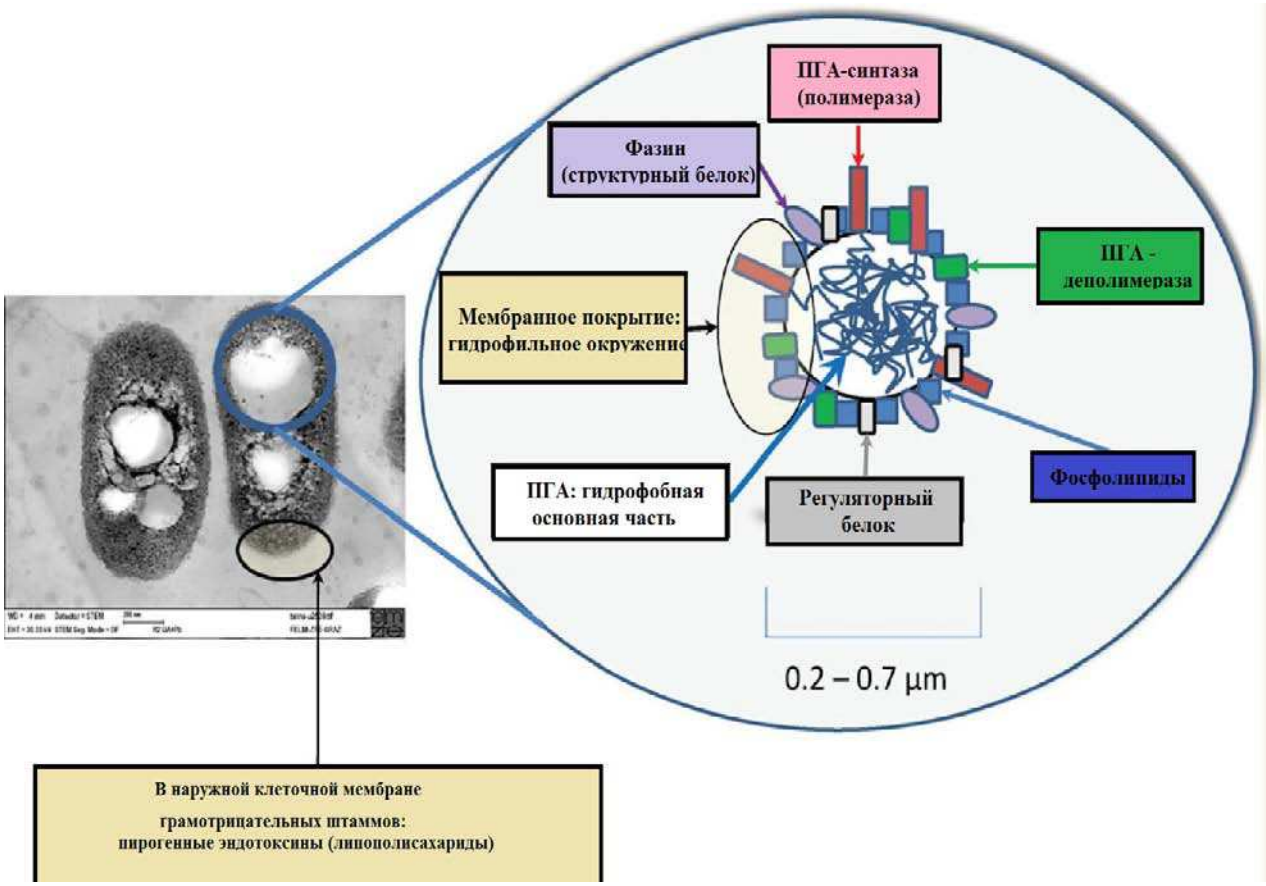
сравнению с синтетическими пластмассами на основе нефти и отсутствием высококачественного рынка, несколько компаний остановили или продали предприятия по производству ПГА, в том числе ICI [36]. В настоящее время, ориентировочная себестоимость ПГА (по данным пилотного производства) варьирует в пределах 2,3 - 4,1 тыс. руб./кг [17]. Невысокую цену за 1 кг ПГА предлагает китайская компания Ningbo Tianan Biologic Material (35$ за кг), однако продажа осуществляется с 10 кг ПГА. Крупная компания Metabolix продаёт полимер M4300 за цену в 250$ за упаковку в 0,5 кг. Немецкая компания Biomer продаёт 0.8 кг ПГА за 60 евро. Остальные поставщики продают ПГА от 7,7 до 19 т. руб. за упаковку в 100 г.

На технико-экономические показатели процесса производства ПГА влияют многие факторы, в том числе скорость роста и продуктивность микробных штаммов, конечная концентрация полимера в биомассе, затраты и стоимость сырья. Так же, существенную роль в общей стоимости ПГА играет способ его выделения из клеточной биомассы. При его выборе необходимо учитывать затраты на реагенты и эффективность извлечения. Экономические оценки показали, что затраты на выделение ПГА значительно уменьшаются с увеличением содержания полимера в клетке [57]. 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 [19].

Разработка эффективных методов выделения полимера из биомассы позволит при большой производительности снизить стоимость ПГА до 3–4 $ США за 1 кг, что соизмеримо со стоимостью известных биополимеров, таких как полилактиды и алифатические полиэфиры [19].

1.3 Характеристика полигидроксиалканоатов

Наблюдения за бактериальными клетками, содержащими ПГА, через микроскоп, показало, что полиэфиры проявляют себя как сильно преломляющие цитоплазматические гранулы с диаметром обычно 0,2-0,7 мкм, и состоят из ПГА (97,7%), белков (1,8%) и фосфолипидов (0,5%). Ядро гранулы, состоящее из цепей ПГА, окружено мембраной из липидов и белков: эта мембрана регулирует взаимодействия между аполярным полимерным центром и его водным окружением (рисунок 1). Что касается белков: ПГА-синтаза (катализ полимеризации структурных блоков ПГА, непосредственно связанных

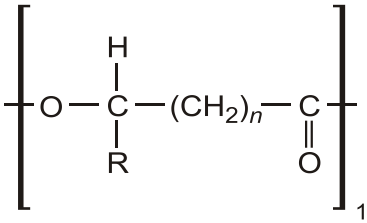


с полимером), деполимераза ПГА (катализ мобилизации внутриклеточного пула ПГА, не связанный непосредственно с полимером), фазины (структурные белки, действующие как «граничные соединения» между ядром гидрофобных гранул и гидрофильным внутренним пространством, способствуют биосинтезу ПГА и влияют на размер гранул) [52].

Рисунок 1 - Схема структуры гранул ПГА, указывающая их расположение

в микробных клетках и наиболее значимых составляющих гранул мембран (фосфолипиды, ферменты). Кроме того, показано расположение пирогенных липополисахаридов (ЛПС), действующих как эндотоксины в наружной клеточной мембране грамотрицательных микробов [52].

Основные структуры полигидроксиалканоатов можно иллюстрировать следующим образом:



(1)

где $n = 1$ R = водород – поли (3-гидроксипропионат),

R = метил – поли (3-гидроксибутират),

R = этил – поли (3-гидроксивалерат),

R = пропил – поли (3-гидроксигексаноат),

R = пентил – поли (3-гидроксиоктаноат),

R = нонил – поли (3-гидроксидодеканоат),

$n = 2$ R = водород – поли (4-гидроксибутират),

$n = 3$ R = водород – поли (5-гидроксивалерат) [4,64].

Исходя из длины углеродной цепи оксикислот, образующих полимеры, полигидроксиалканоаты подразделяют на три основные группы:

1) короткоцепочечные (short-chain-length, SCL, $ПГА_{кц}$), состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;

2) среднецепочечные (medium-chain-length, MCL, $ПГА_{сц}$), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;

3) длинноцепочечные (long-chain-length, LCL, $ПГА_{дц}$) состоящие из

мономеров с длиной С-цепи свыше 14 атомов углерода [24,8].

Полигидроксиалканоаты так же могут включать различный набор мономеров, что обусловливает широкий спектр их физико-химических свойств – от высококристалличных термопластов до резиноподобных эластомеров [2, 33].

ПГА разделяют на следующие типы: полигидроксибутират (ПГБ), полигидроксивалерат (ПГВ), полигидроксигексаноат (ПГГ) и полигидроксиоктаноат (ПГО) [59]. Среди них, наиболее изученными представителем является: гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты – поли(3гидроксибутират) (П3ГБ) – высококристалличный термопласт (степень кристалличности свыше 70%), недостатком П3ГБ является то, что он не кристаллизуется упорядоченно, его весьма сложно перерабатывать в изделия, которые характеризуются низкой ударной прочностью, жесткостью и “старятся” во времени [6], далее идёт его сополимер П(3ГБ/3ГВ), самыми малоизученными образцами являются сополимеры П(3ГБ/3ГГ), П(3ГБ/4ГБ), а также новые многокомнонентные типы ПГА [10]. Получение сополимеров П3ГБ, возможно при культивирование *C. eutrophus* B10646 на смешанном углеродном субстрате (глюкоза+валерат калия), что обеспечивает получение сополимеров 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот (П3ГБ/3ГВ) [C(C_2H_5)C_2C]n. Синтез сополимеров 3-гидроксибутирата/3-гидроксигексаноата (П3ГБ/3ГГ) [OC(C3H7)C_2C]$_n$ вследствие более высокой токсичности для бактерий гексаноата – трудно реализуемая задача. В автотрофной культуре при добавлении гексаноата в среду возможно получение образцов П3ГБ/ГГ с включением 3ГГ до 5-10 мол.%. Гетеротрофный режим на глюкозе с добавлением в культуру, помимо гексаноата калия, акрилата – ингибитора кетотиолазы, фермента, расщепляющего С-цепи мономеров, в частности гексаноата, позволяет получать более широкую линейку сополимеров П3ГБ/3ГГ [18].

Синтез ПГА в общих чертах сходен у различных микроорганизмов, но

наиболее изучены пути синтеза полигидроксибутирата (ПГБ) у типового штамма *Ralstonia eutropha* H16 в различных условиях несбалансированного роста. Биосинтез ПГБ начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА до ацетоацетил-КоА, восстанавливающийся затем до D(-)-3-гидроксибутирил-КоА и далее включающийся в полимерную цепь. Все эти этапы катализируются в основном тремя ферментами: *β*-кетотиолазой, НАДФН зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазой и ПГБ-полимеразой (синтазой) [44]. Факторы, регулирующие их активности на генетическом и молекулярном уровнях, интенсивно изучаются, и считается, что *β*-кетотиолаза запускает синтез полимера, редуктаза регулирует скорость синтеза ПГБ, а синтаза отвечает за качественные характеристики полимера (молекулярный вес, мономерный состав) и конечный выход ПГА. Однако процесс формирования полимера достаточно сложен и определяется не только ферментами синтетической ветви цикла ПГА, но и другими аспектами полимерного метаболизма. Не менее важной представляется роль ферментов деполимеризующей ветви цикла ПГА, которые могут регулировать как молекулярный вес ПГА, так и его конечный выход [12].

Одним из наиболее важных макроскопических параметров, характеризующих свойства полимеров является молекулярная масса, так как определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. Молекулярная масса ПГА является весьма изменяющимся параметром, величина которого зависит от многих факторов, включая источник углеродного питания для бактерий, длительность культивирования, технику экстракции полимера [5], так же молекулярную массу полимера можно контролировать с помощью использования специфических ферментов ПГА-синтазы [68].

Число мономерных звеньев, входящих в состав различных молекул одного и того же полимерного вещества различно, вследствие чего молекулярная масса макромолекул полимера также неодинакова. Поэтому при характеристике полимеров обычно говорят о среднем значении молекулярной

массы. В зависимости от способа усреднения - принципа, лежащего в основе метода определения молекулярной массы, различают три основных типа средних молекулярных масс.

Среднечисловая молекулярная масса (M_n) - суммарная масса всех молекул полимера в образце, поделенная на общее количество молекул полимера в этом образце.

Средневесовая молекулярная масса (M_w) - усреднение по массе макромолекул в полимере.

Молекулярно-массовое распределение (ММР) полимера (или его полидисперсность) - является одной из важнейших характеристик высокомолекулярных соединений, которая отражает кинетический процесс полимеризации и определяет эксплуатационные характеристики полимеров, предсказывая пути его переработки [13] и определяется соотношением M_w/M_n. ММР оказывает существенное влияние на физические характеристики полимеров, и прежде всего на механические свойства.

Молекулярная масса может различаться в зависимости от культивируемого организма, условий роста и способа экстракции [29]. ПГА представляют собой полиэфиры с высокой молекулярной массой, обычно в диапазоне 100-1000 кДа [31]. Повышенное содержание высокомолекулярных фракций в полимере сообщает ему более высокие прочностные характеристики, повышенную твердость и температуростойкость. Начало пластического течения таких полимеров, смещается в область более высоких температур. Полимеры с большим содержанием низкомолекулярных фракций имеют низкие прочностные параметры и в целом характеризуются худшими механическими свойствами. Средняя молекулярная масса и молекулярно-массовое распределение являются важными контрольными величинами при получении полимеров с нужными механическими свойствами [20].

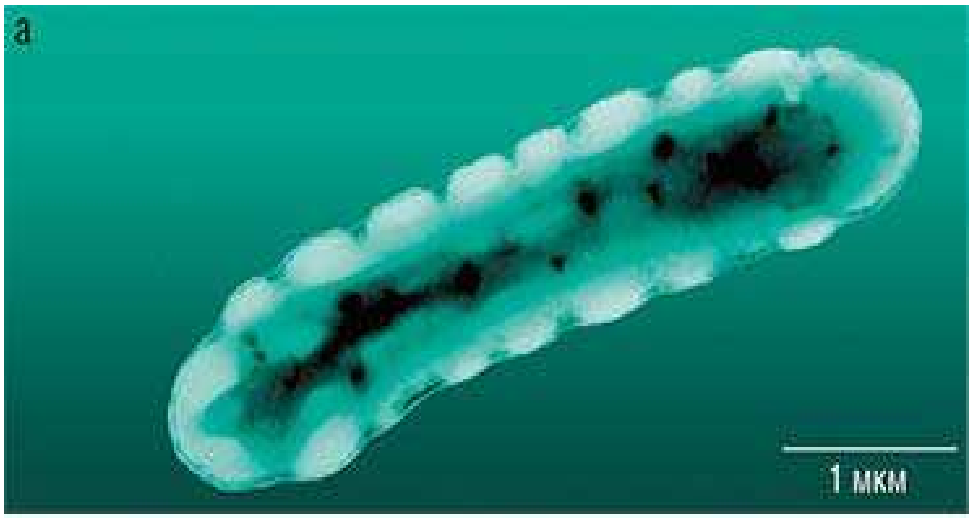
Температурные характеристики ПГА и способность кристаллизоваться в нативном состоянии являются значимыми параметрами, так как определяют

термомеханические свойства и, следовательно, возможности переработки из расплавов полимера. У ПГА, аналогично многим полимерным материалам, температура, при которой происходит их деформация, несколько ниже температуры кипения (температурной деградации), поэтому газовое состояние в полимерах не реализуется и основным видом фазового равновесия в них является конденсированное состояние - кристаллическое, стеклообразное, вязкотекучее и жидкое. Способность ПГА кристаллизоваться определяется внутренними свойствами его цепей и характеризуется температурой кристаллизации ($Т_{крист}$). Во многих полимерах кристаллизация обычно осуществляется, но из-за ряда причин она зачастую захватывает не весь объем материала. Поэтому в большинстве случаев полимеры представляют из себя полукристаллические объекты. Именно к таким полукристаллическим материалам относятся ПГА.

Наличие выраженного диапазона между температурой начала плавления и температурой начала разложения является существенно важным технологическим свойством полимера, так как делает возможным получение на его основе изделий (пленок, нитей, полых форм и пр.) общепринятыми методами переработки полимерных материалов (формованием из раствора, экструзией, литьем под давлением) [5].

1.4 Экстракция полигидроксиалканоатов

Как говорилось выше, ПГА накапливается в виде гранул в цитоплазме бактериальных клеток (рисунок 2). Средний размер гранул ПГА составляет



приблизительно 0,2-0,7 мкм [56] .

Рисунок 2 - Водородная бактерия в режиме накопления биополимеров [7].

Для извлечения гранул ПГА необходимо разрушить бактериальную клетку и удалить слой белка, покрывающий гранула ПГА [56]. Так, как ПГА является внутриклеточным продуктом, поэтому методы, используемые для его извлечения, фокусируются либо на его солюбилизации, либо на солюбилизации неполимерных клеточных материалов (НПКМ) [63]. НПКМ состоящие из нуклеиновых кислот, липидов, фосфолипидов, пептидогликана и белковых материалов, так же будут отделены от полимера в процессе извлечения [28].

Существует много различных стратегий для извлечения ПГА из бактериальных клеток. Они включают экстракцию органическими растворителями; обработку биомассы растворами щелочей, кислот, детергентов, ферментами, а также их различные сочетания [15].

В следующем разделе описываются все эти методы, а так же их преимущества и недостатки.

1.4.1 Предварительная обработка биомассы

В большинстве случаев, независимо от применяемого экстракционного растворителя, микробная биомасса должна быть подвергнута стадии сушки перед экстракцией полимера. Это можно сделать либо путем лиофилизации (сублимационной сушки) биомассы, либо путем обработки в печи. Остатки воды в биомассе препятствовали бы эффективности процесса экстракции, что приводило бы к гидролитическому дефициту молекулярной массы ПГА [52]. Что касается затрат на коммерческое производство ПГА, сушка в печи требует значительно меньшего капитала, чем лиофилизация, которая более сложна в отношении необходимого оборудования [48].

После высушивания, предварительная обработка биомассы путем

перемешивания или промывки слабыми полярными растворителями, такими как метанол, этанол или ацетон, часто оказывается полезной для удаления липидов из биомассы, в результате чего образуется чистый, пахучий и бесцветный продукт, кроме того, такая обработка ослабляет клеточную стенку, что облегчает последующую экстракцию растворителем. Повторное растворение и осаждение полимера резко повышает чистоту окончательно полученного продукта [52].

Кроме обезвоживания биомассы важной стадией является разрушение клеточных стенок. В настоящее время для разрушения клеточной стенки используют различные методы: обработка биомассы ферментами [51], ультразвуком, применение дисковых дезинтеграторов [19].

В качестве предварительной обработки биомассы исследовано влияние гамма-облучения на влажные клетки *B. flexus*. Это облучение приводит к разрушению бактериальных клеток и облегчает отделение ПГА от НПКМ. Модификация полимера ионизирующим излучением имеет преимущества перед химическими модификациями. Преимуществами гамма-облучения ПГА-содержащих клеток являются: оптимальное разрушение клеток при низкой дозировке облучения; более легкая экстрагируемость полимера; улучшение свойств полимера; сохранение растворимости в растворителе из-за низкой степени сшивания. Например, после гамма-облучения (10 кГр) из бактериальных клеток, после экстракции хлороформом в условиях комнатной температуры и в течении короткого периода времени, на выделенный ПГА пришлось 54% (в расчете на сухую массу биомассы). Однако, при экстракции ПГА хлороформом при 37 °C в течении 2 ч из не облученных клеток, на долю ПГА пришлось всего 18-20% (в расчете на сухую массу биомассы) [39].

Основными препятствиями этого метода являются продолжительность времени облучения и первоначальные инвестиционные затраты, которые препятствуют крупномасштабным применениям. Использование гамма-облучения должно быть тщательно изучено, чтобы доказать его эффективность

[56].

1.4.2 Экстракция растворителями

1.4.2.1 Применение галогенсодержащих растворителей

Экстракция растворителем является наиболее широко применяемым методом извлечения ПГА из клеточной биомассы. Этот метод также регулярно используется в лабораториях из-за его простоты и быстроты. В нем участвуют две основные стадии: во-первых, это изменение проницаемости клеточной мембраны, что позволяет высвободить и солюбилизировать ПГА. Затем следует его нерастворимое осаждение [56].

При комнатной температуре типичные галогенированные экстракционные растворители, такие как хлороформ [55, 38, 26] или, в меньшей степени, дихлорметан (метиленхлорид) [15], полихлорированный этан (1,2-дихлорэтан, 1,1,2 -трихлорэтан, 1,1,2,2-тетрахлорэтан) применяют для экстракции коротко- и среднецепочечных ПГА. Тетрахлорэтан является наилучшим растворителем ПГА, однако, его применение нежелательно вследствие высокой токсичности (сильный почечный и печеночный яд); предельно допустимая концентрация паров в воздухе 0,001 мг/м^3. [15]. После экстракции ПГА растворимость полиэфира резко сводится к минимуму путем добавления «антирастворителя ПГА», обычно низкомолекулярных спиртов (главным образом этанола или метанола), гексана, эфира, ацетона или воды. Это приводит к осаждению высокоочищенного ПГА [52, 47].

Вредность, особенно хлороформа, является основным недостатком этого метода [52].

1.4.2.2 Использование не галогенных растворителей

Как упоминалось выше, применение галогенных органических

растворителей, особенно хлороформа, представляет высокую опасность для здоровья. В настоящее время, важно сосредоточить исследования на растворителях, которые бы не проявляя никакой биоопасности, как пример можно привести биоэфирные молочнокислые эфиры (этил- и метиллактат). Так же, необходима оптимизация условий экстракции (температуры и продолжительности), для того что бы предотвратить потери в молекулярной массе полимера. В качестве негалогенированных растворителей для экстракции ПГА являются уксусная кислота, ангидрид уксусной кислоты, n-метилпирролидон и тетрагидрофуран). Короткоцепочечные сополимеры ПГА с низкой кристалличностью также можно экстрагировать с использованием эфиров уксусной кислоты и низкомолекулярных кетонов, такими как ацетон, метил-изобутилкетон или циклогексанон.

Koller et al. предложили использовать для экстракции $ПГА_{кц}$ ацетон под высоким давлением выше точки кипения растворителя. Они использовали специальное оборудование состоящее из цилиндрического «экстракционного блока (ЭБ)», «фильтрационной установки», цилиндрического «осадителя» и соединительные трубы. Чтобы выдерживать высокое давление во время процесса, оборудование плотно закрывали, используя уплотнительные кольца круглого сечения, состоящие из ацетон-стойкого материала. Лиофилизированную порошкообразною биомассу, загружали в экстракционный блок, содержащий 700 мл ацетона, нагретого до 120 °С и в течение 20 мин непрерывно перемешивали. ЭБ оснащен температурным зондом и манометром для контроля условий экстракции. При температуре 120 °С и давлении 7 бар, ПГА полностью растворяется в ацетоне. Перед нагреванием, из ацетона необходимо удалить кислород, промывая всю систему газообразным азотом. Это необходимо, потому что в экстремальных условиях, ацетон и кислород могут создать взрывоопасную смесь. После экстракции раствор фильтруют от НПКМ и осаждают ПГА из растворителя путем охлаждения до 4 °С. Данный метод определяет выход полимера 96,8 % с чистотой 98,4%, без отрицательного

влияния на структурные особенности полимера. Представленное устройство предназначено для экстракции в лабораторных масштабах, но подобные системы могут быть легко разработаны для крупномасштабного производства. Так же необходимо принимать во внимание меры предосторожности, принимая во внимание удаление кислорода из общей системы [53].

Что касается среднечепочечных ПГА, то эта группа проявляет достаточную растворимость в значительно большем количестве растворителей, чем короткоцепочечные представители этого семейства. Ацетон, тетрагидрофуран или диэтиловый эфир растворяют среднецепочечные ПГА уже при комнатной температуре [52].

Для экстракции ПГА из *Cupriavidus necato*r в качестве альтернативы галогенным растворителям было предложено использовать 1,2-пропиленкарбонат. Высокая температура кипения (240 °C) 1,2-пропиленкарбоната предотвращает испарение в окружающую среду при более низких температурах и позволяет повторно использовать его в течение нескольких циклов очистки. Это может снизить расход растворителя, и поэтому он считается экономически выгодным. Кроме того, 1,2-пропиленкарбонат считается безопасным из-за его низкой токсичности [56]. Fiorese et al. [40] сообщали, что при использовании 1,2-пропиленкарбоната максимальный выход ПГА составляет 95% и чистота 84% при экстракции из клеток *C. necato*r при 130 °C в течение 30 мин без предварительной обработки. Это сопоставимо со значениями, полученными при экстракции хлороформом (выход 94% и чистота 98%).

Mohammadi et al. предложили метод экстракции ПГА с использованием воды и этанола. Лиофильно высушенные бактериальные клетки выдерживали в дистиллированной воде при различных температурах (4 и 30 °C) и времени инкубации (1, 3 и 5 ч). Гранулы ПГА отделяли от водной фракции, содержащей НПКМ, центрифугированием в 15000 g в течение 20 мин при 4 °C. Осадок, содержащий полимер, смешивали с 1% (v/v) этанолом (96% v/v), перемешивали

при 200 об/мин в течение 3 часов и 30 °C и центрифугировали при 15000× g в течение 10 минут при 4 °C. Осадок, содержащий ПГА, промывали дистиллированной водой, повторно центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин при 4 °C и замораживали для дальнейшего анализа. Данный метод позволяет получать 96 % выход ПГА с чистотой в 81% (что является невысоким показателем, по сравнению с экстракцией хлороформом), но несмотря на невысокие показатели чистоты, молекулярная масса полимера не нарушается. Этот метод может быть разработан для промышленного производства, как более экологически чистый, по сравнению с другими известными экстракциями [60].

Так же, разработан метод, с использованием диметилсульфоксида (ДМСО) в качестве нетоксичного экстрагента. ДМСО является апротонным растворителем (не устанавливает водородных связей), смешивается с полярными растворителями, может легко проходить через биологические мембраны. Эти свойства делают ДМСО потенциальным растворителем для экстракции ПГА из бактерий. Следует, однако, отметить, что этот метод экстракции не пригоден для крупномасштабного производства. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы удалить остаточный ДМСО из ПГА устраняя образование диметилсульфида [66].

1.4.3 Химическое расщепление

Оценены различные методы химического расщепления для выделения ПГА из клеточной биомассы. В нем в основном используют гипохлорит натрия или поверхностно-активные вещества. Оценен ряд поверхностно-активных веществ, таких как додецилсульфат натрия (SDS), Triton X-100, пальмитоилкарнитин и бетаин. Так как качество ПГА, полученного с использованием либо поверхностно-активного вещества, либо гипохлорита натрия, не достаточно высоко, была использована комбинация поверхностно-активных веществ с гипохлоритом натрия [56]. После предварительной

обработки поверхностно-активными веществами, такими как Triton X-100, ПГА-содержащая биомасса может быть дезинтегрирована с использованием гипохлорита натрия при высоком значении pH. Большинство клеточных компонентов окисляются гипохлоритом и становятся водорастворимыми [52] Выделенные гранулы ПГА путем обработки только поверхностно-активными веществами проявляли более низкую степень чистоты, но имели несколько более высокую молекулярную массу, чем с применением гипохлорита натрия. Напротив, ПГА более высокой чистоты получали с использованием гипохлорита натрия, но с сильной деградацией молекулярной массы до 50%. Последовательная обработка поверхностно-активным веществом - гипохлоритом способствовала лучшему и быстрому извлечению ПГА и привела к 50% снижению общей стоимости по сравнению с экстракцией растворителем. Вдобавок, гипохлорит натрия не является летучим или горючим и поэтому требует меньших мер безопасности, чем большинство растворителей [45]. Тем не менее низкие эксплуатационные затраты [50] и техническая простота этого процесса дополняются сложными и нерешенными проблемами, вызываемыми трудностью очистки сточных вод от поверхностно-активных веществ и относительно высокой стоимостью химических агентов. Кроме того, применение гипохлорита для растворения НПКМ всегда несет риск образования токсичных галогенированых соединений, а так же довольно трудно полностью удалить остатки гипохлорита из ПГА.

Другим методом является селективное растворение НПКМ бактериальной клетки протонами. Этот метод состоит из нескольких этапов, но наиболее важным является солюбилизация НПКМ в кислом растворе для высвобождения частично кристаллизованных гранул ПГА, затем суспензию подвергают обесцвечиванию в отбеливающем растворе. Этот метод был заявлен, для снижения стоимость извлечения ПГА, т.к в нем используются более дешевые химикаты с более высокой эффективностью восстановления. Сообщалось, что гранулы П(3ГБ), полученные этим способом, являются

высококристаллическими [56].

1.4.4. Ферментативное расщепление

Процесс извлечения ПГА с использованием ферментов включает довольно сложную процедуру. Солюбилизация НПКМ, обычно состоит из термообработки, ферментативного гидролиза и промывки поверхностно-активными веществами [56]. На сегодняшний день оценено влияние на лизис клеток многих типов ферментов, особенно протеаз [69]. Так ка, условия экстракции оказывают большое влияние на деградацию ПГА в процессе извлечения, то после испытаний, проведенных для выбора лучшего фермента, необходимо провести эксперименты для определения pH, температуры, концентрации фермента и времени гидролиза, что привело к повышению эффективности экстракции полимера [62]. Lakshman and Shamala в своем эксперемете для секреции протеазы использовали культуру Microbispora sp.. Microbispora sp. вводили в биомассу *S. meliloti* и инкубирувалив течение 72 часов. Клетки *S. meliloti* гидролизуются под дейтсвием протеазы, что приводит к высвобождению внутриклеточных компонентов вместе с гранулами ПГА. Затем культуру, содержащую лизированные клетки, подвергали процессу простой фильтрации, и ПГА с чистотой 94% извлекали, используя экстракцию хлороформом [56].

Поскольку ферменты очень специфичны в отношении катализируемых ими реакций, можно ожидать извлечения ПГА с хорошими свойствами. Тем не менее, высокая стоимость ферментов и сложность процесса извлечения перевешивают его преимущества [51].

1.4.5 Механическое разрушение

Механическое разрушение клеток широко используется для высвобождения внутриклеточного белка. Эта концепция так же была протестирована для извлечения ПГА из бактериальных клеток [56]. Среди различных механических методов разрушения, таких как размол в шаровой мельнице и гомогенизации под высоким давлением механическое разрушение лидирует в фармацевтической и биотехнологической промышленности [30]. В отличии от многих методов экстракции механическое разрушение клеток не связано с химическими веществами, поэтому оно минимизирует загрязнение окружающей среды и загрязнение получаемых продуктов. В общем, недостатками данного метода может оказаться высокая стоимость капитальных инвестиций, длительное время обработки и трудности в крупнотонажном производстве [56].

1.4.6 Гомогенизация под высоким давлением

Применение высокого давления является широко известным и применяемым механическим метотодом. Используя гомогенизатор высокого давления (ГВД), надо понимать, что на эффективность разрушения влияют физиологические параметры микробной клетки, а именно тип и фаза роста микроорганизмов, а также концентрация клеток биомассы (при низких концентрациях метод работает на эффективно) [52]. Как правило, грамположительные бактерии сложнее разрушать по сравнению с грамотрицательными бактериями.

Использование гомогенизации под высоким давленинем в присутствии додецилсульфата натрия для извлечения ПГА из Methylobacterium sp. V49 описан в литературе. В результате, максимальный выход ПГА составлял 98% при чистоте продукта 95%. Эти результаты получены с использованием 5% раствора додецилсульфата натрия и при давлении в 400 кг/см^2 для ГВД [41].

К недостаткам, связанным с гомогенизацией под высоким давлением,

относятся возможность термической деструкции целевых продуктов и образование мелких клеточных остатков, которые будут мешать дальнейшей последующей обработке ПГА [56].

1.4.7 Сверхкритичниые флюиды

Сверхкритические флюиды (SCF) появились как метод потенциальной экстракции в области извлечения ПГА. Уникальные физико-химические свойства SCF, такие как высокая плотность и низкая вязкость, сделали их подходящими экстракционными растворителями. Сверхкритический углекислый газ (SC-CO_2) является наиболее используемым SCF из-за его доступности, низкой токсичности, реакционной способности, умеренной критической температурой и давлением (31 °C и 73 атм), низкой стоимости и негорючести [15]. Используя этот метод, было сообщено, что из *C. necator* при давлении в 200 атм, при 40 °C и 0,2 мл метанола полнота извлечения П(3ГБ) составляла 89 % [46].

1.4.8 Биологическое извлечение ПГА

В качестве еще одного энергосберегающего метода экстракции предлагается использовать мучных червей *Tenebrio molitor.* В данном эксперементе, лиофильно высушенные бактериальные клетки *C. necator.* С уже синтезированным ПГА используют в качестве корма для червей *Tenebrio molitor.* Мучные черви содержались в пластиковых контейнерах при температуре окружающей среды. Белесые фекальные гранулы, выделяемые червями, собирали, просеивали с использованием сита 0,5 мм и сушили в течение ночи в сушильном шкафу при 60 °C. последующим восстановлением полимера из фекалий. Собранные фекальные гранулы с ПГА, подвергали последующей очистке с использованием воды или 1% (w/v) SDS (без нагревания и при 50 °C). Соответствующие растворы (объем раствора: фекальный осадок в соотношении

5:1) перемешивали с использованием магнитной мешалки при 250 об/мин при комнатной температуре до 10 часов. Наконец, фекальные пельмени промывали 0,001 н. HCl. Затем полученный осадок переносили в чистую чашку Петри и сушили в течение ночи в печи при 60 ° C.

Биологически извлеченные гранулы ПГА, промытые водой, получали с чистотой 89 %. Чистота гранул ПГА достигала 100 %, когда их обрабатывали 1% SDS и 1 % SDS при 50 °C.

Было признано, что мучные черви являются подходящим альтернативным источником белка для кормов аквакультуры и птицы. Таким образом, мучные черви, которые использовались для биологического извлечения ПГА, могут быть использованы в качестве корма для животных. Однако для подтверждения пищевой ценности мучных червей, питаемых клетками *C. necator*, необходимо провести дополнительные исследования.

Необходимы дальнейшие исследования направленные на оптимизацию процесса и определение возможности этого биологического метода экстракции в промышленном масштабе [61].

Глава 2. Объект и методы исследования

2.1 Биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646

2.1.1 Получение инокулята

Исследован штамм водородокисляющих бактерий, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов: *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (прежнее систематическое название *Ralstonia eutrophus*)

Музейную культуру *Cupriavidus eutrophus* B10646, хранящуюся на скошенной агаризованной среде в холодильнике «Бирюса» (плюс 5 °С), смывали с поверхности среды (2 пробирки) в колбу КН-1-2000 с полной средой Шлегеля: $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 0.2; $Fe_3C_6H_5O_7 \cdot 7H_2O$ – 0.025; NH_4Cl – 1 (г/л) [1,11]. Микроэлементы вводили по прописи Хоагланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0.288; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.030; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.08; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0.008; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.176; $NaMoO4 \cdot 2H_2O$ – 0.050; $NiCl_2$ – 0.008 (г/л) [11]. Оптическая плотность исходного инокулята (без разведения), не менее 0,1 (440 нм). Все работы велись с соблюдением асептики. Колбу закрывали стерильной ватно-марлевой пробкой и размещали в шейкере инкубаторе Innova 44. Инкубирование проводили в течение 20±2 ч при температуре плюс 30±0,5 °С до получения оптической плотности не менее 0,2 [1].

2.1.2 Биосинтез бактерий в ферментере-инокуляторе

Полученный инокулят стерильно подавали в ферментер-инокулятор NLF 22 Bioengineering AG (Швейцария), в котором уже находится приготовленная среда в количестве 10 л. Процесс выращивания биомассы в ферментёре-инокуляторе длится 12 ч в режиме хемостата. Это позволяет получить необходимое для засева производственного аппарата количество инокулята. Полученный инокулят по стерильной посевной линии поступает в производственный ферментёр объёмом 6000 л. Культивирование осуществляется в две стадии. На первой стадии происходит накопление биомассы в течение 24 ч до концентрации 40–50 г/л. На данном этапе используются подпитывающие растворы солей азота и глюкозы. Коррекция концентрации основных питательных субстратов (глюкоза, карбамид) производится аппаратчиком с помощью перистальтических насосов. На второй стадии лимитируют подачу азота. В этот момент концентрация клеток перестаёт увеличиваться, а содержание полимера в клетках растёт [16].

В процессе культивирования подаются сжатый очищенный воздух, вода, пар, происходит контроль за концентрацией: глюкозы, азота, O_2, pH, температуры, оборотом мешалки.

2.1.3 Сгущение и центрифугирование

Для сгущения бактериальной биомассы до ~300 г/л использовали ультрафильтрационную установку «ВЛАДИСАРТ» тангенциальной ультра- и микрофильтрации на базе АСФ-020 ЗАО «Владисарт» (Россия). Центрифугирование проводили в центрифуге Beckman-Coulter, Avanti (США), при 6000 об/мин в течении 15 мин. После центрифугирования пасту влажность ~60 % подвергали сублимационной сушке.

2.1.2 Сублимационная сушка

Для сублимационного высушивания использовали установку LP10R IlshinBioBasc (Корея). Замороженную до минус 40 °С биомассу промораживали в течении 3 часов, затем, высушивали нагреванием до плюс 20 °С под вакуумом. Подробная программа с параметрами стадий высушивания биомассы (температура, вакуум, время) представлена в таблице 2.

Таблица 2 — Программа сублимационной сушки.

S.Value	SV01	SV02	SV03	SV04	SV05	SV06	SV07	SV08	SV09	SV10
Temp (c)	-40	-20	-20	-10	-10	0	0	20	20	20
Vac. (mTorr)	900	700	400	100	100	100	100	100	100	100
Set. Time (min)	180	60	180	60	180	60	240	240	9999	9999
Pro.Time (min)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Высушивание проводили в течении 2 суток. Далее высушенную биомассу хранили в холодильнике в герметичной таре.

2.2 Объект исследования

В работе использованы лиофильно высушенные образцы бактериальной биомассы *Cupriavidus europhus* B10646.

2.3 Методы исследования

2.3.1 Измельчение бактериальной биомассы

Для измельчения высушенной бактериальной биомассы использовали ультрацентробежную мельницу ZM200 RETSCH (Германия) при следующих параметрах: скорость размола - 8000 об/мин., размером отверстий сита - 2 мм.

2.3.2 Фракционирование бактериальной биомассы бактерий

Для разделения измельченной биомассы на фракции использовали фракционатор эксцентрикового типа со стандартным набором сит, время обработки составляло 15 минут. После выключения фракционатора на каждом сите определяли массу частиц с помощью аналитических весов.

2.3.3 Определение влажности фракций бактериальной биомассы

Определение влажности бактериальной биомассы проводили двумя способами.

Первый метод — доведение до постоянной массы. Данный метод основан на способности исследуемого продукта, помещенного в сушильный шкаф, отдавать гигроскопическую влагу при температуре 100-105 ˚С.

Для проведения опыта, на первом этапе, доводили бюксы до постоянной массы. Для этого 10 чистых бюксов вместе с крышкой (предварительно подписанные) взвешивали и в открытом виде помещали в сушильный шкаф на 60 мин при температуре 105 ˚С, затем бюксы помещали в эксикатор, охлаждали и взвешивали, данную процедуру (периодическое подсушивание и взвешивание) выполняли до тех пор, пока бюкс не приобретал постоянной массы.

На втором этапе происходит определение влажности биомассы. Для этого в высушенные бюксы отвешивали 1 ± 0,0005 грамм измельченной биомассы бактерий (размер фракций биомассы варьировал от 1,0 до <0,063 мм), затем бюксы с навеской в открытом виде помещали в сушильный шкаф, предварительно нагретый до 105 ˚С.

Высушивание бактериальной биомассы проводили в течение 5 часов, после чего бюкс вынимали из сушильного шкафа пинцетом, охлаждали в

эксикаторе 20-30 мин и взвешивали на аналитических весах. Далее бюкс с навеской повторно помещали в сушильный шкаф и через 60 мин повторяли ту же операцию охлаждения и взвешивания. Так поступали до тех пор, пока разница между результатом двух взвешиваний оказалась не более 0,0005 граммов.

Третий этап - обработка результатов. Массовую долю влаги (X) в вычисляли по формуле:

$$X=(m_1-m_2)/m•100\% \quad (2)$$

где m – масса навески испытуемого вещества, г;

m_1 – масса бюксы с навеской до высушивания, г; m_2 – масса бюксы с навеской после высушивания г.

Масса навески испытуемого вещества рассчитывали по формуле:

$$m=m_1—m_3, \quad (3)$$

где m_1 – масса бюксы с навеской до высушивания, г;

m_3 – масса бюкса с доведенной постоянной массой, г.

Второй метод — на анализаторе влажности HC103. В отличие от сушильного шкафа, в котором образец нагревается за счет конвенции и сушится в течение длительного времени, образец в галогенном анализаторе поглощает инфракрасное (тепловое) излучение галогенной лампы и поэтому нагревается очень быстро.

2.3.4 Исследование минерального состава фракций бактериальной биомассы

Минеральный состав фракций бактериальной биомассы определяли на

атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой серии iCAP 6000 (Thermo Scientific, США). Исследовано содержание следующих элементов: Al, As, B, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Sr.

2.3.5 Исследование состава жирных кислот липидов бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646

Для извлечения легко экстрагируемых липидов бактерий 1 гр измельченной биомассы экстрагировали в спирту при комнатной температуре в течении 10 минут. В дальнейшем экстракт подвергали метанолизу для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Для проведения метанолиза потребуются:

- Обратные холодильники
- Штатив с лапками
- Колбочки
- Тонкие резинки
- Воронки (маленькая, делительная)
- Вата
- Пипетка на 1 мл
- Хлороформ ($CHCl_3$)
- Метанол (CH_3OH)
- Серная кислота концентрированная ($H_2SO_{4\ концен}$)
- Внутренний стандарт (бегеновая кислота).
- Сернокислый натрий (Na_2SO_4)

К пробе необходимо добавить 2,55 мл метанола, 0,45 мл конц. серной кислоты, затем пробы поместить под обратный холодильник и зафиксировать резинками. После того как начнет капать сконденсированный хлороформ засечь

время и кипятить 3 ч. По истечения времени, поднять холодильники для охлаждения пробы и добавить по 3 мл дист. воды, пробы хорошо взболтать и поставить отслаиваться в холодильник минимум на пару часов. Проба готова к хроматографированию. Далее исследование состава жирных кислот производилось на газовом хроматографе (Agilent Technologies).

2.3.6 Определение количества экстрактивных веществ во фракциях в бактериальной биомассе

Определение количества экстрактивных веществ (липидов и белковых фракций) в бактериальной биомассе проводили в несколько стадий:

1. Очищали биомассу от липидов и белковых фракций. 3 г бактериальной биомассы экстрагировали в 50 мл этилового спирта 3 раза по 15 минут при 70 ºС на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Standard (Германия) с использованием обратного холодильника;
2. После каждой экстракции проводили фильтрацию с воронкой Бюхнера, склянкой Бунзена, вакуумным насосом Millipore WP6122050 (Billerica, Массачусетс) и бумажным фильтром «белая лента».
3. Из полученного раствора после каждой экстракции-фильтрации брали аликвоту (5 мл), упаривали и высушивали в в течении суток в сушильном шкафу при температуре 105, после охла ждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах.

2.3.7 Выделение ПГА из фракций бактериальной биомассы

Выделение полимера после экстракции липидов этиловым спиртом проводили в 50 мл дихлорметана в течении 1 часа при нагревании до температуры кипения (38 - 40 ℃). Полученные дихлорметановые экстракты упаривали до образования густой полимерной консистенции на роторном

испарителе R/210V Buchi (Швейцария). Далее проводилось осаждение полимера гексаном в соотношении 1:2 с последующей фильтрацией. Сушку полимера производили в вытяжном шкафу. Полнота извлечения определялась как процент от исходного содержания полимера в биомассе.

2.3.8 Термический анализ образцов полимера, выделенных из фракций бактериальной биомассы

Термический анализ полимера проводили на дифференциально-сканирующем калориметре DSC 1 (Mettler Toledo, Швейцария). Находили температуру плавления T_1 и T_2, температуру деградации $T_{дегр,}$ температуру кристаллизации $T_{крист}$.

2.3.9 Исследование молекулярно-массовых характеристики образцов полимера, выделенных из фракций бактериальной биомассы

Для исследования молекулярно-массовых характеристик, образцы полимера навеской 20 мг растворили в 2 мл хлороформа и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исследовали с использованием хроматографа для гель-проникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов Agilent PS-H EasiVial. Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность (D). Расчет проводился в программе Agilent ChemStation for LC System. Работа на хроматографе проводилась согласно инструкции производителя.

2.3.10 Статистическая обработка результатов

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 но критерию Стьюдента при избранной доверительной вероятности $\alpha = 0,95$Полученные результаты проверяли по одному из вышеописанных способов (по критериям максимального отклонения Стьюдента) на наличие грубых ошибок. После исключения грубых ошибок производили повторную обработку результатов. Для решения поставленных задач использовалась программа MS OffiaExel 2007 с встроенным пакетом анализа данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Освоена технология культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 на опытном производстве ПГА и получены образцы бакериальной биомассы для дальнейших исследований.

2. Исследован процесс измельчения лиофильно высушенной биомассы бактерий. Показано, что до измельчении биомасса в основном представлена крупными частицами от 2,0 до 0,2 мм, а после измельчения основной размер частиц составил менее 0,2 мм.

3. Получено 10 фракций биомассы, исследованы их физико-химические свойства. Выявлены существенные различия во влажности, выходе экстрактивных веществ, выходе полимера, в молекулярно-массовых характеристиках полимеров, степени кристаллизации и минеральном составе как между фракциями, так и в сравнении с исходной биомассой. Полученные результаты показывают, что в результате измельчения биомассы в установках дезинтеграторного типа возможно получить не только материал с развитой активной поверхностью, но и при дальнейшем рассеве - фракции частиц биомассы различного размера, обладающие различным химическим составом, индивидуальной динамикой процессов экстракции липидов и полимера, а также в совокупности определяющие усредненные характеристики исходной биомассы.

4. Проведена оценка использования фракционирования биомассы перед стадией экстракции. Установлено, что исключение из технологического процесса 5% биомассы с низким выходом полимера, позволит интенсифицировать процесс экстракции и обеспечит увеличение выхода ПГА на 9%.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Барановский С. В. Культивирование микроорганизмов в ферментере BioFlo115 (7,5л.) [Электронный ресурс] : методические указания к лабораторному практикуму / С. В. Барановский, А. В. Демиденко, Е. Г. Киселев. - Красноярск: СФУ, 2016. - Режим доступа : http://publishing.sfu-kras.ru/content/uchebno-metodicheskoe-posobie-1615

2. Бояндин А. Н. Получение и исследование полимерных смесей на основе поли-3-гидроксибутирата /А. Н. Бояндин, Е. Д. Николаева, А. В. Шабанов, А. Д. Васильев // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2014. - №7. - С. 174 - 185.

3. Виноградова О. Н. Биосинтез и свойства ПГА, содержащих мономеры 3-гидрокси-4-метилвалерата / О. Н. Виноградова, Т. Г. Волова // Журнал Сибирского федерального университета. Сер. 2. Биология. - 2016. - №9. - С. 145-152.

4. Воинов Н. И. Полигидроксиалканоаты - биоразрушаемые полимеры гидроксипроизводстных алкановых кислот: синтез, свойства, области применения [Электронный ресурс] / Н. И. Воинов, Т. Г. Волова // Медицинский сайт MedBe.ru - 2013. - Режим доступа: http://medbe.ru/materials/problemy-i-metody-biotekhnologii/poligidroksialkanoaty-biorazrushaemye-polimery-gidroksiproizvodstn ykh-alkanovykh-kislot-sintez-svoys/

5. Волова Т. Г. Синтез биорезорбируемых полимеров. Структура и свойства / Т. Г. Волова // Известия высший учебных заведений. Физика. - 2013. - Т. 56, № 12(3). - С. 27-32.

6. 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, A. J. Sinskey // Высокомолекулярные соединения. Серия А. - 2013. - № 7. - С. 775–786.

7. Волова Т. Г. «Водородные» биотехнологии [Электронный ресурс] // Т. Г. Волова // Наука из первых рук. - 2010. - Т. 32, №2. - Режим доступа : https://scfh.ru/papers/vodorodnyie-biotehnologii/

8. Волова Т. Г. Биосинтез многокомпонентных полигидроксиалканоатов бактериями *Wautersia eutropha* / Т. Г. Волова, Г. С. Калачева, II. В. Кожевников, А. Штайнбюхель // Микробиология. - 2007. - Т. 76, № 6. - С. 797-804.

9. Волова Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т. Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2014. - № 7 — С. 103-132.

10. Гончаров Д. Б. Биосинтез полигидроксиалканоатов : влияние химического состава на свойства на полимеров и характеристики нетканных материалов, полученных электростатическим формированием : дис. … канд. биол. наук : 03.01.06 / Гончаров Дмитрий Борисович. - Красноярск, 2017. - 154 с.

11. 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.

12. Жила, Н. О. К вопросу о внутриклеточной деградации полигидроксибутирата / Н. О. Жила, Г. С. Калачева, Т. Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2015. - №8. - С. 220-235.

13. Замышляева О. Г. Методы исследования современных полимерных материалов : учебно-метод. Пособие / О. Г. Замышляева. - Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 90 с.

14. Калачева Г. С. Состав жирных кислот липидов *Wautersia eutropha* в условиях активного синтеза полигидроксиалканоатов / Г. С. Калачева, Т. Г.

Волова // Микробиология. - 2007. - Т. 76, №5. - С. 608-614.

15. Киселев Е. Г. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий / Е. Г. Киселев, А. В. Демиденко // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биологи. - 2014. - № 2. - С.148-160.

16. Киселев Е. Г. Масштабирование технологии синтеза биодеградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства / Е. Г. Киселе, А. В. Демиденко, С. В. Барановский,Т. Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2014. - № 7 — С. 134-147.

17. Киселев Е. Г. Разрушаемые биопластики в качестве альтернативы неразрушаемым полиолефинам / Е. Г. Киселев, О. Н. Шишацкий // Химия в интересах устойчивого развития. - 2012. - №20. - С. 727-730.

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

19. Киселев Е. Г. Технико-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов / Е. Г. Киселев, О. Н. Шишацкий, Э. Дж. Синski // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 3. Биология. - 2012. - № 5 — С. 300-310.

20. Кулезнев А. В. Химия и физика полимеров : учебники и учеб. пособия для студентов высшю учеб. заведений / А. В. Кулезнев, В. А. Шершнев; ред. Л. И. Галицкая. –2-е изд., перераб. и доп. – Москва : «КолосС», 2007. – 367 с.

21. Ольхов А. А. Структура и механические свойства экструзионных смесевых пленок на основе полиэтилена и полигидроксибутирата / А. А. Ольхов, В. С. Маркин, Р. Ю. Косенко, М. А. Гольдштрах, Г. Е. Заиков, С. В. Власов, А. Л. Иорданский // Вестник Казанского технологического университета. - 2015. - №3. - Т.18. - С. 121-125

22. Статьи по медицине [Электронный ресурс] : химический состав

бактерий // Информационный проект по медицине «MFM-med”. - Режим доступа : http://www.mfm.nnov.ru/khimicheskijj-sostav-bakterijj.html

23. Султыгова А. К. Синтез биодеградируемых полимеров на основе полиэфиров А. К. Султыгова, М. Б. Бекбузаров, Б. А. Темирханов, З. Х. Султыгова // Органическая, биоорганическая и фармацевтическая химия. - 2014. - № 2. С. 158-161.

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

25. Akaraonye E. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice / E. Akaraonye, T. Keshavarz, I. Roy // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. - 2010. - № 85. - P. 732–743.

26. Alarfaj A. A. Extraction and characterization of polyhydroxybutyrates (PHB) from *Bacillus thuringiensis* KSADL127 isolated from mangrove environments of Saudi Arabia / A. A. Alarfaj, M. Arshad, E. N. Sholkamy, M. A Munusamy // Brazilian Archives of Biology and Technology. - 2015. - Vol.5, №58. - P. 781-788.

27. Anderson A. J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / Anderson A. J., Dawes E. A. // Microbiological Reviews. - 1990. - № 54. P. 450 – 472.

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

29. Bugnicourt E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez // Express Polym. Lett.. - 2014. - № 11. - P. 791-808.

30. Bury D. Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: A comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling / D. Bury, P. Jelen, M. Kaláb // Innovative Food

Science and Emerging Technologies. - 2001. - № 2. - P. 23-29.

31. Castilho L. R. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materialsand by-products by submerged and solid-state fermentation / L.R. Castilho, D.A. Mitchell, D.M.G. Freire // Bioresource Technology. - 2009. - № 100. - P. 5996–6009

32. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates / Suchada Chanprateep // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2010. - Vol. 110. - №. 6. - P. 621–632

33. Chanprateep S. Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) production / S. Chanprateep, Y. Katakura, S. Visetkoop, H. Shimizu, S. Kulpreecha, S. Shioya // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. - 2008. - № 35. - P. 1205 – 1215.

34. Chee J.-Y. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics / J.-Y. Chee, S.-S. Yoga1, N.-S. Lau, S.-C. Ling, R. M. M.Abed, K.Sudesh // Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. - 2010. - P. 1395 – 1404.

35. Chen Y. Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactantchelate aqueous system / Y. Chen, Q. Xu, H. Yang, G. Gu // Process Biochemistry. - 2001. - № 36. - P. 773-779.

36. Chen G-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry / G-Q Chen // Chemical Society Reviews. - 2009. - № 38. - P. 2434-2446.

37. Chiara S. Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery / S. Chiara, F. Abbondanzi, P. Galletti, L. Giorgini, L. Mazzocchetti, C. Torri, E. Tagliavini // Bioresource Technology. - 2015. - № 189. - C.195 — 202.

38. Cruz M. V. Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee

grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology / M. V. Cruz, A. Paiva, P. Lisboa, F. Freitas, V. D. Alves, P. Simxes, S. Barreiros, M. A.M. Reis // Bioresource Technology. - 2014. - №157. - P. 360-363.

39. Divyashree M.S. Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by Bacillus flexus / M.S. Divyashree, T.R. Shamala // Radiation Physics and Chemistry. - 2009. Vol.78, №2. - P. 147 – 152.

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

41. Ghatnekar M. S. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from Methylobacterium sp V49 / M. S. Ghatnekar, J. S. Pai, Ganesh M. // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. - 2003. - № 77. - P. 444 – 448.

42. Grogan D.W. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria / D.W. Grogan, J.E. Cronan // Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 1977. - № 61. - P. 429–441.

43. Hanson A. J. Community proteomics provides functional insight into polyhydroxyalkanoate production by a mixed microbial culture cultivated on fermented dairy manure / A. J. Hanson, N. M. Guho, A. J. Paszczynski, E. R. Coats // Applied Microbiology Biotechnology. - 2016. - № 100. — P. 7957 – 7976.

44. Haywood G.W. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoates synthesis by *Alcaligenes eutrophus* / G.W. Haywood, A.J. Anderson, E.A. Dawes // FEMS Microbiology Letters. - 1989. - № 57. - P.1-6.

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

46. Hejazi P. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(3-hydroxybutyrate) recovery / P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani, Y. Yamini // Biotechnology Progress. - 2003. - №19. - P. 1519–1523.

47. Higuchi-Takeuchi M. Synthesis of high-molecular-weight polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria M. Higuchi-Takeuchi, K. Morisaki, K. Toyooka, K. Numata // PLOS ONE. - 2016. - № 11. - P. 17

48. Hu. S. Characterization of polyhydroxybutyrate biosynthesized from crude glycerol waste using mixed microbial consortia / S.Hu, A. G. McDonald, E. R. Coats // Journal of Applied Polymer Science. - 2013. - № 10. - P. 1314-1321.

49. Inoue D. Polyhydroxyalkanoate production potential of heterotrophic bacteria in activated sludge / D. Inoue, Y. Suzuki, T. Uchida, J. Morohoshi, K. Sei // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2016. - Vol. 121. № 1. - P. 47 — 51.

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

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

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

53. Koller M. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the ‘‘anti-solvent’’ acetone under elevated temperature and pressure / M. Koller, R. Bona, E. Chiellini, G. Braunegg // Biotechnology Letters. - 2013. - № 35. - P. 1023–1028.

54. Koller M. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resourses / M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, G. Braunegg // Materiali in Tehnologije. - 2012. - №46. - P. 23-30

55. Khan F. A. Separation of polyhydroxyalkanoates-producing bacterial strains using PHA synthase gene and their evaluation for PHA deposition / A. B.

Khan, M. I. Khattak, O. M. Tarar, F. Habib, K. Jamil, A. Yasmin, S. Parvez // Brazilian Archives of Biology and Technology. - 2013. - Vol.4, №56. - P. 645-652.

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

57. Lee S.Y. Poly(3-hydroxyalkanoate) production from xylose by recombinant E. coli / S.Y. Lee // Bioprocess Engineering. - 1998. - №18. - P. 397–399.

58. Linton E. A Synthetic Biological Engineering Approach to Secretion-Based Recovery of Polyhydroxyalkanoates and Other Cellular Products / Elisabeth Linton / Utah State University, 2010. - 161 P.

59. Mikkili I. Isolation, Screening and Extraction of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from Sewage sample / I. Mikkili, A. P Karlapudi, T.C. Venkateswarulu, J. Babu D., S.B. Nath, V. P. Kodali // International Journal of PharmTech Research. - 2014. - Vol.6, №2. - P. 850-857.

60. Mohammadi M. Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant Cupriavidus necator using water and ethanol / M. Mohammadi, A. M. Hassan, L-Y. Phang, H. Ariffin, Y. Shirai, Y. Ando // Biotechnology Letters. - 2012. - № 2. - P. 253–259.

61. 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. - P. 98-105.

62. Neves A. Use of Enzymes in Extraction of Polyhydroxyalkanoates Produced by Cupriavidus necator / A. Neves, J. Muller // Biotechnology Progress. - 2012. - Vol. 28, №6. - P. 1575-1580

63. Sudesh K. Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates / K. Sudesh, H. Abe // Smithers Rapra, 2010.

64. Tan G-Y. A. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review / Tan G-Y. A. C. Chia-Lung, L. Li , L. Ge, L. Wang, I. M. N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J-Y. Wang // Polymers. - 2014. - № 6. - P. 706-754.

65. Verlinden, R. A. J. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates / R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, I. J. Radecka // Journal of Applied Microbiology. - 2007. - № 102. - P. 1437 — 1449.

66. 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. - P. 101-104.

67. Volova T. G. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates / T. G. Volova, E. I. Shishatskaya. N. O. Zhila, E. G. Kiselev, P. V. Mironov, A. D. Vasiliev, I. V. Peterson, A. J. Sinskey // Journal of Siberian Federal University. Biology 3. - 2012. - № 5. - P. 280-299.

68. Yang Y-H. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by Ralstonia eutropha / Yung-Hun Yang, Christopher J. Brigham, Charles F. Budde, Paolo Boccazzi, Laura B. Willis, Mohd Ali Hassan, Zainal Abidin Mohd Yusof, ChoKyun Rha, Anthony J. Sinskey //Applied Microbiology and Biotechnology. - 2010. - №87. - P. 2037-2045.

69. Yasotha K. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration / K.Yasotha, M. K. Aroua, K. B. Ramachandran, I. Tan // Biochemical Engineering Journal. - 2006. - № 30. - P. 260–268.

70. Yu J. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass / J. Yu, LXL Chen // Biotechnology Progress. - 2006. - № 22. - P. 547 – 553.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы выразить благодарность своему научному руководителю Сергею Викторовичу Барановскому за помощь в составлении и оформлении диссертации, за хорошую подготовку к защите и содействию в создании презентации. Так же, поблагодарить за помощь в постановке экспериментов Киселева Евгения Геннадьевича, Калачеву Галину Сергеевну, Бояндина Анатолия Николаевича.

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

Интенсификация процесса экстракции ПГА из биомассы бактерий

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

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

Выпускник 19.06.17 _____ А.А. Шмидт
дата, подпись

Рецензент 16.06.17 _____ доцент, к.т.н. В.А. Кожухов
дата, подпись

Красноярск 2017