На правах рукописи

Демиденко Алексей Владимирович

ТЕХНОЛОГИЯ БИОСИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ НА ГЛИЦЕРИНЕ И РЕАЛИЗАЦИЯ ОПЫТНОГО ПРОИЗВОДСТВА

03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) – обособленном подразделении «Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИБФ СО РАН) и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Научный руководитель: **Волова Татьяна Григорьевна**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Градова Нина Борисовна**
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», главный специалист кафедры биотехнологии факультета биотехнологии и промышленной экологии

Максимова Юлия Геннадьевна
доктор биологических наук,
«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет»

Защита диссертации состоится 9 апреля 2019 года в 14:00 на заседании диссертационного совета Д 003.075.04 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биофизики СО РАН и на сайте http://www.ibp.ru

Автореферат разослан « » _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  Есимбекова Елена Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фундаментальные исследования потенциала биологических агентов и биосистем, ориентированные на получение научной основы для развития индустрии экологически чистых полимерных материалов - актуальное и высокорейтинговое направление критических технологий мирового уровня. Связано это с тем, что объемы выпуска синтетических не разрушаемых пластиков превысили 350 млн. тонн в год; основная их часть скапливается на свалках и аккумулируется в Мировом океане, создавая глобальную экологическую проблему. Острота проблемы усиливается экономической ситуацией, так как свыше 90 % полимерных материалов производится из не возобновляемого ископаемого сырья – нефти и газа.

Ценным продуктом биотехнологии являются резервные макромолекулы липидной природы - полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты, ПГА), которые обладают широким спектром ценных свойств, включая биосовместимость и биоразрушаемость в биологических средах, и перспективны для применения в различных сферах. За рубежом в сфере коммерциализации ПГА повсеместно заняты многие промышленные фирмы и компании («Monsanto Company», «Metabolix Inc.», «Tepha», «Procter & Gamble», «Berlin Packaging Corp.», «Bioscience Ltd.», «BioVentures Alberta Inc.», «Merck» и др.), разрабатывающие процессы синтеза ПГА на различных субстратах, включая отходы.

В РФ первое отечественное опытное производство ПГА было сконструировано и введено в строй на базе Красноярского научного центра Сибирского отделения РАН при сотрудничестве Института биофизики СО РАН и отдела Биотехнологии ОАО «Биохиммаш» (г. Москва). В основу процесса была положена технология с использованием штамма бактерий *Ralstonia eutrophus* B-5786 на фруктозе с выходами по биомассе и полимеру, соответственно, до 50 г/л и 80-85 %. Последующие исследования с привлечением нового штамма *C. eutrophus* B-10646 позволили разработать технологию на более доступной глюкозе при продуктивности процесса, превосходящей ранее достигнутые показатели в культуре *R. eutrophus* B-5786 на фруктозе.

Расширение объемов производства и областей применения ПГА лимитировано их стоимостью. При этом до 40-50 % затрат при производстве этих полимеров приходится на долю исходного углеродного сырья, поэтому расширение сырьевой базы и привлечение новых доступных субстратов приобретает все большую значимость, наряду с поиском высокопродуктивных штаммов-продуцентов и разработкой эффективных технологий биосинтеза. Среди перспективных субстратов для крупнотоннажного производства ПГА с недавнего времени рассматривается глицерин, масштабы производства которого возрастают в связи с ростом производства биодизеля как альтернативного нефти возобновляемого источника энергии. Согласно оценке аналитиков Oil World по итогам 2018 г. мировое производство биодизеля достигло рекордных 39,4 млн. тонн; 10% от этих объемов составил глицерин как побочный продукт.

За рубежом процессы синтеза ПГА на глицерине различной степени очистки исследуются с привлечением природных, мутантных и рекомбинантных штаммов. При этом достигнутые уровни продуктивности по урожаю биомассы бактерий и выходу полимеров значительно варьируют и уступают показателям на сахарах, что связано с наличием в глицерине примесей, негативно влияющих на молекулярную массу полимеров и общие выходы. В целом, анализ публикаций свидетельствует о несомненной перспективности глицерина в качестве субстрата для получения ПГА.

Однако для улучшения продукционных показателей производства ПГА на глицерине необходимо привлечение новых штаммов и совершенствование технологических стадий процесса, в том числе в масштабированных вариантах.

Масштабирование лабораторных биотехнологий в условиях опытного производства (ОП) является необходимым этапом для перехода к промышленному производству. Разработка и реализация технологии в условиях ОП позволяет уточнить физико-химические параметры процесса ферментации, составить материально-энергетический баланс, получить партии продукта для проведения комплекса необходимых испытаний и исходные данные для последующего масштабирования технологии.

Это определило тематику диссертационной работы, направленной на расширение сырьевой базы технологии биосинтеза ПГА с привлечением в качестве перспективного С-субстрата глицерина, разработку и масштабирование технологии.

Цель диссертационной работы – исследование биосинтеза полигидроксиалканоатов (ПГА) на глицерине; разработка и масштабирование технологии в условиях опытного производства.

Для достижения цели сформулированы следующие **задачи:**

1. Сравнительное исследование способности природных штаммов хемоорганотрофных водородокисляющих микроорганизмов синтезировать полигидроксиалканоаты на глицерине; отбор наиболее продуктивных штаммов по общему урожаю биомассы клеток и выходу полимеров.
2. Исследование влияния концентрации и степени чистоты глицерина на кинетические и продукционные показатели процесса микробиологического синтеза ПГА, их состав и свойства.
3. Разработка исходных данных, проектирование и создание опытного производства ПГА.
4. Масштабирование технологии биосинтеза ПГА на глицерине в условиях опытного производства; исследование продукционных показателей процесса и материальных затрат на синтез полимеров.

Данный объем задач сформулирован впервые; их решение позволило разработать эффективный процесс биосинтеза полигидроксиалканоатов на глицерине; получить исходные данные, спроектировать и реализовать опытное производство, масштабировать технологию получения ПГА на новом углеродном субстрате.

Научная новизна. Исследованы закономерности синтеза ПГА водородокисляющими бактериями при культивировании на глицерине и показана возможность продуктивного синтеза полимеров различного состава (поли-3-гидроксибутирата и сополимеров, содержащих, помимо мономеров 3-гидроксибутирата, макровключения мономеров 3-гидроксивлаерата (до 35,7 мол%) и 4-гидроксибутирата (до 9,7 мол%), сопоставимого с процессом на сахарах. Границы физиологического действия глицерина для бактерий составляют от 1,0 до 60,0 г/л с широким плато насыщения в области 1,0-30,0 г/л; определены субстратные константы для культуры по глицерину, составившие для K_s и K_i, соответственно, 0,004 и 0,673 моль/л. Доказано отсутствие негативного влияния примесей содержащихся в глицерине различной очистки на урожай биомассы бактерий и синтез полимера в культуре исследованного штамма. Выявлено, что глицерин влияет на молекулярно-массовые характеристики ПГА, снижая средневесовую молекулярную массу до 304-416 кДа и повышая полидисперсность до 3,0-3,5 на фоне выравнивания упорядоченной и неупорядоченной зон и амморфизации полимеров, сопровождающихся снижением степени кристалличности до 50-55% у П(3ГБ) и до 44-46% у сополимеров, что делает ПГА более

технологичными. На основе анализа процесса синтеза ПГА на глицерине в ферментере объемом 30 л определены требования к параметрам продуктивного процесса. Определено, что концентрация клеток в инокуляте должна быть не менее 2,0 г/л с содержанием полимера до 20%, обеспечивая урожай биомассы и выход полимера порядка 70±5 г/л и 75±5 %; значения средней удельной скорости роста 0,1 $ч^{-1}$ и экономический коэффициент по биомассе и полимеру 0,38 и 0,29 г/г.

Научная и практическая значимость. Анализ лабораторной технологии синтеза ПГА позволил разработать исходные данные, на основе которых разработан проект ОП, утвержденный госэкспертизой РФ; проведены подбор и комплектация оборудования, выполнены пуско-наладочные работы и введено в строй ОП полигидроксиалканоатов производительностью по полимеру до 500 кг в год. Технология синтеза ПГА на глицерине масштабирована в условиях ОП; достигнутые показатели по урожаю общей биомассы и выходу полимера составили 110±5,5 г/л и 76,1±2,3 % при высоких значениях продуктивности по биомассе и полимеру, соответственно, 2,1±0,07 и 1,22±0,06 г/л·ч, превышающие показатели на глюкозе и известные зарубежные решения. Определены удельные материальные затраты на синтез ПГА. Предварительная экономическая оценка процесса синтеза ПГА показала, что при использовании глицерина затраты на С-субстрат по сравнению с глюкозой снижаются с 45±1 до 26±1 % при близких значения экономического коэффициента (0,30±0,1 г/г). Реализованное и функционирующее ОП является научно-образовательной базой для оптимизации существующей технологии производства разрушаемых полимеров и последующего масштабирования; разработки и реализации новых биотехнологий и подготовки специалистов - биотехнологов.

Положения выносимые на защиту:

- исследованные закономерности роста и синтеза ПГА водородокисляюми бактериями *Cupriavidus eutrophus* B-10646 на глицерине; доказанная возможность продуктивного синтеза гомополимерного поли-3-гидрокибутирата и сополимерных ПГА на глицерине различной очистки; изученные структура и выявленные особенности физико-химических свойств полимеров;
- исследованные кинетические и продукционные показатели процесса биосинтеза ПГА на глицерине, определены исходные данные, проект опытного производства и созданное опытное производство ПГА;
- разработанная эффективная технология биосинтеза полимеров на новом субстрате, масштабированная в опытном варианте; определенные продукционные показатели процесса и материальные затраты на синтез полимеров при использовании глицерина.

Степень достоверности и апробация результатов. Полученные данные обрабатывали с применением программ «Microsoft Word 2010» и «Microsoft Excel 2010». Большой массив экспериментальных данных получен с использованием современных методов и оборудования в трех-пятикратной повторности; результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке. Достоверность результатов проведённых исследований коррелируется соответствием теоретических данных с результатами экспериментов. Экспериментальные данные и выводы базируются на общепринятых теоретических закономерностях, согласуются с известными концепциями. Основные результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на международных конференциях: I-й, II-й и III-й Международной научной конференции «Биотехнология новых биоматериалов - окружающая среда -

качество жизни"- 2016, 2017, 2018гг. Красноярск-Россия; 9th International conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety - Toxicology and Ecology Issues", 2018. - Heraklion, Crete - Greece; 6th Int. Conference on Natural Polymers, Bio-Polymers, Bio-Materials, 2018. - Kottayam, Kerala - India.

Работа выполнена: по плановой тематике Института биофизики СО РАН №№ гос. регистрации 01201351505; АААА-А17-117013050028-8, в рамках мега-гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования «Биотехнология новых биоматериалов» (Договор №11.G34.31.0013; 2010–2014гг), по проекту ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности РФ на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (госконтракт № 13411.1008799.13.116. 2013-2015 гг.), гранту «Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности» (соглашение № 50/14 от 20.11.2014г.).

Публикации. По результатам работы опубликовано 13 печатных работ: 4 статьи в журналах из списка ВАК, 9 - в сборниках докладов научных конференций.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки цели и задач, выбора и постановки методов исследований до проведения экспериментов с последующей интерпретацией и обобщением результатов, а также в подготовке докладов и публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Результаты научных исследований соответствуют пп. 2, 3, 4, 7 паспорта специальности 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (объекты и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, включающего 165 источников, из них 147 иностранных. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 35 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, изложены цели и задачи работы, показана научная новизна и практическая значимость проводимых исследований; сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен обзор литературы, характеризующий резервные микробные полигидроксиалканоаты (ПГА) как объект исследования и ценный продукт биотехнологии. Дано представление о микроорганизмах - продуцентах ПГА, биохимических путях и условиях биосинтеза, субстратах, а также свойствах полимеров, мировых масштабах производства и областях применения. Анализ публикаций обосновывает цель настоящего исследования.

Вторая глава посвящена объектам и методам исследования. В качестве продуцента полимеров исследованы водородокисляющие бактерии, обладающие сильной внутриклеточной системой синтеза полигидроксиалканоатов, характеризующиеся широким органотрофным потенциалом и способностью синтезировать ПГА различного химического состава на различных субстратах. Исследованы штаммы: *Ralstonia eutropha* В-5786, *Ralstonia eutropha* В-8562 и *Cupriavidus eutrophus* В-10646, зарегистрированные во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Для выращивания бактерий за основу принята сбалансированная солевая среда Шлегеля. При исследовании, в качестве нового

углеродного субстрата использовали глицерин, образуемый при производстве биодизеля различной степени очистки:

- глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция), содержание основного вещества 99,3%, сульфаты < 0,0005%, хлориды < 0,0001%, аммонийные соли < 0,0005%, железа < 0,00005%, мышьяка < 0,00004%, свинца < 0,00005%, эфиры жирных кислот и жирные кислоты < 0,025%;

- глицерин-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды), содержание основного вещества 99,7%, сульфаты < 0,002%, хлориды < 0,003%, органические примеси < 0,1%, вода 0,09%, тяжелые металлы < 5 мкг/г, сложные эфиры жирных кислот 0,21%;

- глицерин-III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия), содержание основного вещества 82,07%, хлориды 4,35%, органические примеси 1,38%, вода 9,88%, зольность 6,59%, метанол 0,13%.

Для синтеза сополимерных ПГА в состав среды дополнительно вносили в качестве прекурсоров искомых мономеров (4-гидрокисбутирата и 3-гидроксивалерата), соответственно: ε-капролактон (Alfa Aesar, Германия), валерьяновую кислоту (Alfa Aesar, Германия) и пропионовую кислоту (Acros Organics, Бельгия).

Бактерии выращивали в периодическом режиме. Культивирование проводили в стеклянных колбах объемом 1 и 2 литра, с заполнением 50% с использованием термостатируемых шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova® серии 44» «New Brunswick Scientific» (США). Для глубинного культивирования бактерий использовали ферментеры фирмы Bioengineering серий NLF 22 и P 150 (Швейцария) с объемом аппаратов 30 и 150 л с коэффициентом заполнения 0,7. Ферментеры оснащены системами контроля pH, уровня пены, температуры, давления, растворённого кислорода. Управление ферментёрами осуществляли с помощью программного комплекса BioScadaLab в автоматическом режиме; для подпитки культуры субстратами ферментёры оснащены перистальтическими насосами Bioengineering Peripex. Концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне DO 30% управлением подачи воздуха и оборотов мешалки в каскадном режиме. Двустадийный периодический процесс проводили при pH 7 и температуре среды 30 °С с лимитированием роста бактерий по азоту – фактор, стимулирующий суперпродукцию ПГА; на первом этапе (20-25 ч) использовали среду с уменьшенным содержанием азота (до 50% от физиологической потребности бактерий); на втором этапе (20-30 ч) процесс продолжали при тех же параметрах в безазотной среде. Концентрацию азота в среде контролировали фотометрически с реактивом Несслера; концентрацию глицерина - по методу, основанному на окислении глицерина периодатом натрия в сернокислом растворе до формальдегида и определении колориметрическим методом с хромотроповой кислотой. Микробиологический контроль стадий технологического процесса проводили согласно ГОСТ ИСО 14644-1-2002.

Критериями оценки процесса биосинтеза ПГА служили: концентрация биомассы клеток в культуре (по весу абсолютно сухого вещества и измерением оптической плотности культуры); выход полимера (% к АСБ); затраты основного ростового субстрата, длительность и продуктивность процесса. Для этого находили общепринятыми методами кинетические и продукционные параметры культуры: общий урожай биомассы бактерий (X, кг/м^3) и активной биомассы (X минус внутриклеточное содержание полимера); экономический коэффициент по субстрату для биомассы и полимера (Y, кг/кг субстрата); специфическую скорость роста для биомассы и синтеза полимера (μ, ч$^{-1}$); продуктивность процесса (P, г/л в час). Внутриклеточное содержание и состав ПГА определяли на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A с

масс детектором Agilent Technologies 5975C («Agilent», США) и по снятым ^{1}H-ЯМР спектрам растворов образцов полимеров в $CDCl_3$ с использованием ЯМР-спектрометра Advance III 600 («Bruker», Германия). Молекулярную массу ПГА определяли с использованием системы гель-проникающей хроматографии «Agilent 1200» с набором полистироловых стандартов («Sigma»). Степень кристалличности - с применением рентгеноструктурного анализа D8 Advance («Bruker», Германия). Температурные характеристики - на основе дифференциального термического анализа DSC-1 Mettler Toledo (Швейцария). Для анализа структуры поверхности и физико-механических свойств ПГА получали пленки методом полива полимерных растворов на поверхности чашек Петри с последующим испарением растворителя. Микроструктуру поверхности пленок исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии S 5500 (Япония); шероховатость поверхности - с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ) в полу-контактном режиме («SmartSPM™», ООО «АИСТ-НТ», Россия, Зеленоград); свойства поверхности измерением контактного краевого угла смачивания жидкостями на приборе DSA-25E («Krüss», Германия); физико-механические свойства исследовали при комнатной температуре с помощью электромеханической разрывной машины Instron 5565 (Великобритания), определяли Модуль Юнга (E, МПа), напряжение при разрыве (σ, МПа) и удлинение при разрыве (ε, %), которые рассчитывали с помощью программного обеспечения Bluehill 2 (Elancourt, Франция).

Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Исследование способности водородокисляющих бактерий синтезировать полигидроксиалканоаты на глицерине

Привлечение новых субстратов делает необходимым исследование закономерностей роста конкретных микроорганизмов на новых субстратах, определение границ их физиологического действия для продуцента, кинетических и продукционных характеристик процесса, норм затрат субстрата и эффективности его использования. Работа направлена на повышение экономической эффективности технологии биосинтеза разрушаемых полигидрокисалканоатов за счет расширения сырьевой базы производства и привлечения в качестве основного С-субстрата глицерина - отхода производства биодизеля. Для отбора продуктивного штамма проведено сравнительное исследование роста и синтеза ПГА тремя культурами водородокисляющих бактерий: *Ralstonia eutropha* B-5786, *Ralstonia eutropha* B-8562 и *Cupriavidus eutrophus* B-10646. Все штаммы оказались способными к усвоению очищенного глицерина («Corporate Oleon», Швеция) в качестве единственного источника углерода (рисунок 1).

После замены сахаров глицерином бактерии не сразу утилизировали новый субстрат, а после лаг-фазы, длительность которой составляла до 30 ч, независимо от исходной концентрации глицерина в среде (от 5 до 20 г/л). Более высокий урожай биомассы за 80 ч получен в культуре *C. eutrophus* B-10646 (2,0 – 2,2 г/л) по сравнению с *R. eutropha* B-5786 (0,7 – 0,8 г/л) и *R. eutropha* B-8562 (1,0 – 1,1 г/л). Выходы полимера также различались и составили у штаммов B-10646 57%; у штаммов B-5786 и B-8562, соответственно, 45 и 38 %. При пересевах бактерий в течение нескольких десятков циклов по мере адаптации к глицерину длительность латентного периода сокращалась до полного его исключения на фоне повышения урожая биомассы клеток и выхода полимера. Достигнутые в колбочной культуре урожаи по биомассе клеток составили у исследуемых штаммов от 5,0 до 7,0 г/л; выходы полимера варьировали от 57 до 70 %,

что сопоставимо с показателями исследуемых штаммов на сахарах. Более продуктивным признан штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646, который был отобран для последующих исследований и масштабирования процесса.

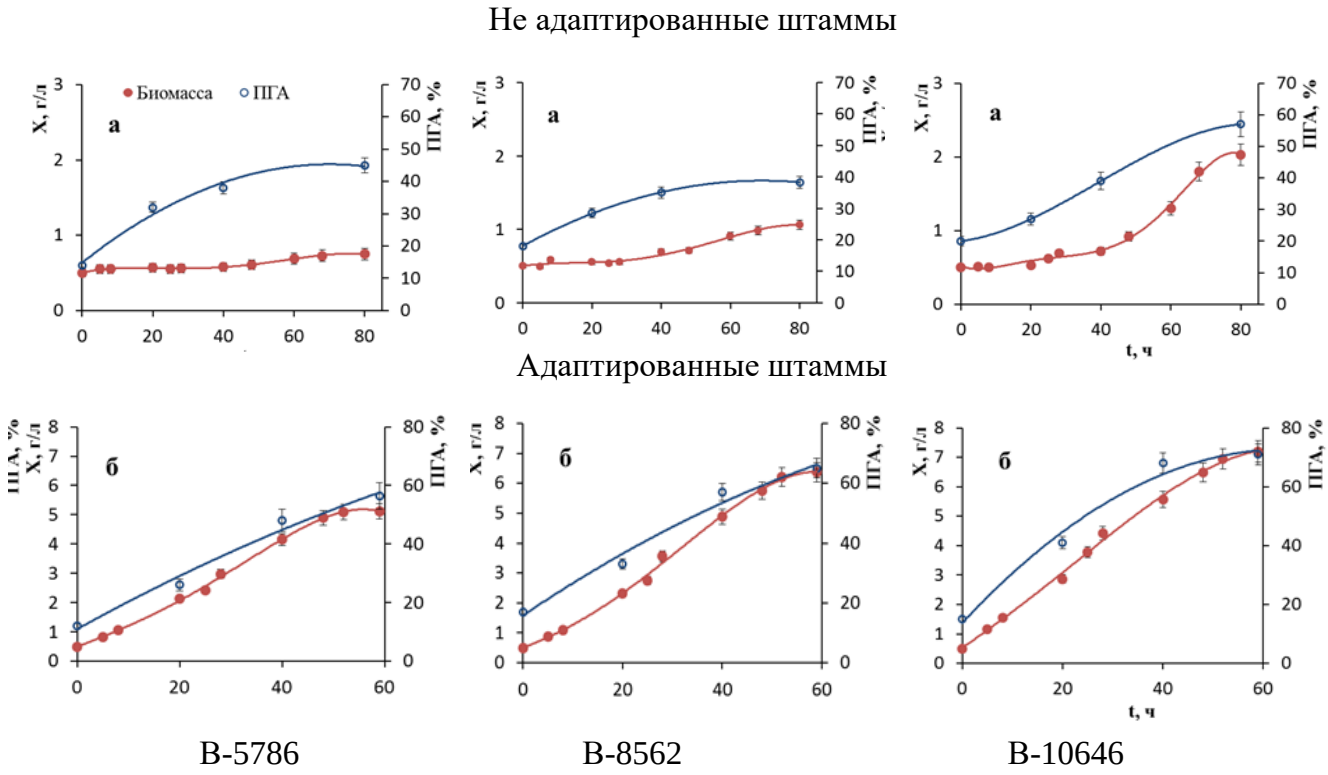

Рисунок 1. Продукционные характеристики исходных, не адаптированных (а) и адаптированных к глицерину штаммов (б): урожай биомассы клеток (X, г/л) и выходы ПГА (% от АСБ)

2. Синтез сополимерных ПГА бактериями *C. eutrophus* B-10646 на глицерине

Наиболее ценными продуцентами ПГА являются штаммы, способные синтезировать, помимо высококристалличного поли-3-гидроксибутирата, сополимеры, содержащие мономеры, отличные от 3ГБ; при этом включение различных мономеров в цепь 3ГБ зависит от физиолого-биохимической специфики штаммов, субстратной специфичности ПГА-синтазы, устойчивости клеток к ингибирующему воздействию субстратов-предшественников искомых мономеров, условий аккумуляции ПГА на смешанном углеродном субстрате. На рисунке 2 представлены результаты исследования роста и синтеза ПГА бактериями *C. eutrophus* B-10646 на среде с глицерином с добавками валерата калия (C_4H_9COOK), пропионата калия (C_2H_5COOK) и ε-капролактона (предшественников синтеза мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидроксибутирата), которые вносили в культуру в период наиболее активного синтеза полимеров (10-12 ч от начала культивирования).

Варьирование количества добавок валерата калия, пропионата калия и ε-капролактона позволило синтезировать серию сополимерных ПГА различного состава. Наиболее высокие показатели по включению мономеров 3ГВ и 4ГБ в полимеры получены при двух добавках субстратов предшественников.

Содержание сополимера [П(3ГБ/3ГВ)] за 60 ч составило 70,0±4,0 %, включение мономеров 3ГВ достигло 35,7±2,0 мол.% на фоне снижения урожая биомассы до 3,0±0,3 г/л в результате ингибирующего действия валерата. При двух добавках пропионата калия содержание полимера было выше (81,3±5,7 %), включение мономеров 3ГВ

составило 28,5±2,0 мол.%. Вследствие меньшего токсического эффекта пропионата для бактерий урожай биомассы составил 3,8±0,2 г/л, что несколько выше, чем при использовании валерата.

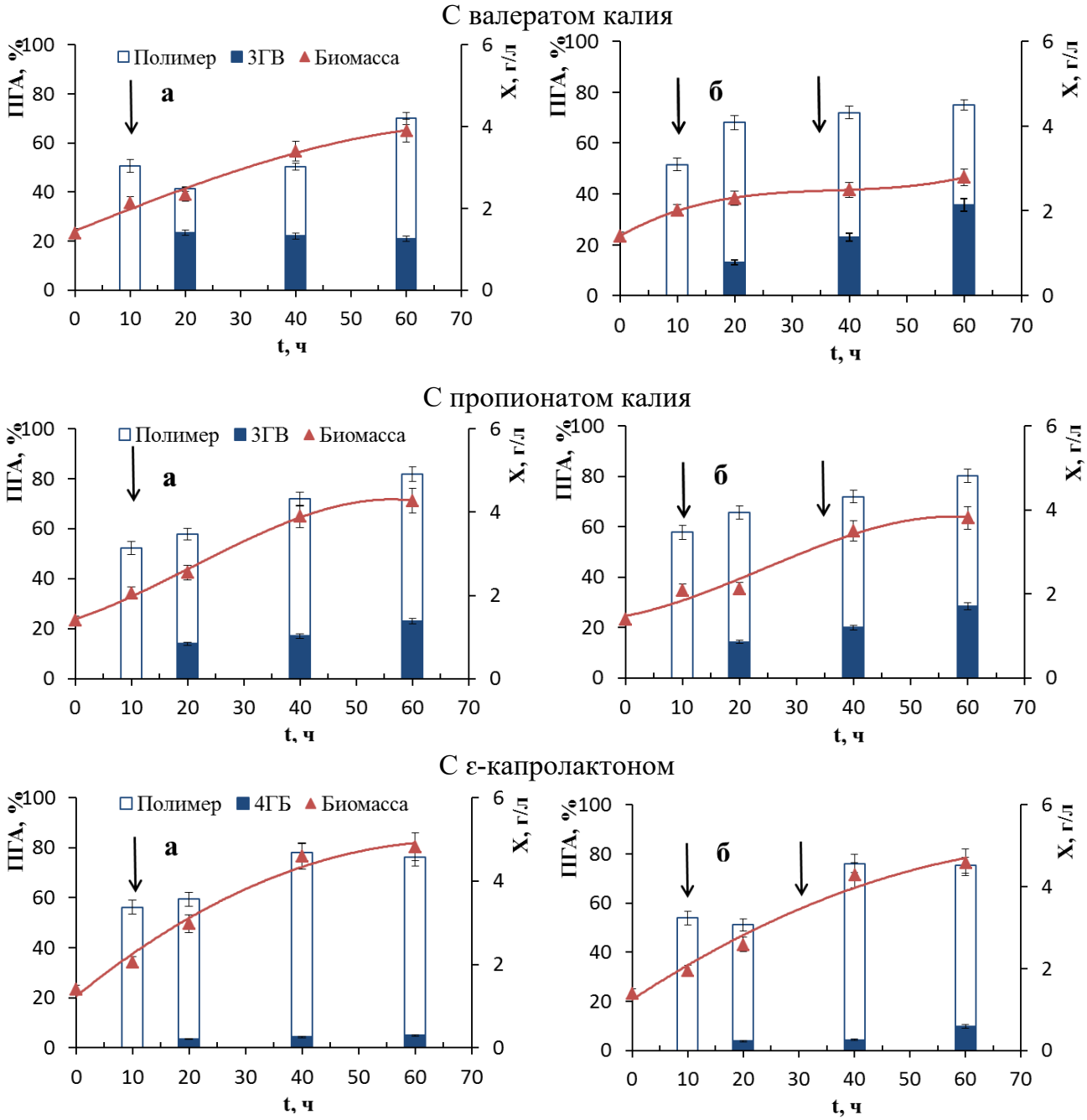

Рисунок 2. Синтез сополимерных ПГА C. eutrophus B-10646 на глицерине с добавками в культуру валерата калия, пропионата калия, ε-капролактона (а – одна добавка; б – две добавки; обозначены стрелками)

При двух добавках в культуру бактерий ε-капролактона получен другой тип сополимеров - [П(3ГБ/4ГБ)] с содержанием мономеров 4ГБ в нем 9,8±0,6 мол.% при урожае биомассы 4,5±0,3 г/л. Хотя ε-капролактон и оказывает ингибирующее воздействие на культуру, но это воздействие менее выражено, чем при использовании прекурсоров для синтеза мономеров 3ГВ.

Таким образом, на глицерине в качестве основного С-субстрата в культуре *C. eutrophus* B-10646 и добавках субстратов предшественников реализован синтез сополимерных ПГА с различным набором и соотношением мономеров при некотором

снижении продукционных показателей культуры.

3. Влияния концентрации и степени очистки глицерина на кинетические и продукционные показатели процесса микробиологического синтеза ПГА

Для определения влияния концентрации глицерина в среде на удельную скорость роста *C. eutrophus* B-10646 бактерии выращивали в периодической культуре при варьировании исходной концентрации глицерина в среде в широких пределах (рисунок 3). Показана возможность культивирования бактерий при изменении концентрации глицерина в диапазоне 1,0 - 60,0 г/л с широким плато концентраций (от 1,0 до 30,0 г/л) без влияния на рост бактерий. Исследованные зоны лимитирования и ингибирования роста бактерий по глицерину составили, соответственно, 0,1 – 3,0 и 30 – 60 г/л.

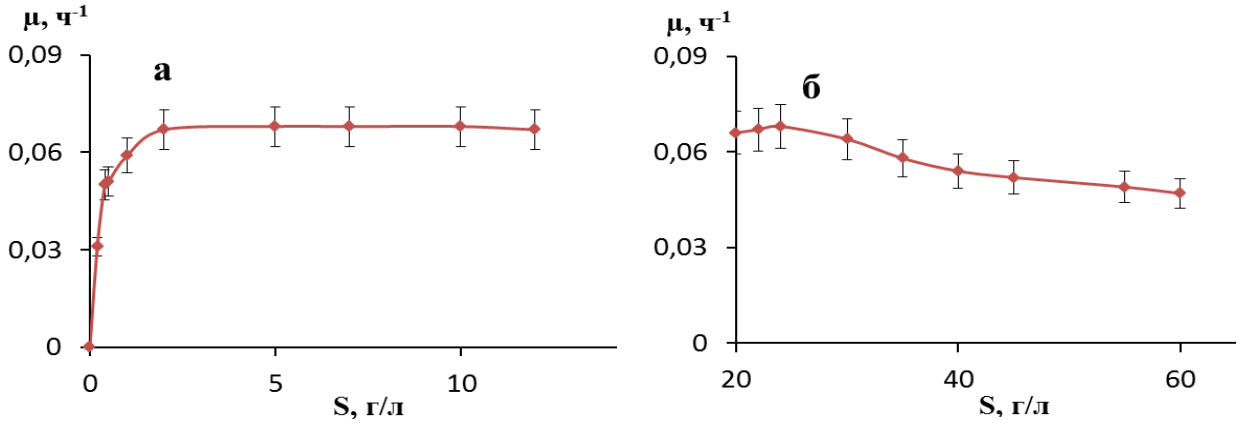

Рисунок 3. Зависимость удельной скорости роста C. eutrophus B-10646 от концентрации глицерина в среде (а – зона лимитирования; б – зона ингибирования)

Полученная зависимость удельной скорости роста (μ) от концентрации субстрата (S) описывается уравнением Андрюса, представляющего собой модифицированное уравнение Моно.

Используя графоаналитический метод Лайнуивера-Берка (1/μ:1/S) и метод Диксона (1/μ:S) рассчитаны кинетические константы для данного штамма (K_s, K_i, μ_{max}) (рисунок 4).

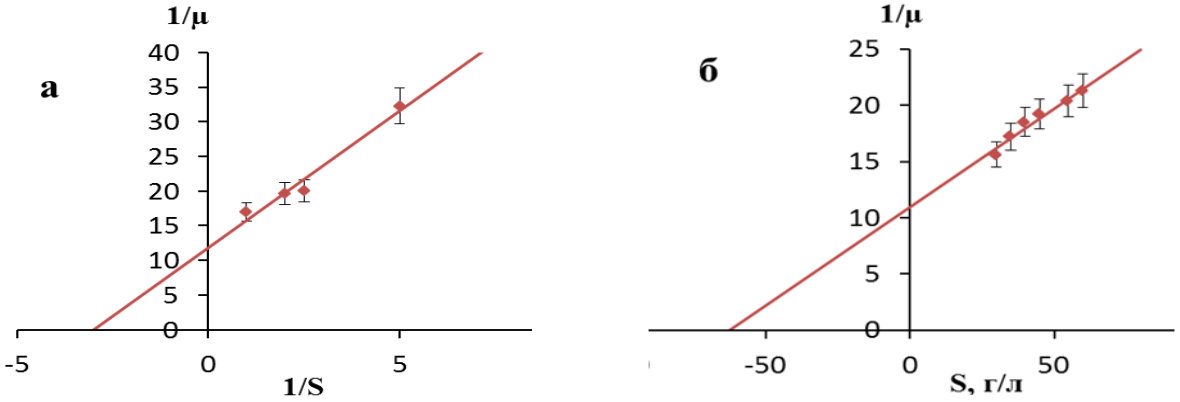

Рисунок 4. Зависимость удельной скорости роста C. eutrophus B-10646 от концентрации глицерина в среде в области лимитирования по Лайнуиверу-Берку (а) и ингибирования субстратом по Диксону (б)

Определено, что субстратная константа по глицерину (K_s) для штамма составляет 0,36±0,02 г/л (0,004 моль/л); константа ингибирования (K_i) 62,0±3,1 г/л (0,673 моль/л); μ_{max} – 0,085±0,009 $ч^{-1}$.

Исходя из того, что состав промышленных марок глицерина и содержание

примесей в них значительно варьируют, а также из имеющихся данных о возможном негативном влиянии сырого (неочищенного) глицерина на продукцию ПГА, следующая задача предусматривала исследование роста и синтеза ПГА на глицерине различной степени очистки, с минимальным (сотые доли %) и максимальным (свыше 10-15%) содержанием примесей. Предварительно бактерии выращивали в периодической культуре в стеклянных колбах в шейкере инкубаторе. На всех типах глицерина, независимо от количества в нем примесей, выходы полимера и урожай биомассы были сопоставимыми, соответственно, 75-78% и 5,9-6,2 г/л, то есть для продуктивного синтеза ПГА исследуемым штаммом бактерий *C. eutrophus* B-10646 пригоден глицерин различной степени очистки. Это позволило перейти к следующему этапу, - исследованию процесса в масштабированном варианте.

Культивирование штамма *C. eutrophus* B-10646 проводили в 30-ти литровом ферментере при рабочем объеме культуры 20 л, стартовой концентрации клеток в инокуляте 2,0 – 2,5 г/л. Независимо от степени чистоты глицерина, урожай общей биомассы составил за 60 ч около 70 г/л, содержание полимера в клетках 72-73% (таблица 1).

Таблица 1.- Продукционные показатели биосинтеза ПГА в культуре *C. eutrophus* B-10646 на глицерине различной очистки

Наименование	X, г/л	ПГА, %	μ^*, $ч^{-1}$	Y_x	Y_p	Продуктивность (P), г/л*ч	
						P_x	P_p
Глицерин-I	69,3±3,5	72,1±3,6	0,101	0,38	0,29	1,10	0,81
Глицерин-II	69,8±3,5	73,3±3,6	0,097	0,39	0,29	1,15	0,90
Глицерин-III	69,3±2,9	73,3±3,2	0,100	0,36	0,26	1,15	0,89

На рисунке 5 в качестве примера приведены результаты культивирования бактерий *C. eutrophus* B-10646 на сыром глицерине.

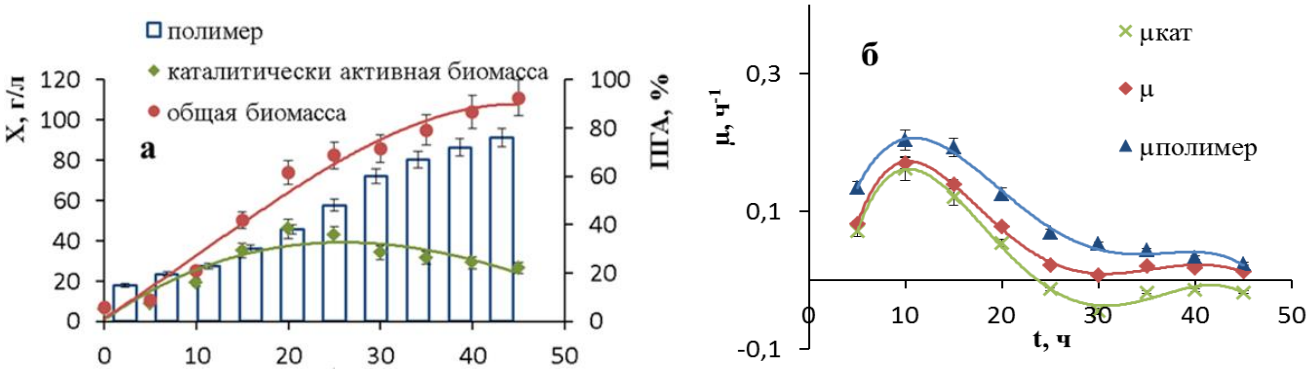

Рисунок 5. Показатели процесса синтеза ПГА в 30-л ферментере культурой C. eutrophus B-10646 на сыром глицерине: а - концентрации общей и каталитически активной биомассы клеток в культуре (г/л) и полимера в клетках (% к АСБ); б - динамика удельной скорости прироста общей (μ, $ч^{-1}$) и каталитически активной ($\mu_{кат}$, $ч^{-1}$) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ($\mu_{полимер}$, $ч^{-1}$)

Расход глицерина сырца за весь период составил 3,8±0,2 кг, что соответствует экономическому коэффициенту по полимеру Y_p – 0,26±0,02. Учитывая, что в неочищенном (сыром) глицерине его концентрация составляет 82,07 %, то экономический коэффициент в пересчёте на абсолютный глицерин сопоставим со значениями, полученными на очищенном глицерине (Y_p 0,29±0,02 г/г).

Таким образом, показано, что продукционные характеристики *C. eutrophus* B-10646 при использовании глицерина различной очистки сопоставимы; применение сырого глицерина не ингибировало рост бактерий и синтез ПГА.

4. Структура и свойства ПГА, синтезированных на глицерине

Углеродное питание оказывает влияние не только на продукционные показатели процессов микробиологического роста, но также на состав получаемых продуктов. В связи с участием глицерина в реакциях полимеризации мономеров в С-цепи и блокировании этого процесса возможно снижение общего выхода и молекулярной массы полимеров. Поэтому важное значение приобретает исследование физико-химических свойств полимеров, синтезируемых на глицерине. Образцы ПГА, синтезированные на исследованных марках глицерина, независимо от содержания основного вещества и примесей, представляли собой гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты - П(3ГБ) (таблица 2).

Таблица 2. Физико-химические свойства образцов П(3ГБ)], синтезированных на глицерине различной очитки

Субстрат	$M_ч$ кДа	$M_в$, кДа	D	C_x, %	T_g, °C	T_c, °C	T_{melt}, °C	T_{degr}, °C
Глюкоза	365	920	2,52	76	-	92	178	295
Очищенный глицерин-I	104	355	3,42	50	2,9	96	174	296
Очищенный Глицерин-II	115	416	3,63	55	-	103	176	296
Сырой глицерин-III	87	304	3,49	52	2,7	99	172	295

«-» - означает, что пик отсутствует

Все значения молекулярной массы П(3ГБ), синтезированного на глицерине, в целом ниже, чем получаемые ранее значения для образцов П(3ГБ), синтезированных на других субстратах.

В связи с тем, что глицерин действует как агент переноса цепи в полимеризации ПГА, что связано с этерификацией глицерина на концевых группах мономеров и блокированию дальнейшего процесса полимеризации С-цепи, проанализирована структура образцов полимера с применением ЯМР. Полные спектры ^{1}H ЯМР трех образцов П(3ГБ), синтезированных на трех марках глицерина, оказались сходными и показали наличие резонансов, метиловых групп в области 1,25 ppm; метиленовой группы между 2,45 и 2,65 ppm, и метиновая группа 5,25 ppm. Расширенная спектральная область между 3,0 и 4,5 м.д. (рисунок 6) с тремя резонансами 3,7 м.д., 3,95 м.д. и 4,18 м.д. показала терминальную этерификацию глицерина в П(3ГБ) через первичные

гидроксилы (положения C_1 или C_3 глицерина). Резонанс при 3,86 м.д. показал концевое присоединение глицерина к П(3ГБ) через вторичную гидроксильную группу.

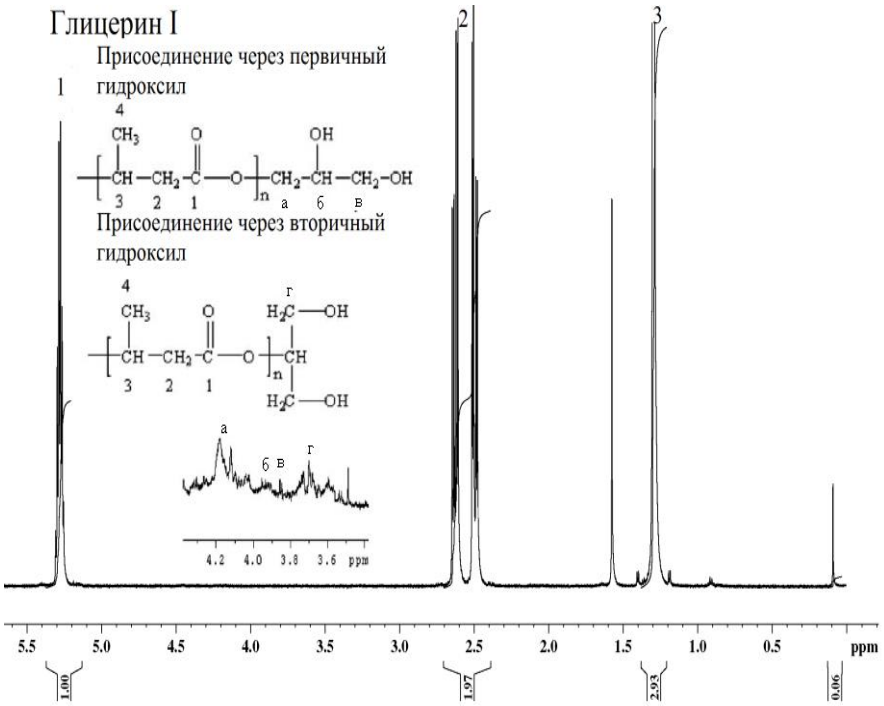

Рисунок 6. ^{1}H-ЯМР спектр П(3ГБ), синтезированного C. eutrophus B-10646 на глицерине: 1 - CH группа, 2 - CH_2 группа, 3- CH_3 группа; расширенная спектральная область между 3,0 и 4,5 м.д.: а - сигнал от атома углерода, присоединенного через первичный гидроксил, б - вторичный гидроксил свободный, в - третий гидроксил свободный, г – сигнал - присоединение через вторичный гидроксил

ПГА относятся к полукристаллическим полимерам, у которых соотношение аморфной и кристаллической фаз варьирует в зависимости от химического состава, набора и соотношения мономеров. Все три образца П(3ГБ) имели близкие значения степени кристалличности (50-55%). Отклонений в показателях температурных характеристик у исследованных образцов П(3ГБ) не обнаружено. Температуры плавления ($T_{пл}$ 172-176 °С); деградации ($T_{дегр}$ 295-296 °С) находились в ранее выявленных пределах значений с сохранением разрыва между ними порядка 100 °С, что соответствует значениям П(3ГБ), полученным на других С-субстратах (рисунок 7).

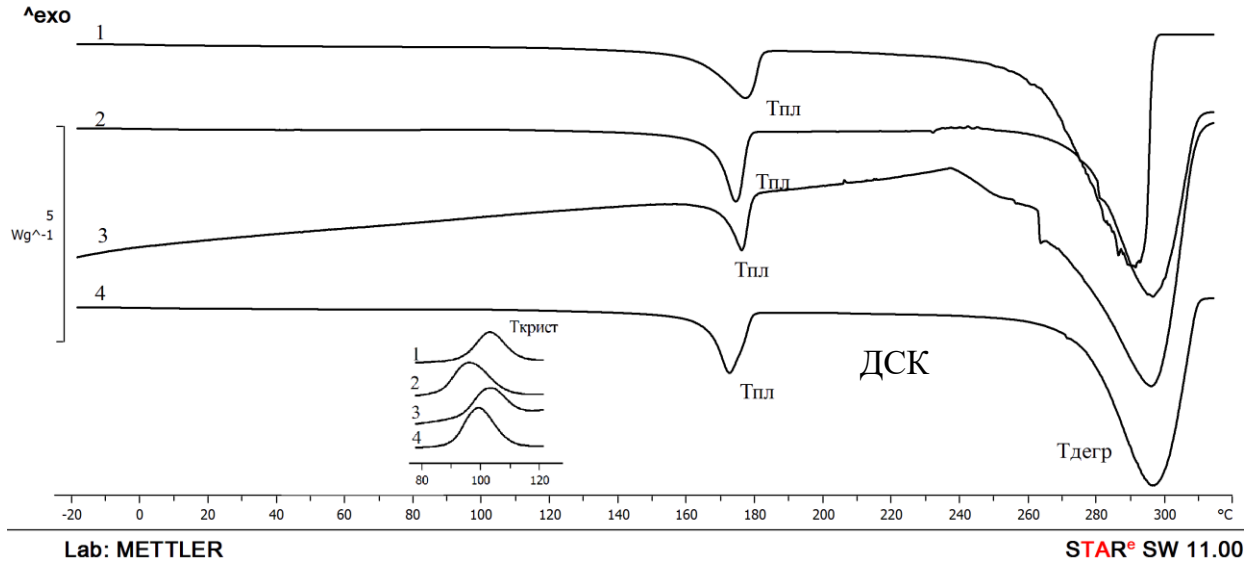

Рисунок 7. Кривые ДСК образцов П(3ГБ), синтезированных на глицерине различной очистки

Состав мономеров двухкомпонентных ПГА, синтезированных на глицерине с добавками субстратов предшественников мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидроксибутирата, подтвержден снятыми ^{1}H ЯМР спектрами и ионными хроматограммами с масс-спектрами.

Как и у ПГА, синтезированных на других углеродных субстратах, для сополимерных образцов характерно снижение значений молекулярной массы и степени кристалличности (C_x). Значения $M_в$ у сополимеров, содержащих мономеры 3ГВ и 4ГБ, находились в диапазоне от 253 до 290 кДа. (Таблица 3). Для всех образцов ПГА зафиксировано более выраженное снижение C_x по сравнению с образцами, синтезированными на глицерине без прекурсоров (в области 41-52%).

Таблица 3. - Химический состав и свойства сополимерных ПГА, синтезированных C. eutrophus B-10646 на очищенном глицерине с добавками субстратов предшественников

Субстрат	Состав полимера, мол.%			$M_ч$ кДа	$M_в$, кДа	D	C_x, %	$T_{стекл}$, °C	$T_{крист}$, °C	$T_{пл}$, °C	$T_{дегр}$, °C
	3ГБ	3ГВ	4ГБ								
Глицерин I + C_4H_9COOK (1 г/л)	72,0	28,0	0	97	253	2,6	41	-0,4	79 50	153 164	261
Глицерин I + C_2H_5COOK (1 г/л)	76,9	23,1	0	113	265	2,4	46	-0,8	67 69	171	296
Глицерин I + ε-капралактон (1 г/л)	95,0	0	5,0	111	299	2,7	52	1,0	93	157 168	296
Глицерин I + C_4H_9COOK (1 г/л +1 г/л)	64,3	35,7	0	119	287	2,4	44	-0,9	65 63	168 153	261
Глицерин I + C_2H_5COOK (1 г/л+1 г/л)	64,3	28,5	0	102	273	2,7	45	1,1	89 87	154 166	291
Глицерин I + ε-капралактон (1 г/л+1 г/л)	90,2	0	9,8	110	290	2,6	46	-0,4	77 74	151 162	263

Таким образом, исследованы условия и реализован процесс синтеза П(3ГБ) и сополимерных ПГА на глицерине. Независимо от набора и соотношения мономеров в ПГА при синтезе на глицерине происходят изменения физико-химических свойств полимеров, включающие снижение значений средневесовой молекулярной массы и степени кристалличности; последнее является значимым, так как ПГА с пониженной степенью кристалличности более технологичны и обеспечивают получение изделий более высокого качества.

5. Характеристика опытного производства

Выполненные исследования и их анализ позволили разработать исходные данные для масштабирования процесса синтеза ПГА на глицерине, которые составили основу

проекта опытного производства. Проект ОП прошел государственную экспертизу (заключение № 24-1-50196-12). Опытное производство площадью 347,1 м^2 размещено на первом этаже в 2-х этажном здании на территории Сибирского федерального университета; включает серию блоков, размещенных в специализированных помещениях, оборудованных с учетом стандарта GMP: отделение музейной культуры, отделение приготовления и стерилизации компонентов питательных сред, блок ферментации с постом дежурных операторов, блок концентрирования бактериальной биомассы, блок экстракции и очистки полимеров; вспомогательные и хозяйственные помещения.

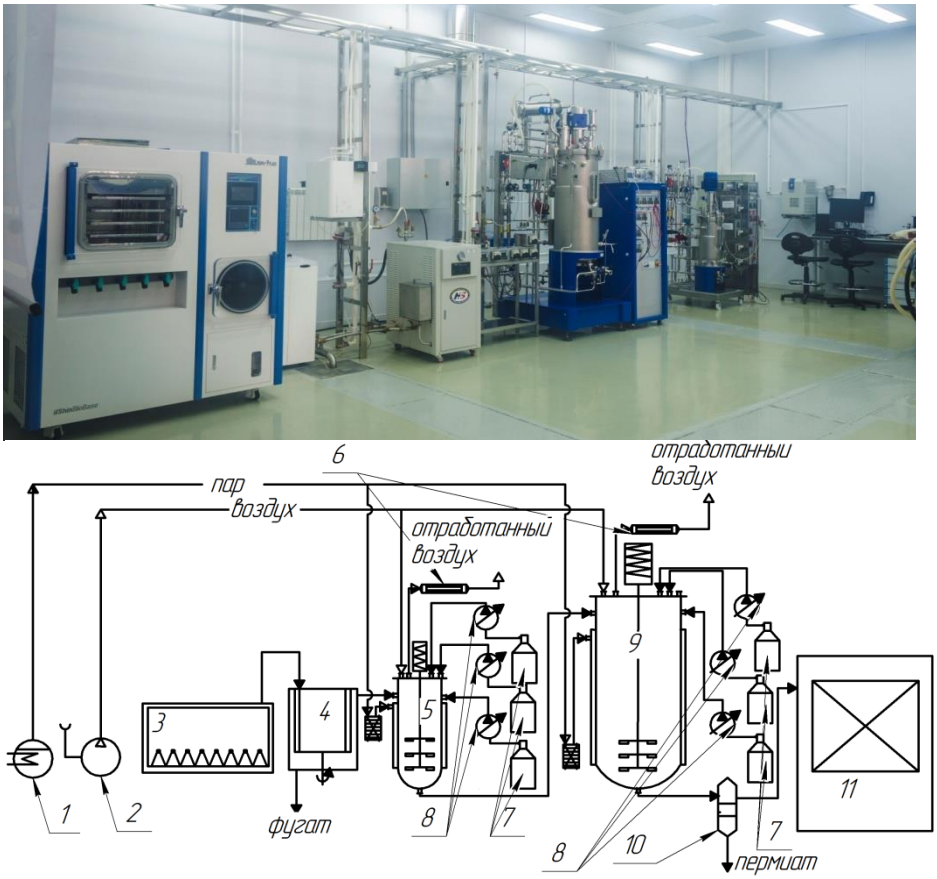

Рисунок 8. Фото и аппаратурная схема блока ферментации опытного производства ПГА: 1 – парогенератор Biotron (Корея); 2 – поршневой компрессор Remeza (Беларусь); 3 – шейкер инкубатор Innova 44 (США); 4 – центрифуга AVANTI J-HC; 5 – ферментер инокулятор NLF 30 (“Bioengjneering”-Швейцария); 6 – обратный холодильник; 7 – стеклянные ёмкости для подпиток; 8 – перистальтические насосы (Швейцария); 9 – производственный ферментёр P150 (“Bioengjneering”-Швейцария); 10 – установка ультрафильтрации АСФ20 (Россия); 11 – лиофильная сушилка LP10R (ISHin Южная Корея)

Общая технологическая схема производства ПГА в условиях ОП включает серию стадий технологического процесса: подготовки воды и воздуха; санитарную обработку помещения и оборудования; подготовку и стерилизацию компонентов питательной среды; получение инокулята из музейной культуры в колбах и последующее его наращивание в посевном ферментере объемом 30 л; биосинтез полимеров в производственном ферментере объемом 150 л; концентрирование биомассы бактерий; выделение, очистку и сушку полимера; регенерацию реагентов. Фото и аппаратурная схема блока ферментации опытного производства представлены на рисунке 8.

6. Масштабирование технологии биосинтеза ПГА на глицерине в условиях опытного производства

Для масштабирования технологии выбран вариант процесса, реализуемый на глицерине-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды). Технология включает три биотехнологические стадии: предферментационную (подготовка и стерилизация оборудования, получение инокулята и питательных сред), стадию ферментации (реализация процесса в производственном ферментере и наращивание биомассы клеток с максимальными выходами полимера) и постферментационную стадию (получение готового продукта и работа с побочными продуктами и отходами).

Исследования микробиологического статуса ОП, включающие микробиологический мониторинг всех стадий биотехнологического процесса, выявление факторов и источников потенциальной контаминации, разработанная и реализованная программа санитарно-гигиенических мероприятий, обеспечили микробиологический статус опытного производства ПГА в соответствии с действующими требованиями международных и российских стандартов.

Основной задачей на стадии получения инокулята является обеспечение физиологической активности клеток для минимизации лаг-фазы в производственном ферментере. Физиологическая активность клеток зависит от возраста культуры и внутриклеточной концентрации полимера, которая снижает дыхательную активность клеток и удельную скорость роста. Установлено, что константа ингибирования бактерий *C. eutrophus* B-10646 внутриклеточным содержанием полимера ($К_р$) составляет 20±2 %. Процесс получения инокулята реализуется в стеклянных колбах объемом 2 л на полной питательной среде в течение 15-20 ч и обеспечивает получение культуры с содержанием полимера порядка 10±5 %. Далее инокулят засевают в ферментёр-инокулятор, в котором происходит наращивание инокулята на полной питательной среде при стабилизации pH и температуры на уровне 6,8±0,2 и 30 ^{o}C. Концентрацию мочевины и глицерина в культуре поддерживают на уровне, соответственно, 0,7±0,3 и 15±5 г/л.

Полученный инокулят далее по стерильной посевной линии перекачивают в производственный ферментёр при стартовой концентрация клеток в культуре порядка 10,0±5,0 г/л. В производственном ферментере на первой стадии бактерии выращивают в режиме с лимитирующей концентрацией азота (основной фактор, стимулирующий внутриклеточную аккумуляцию П(3ГБ) (50% от физиологической потребности клеток). Все остальные компоненты среды, включая источник углерода (глицерин), макро- и микроэлементы поступают в ферментер в избытке. Показатели параметров технологического процесса (динамика потребления азота и глицерина культурой, расход воздуха, регулируемый числом оборотов мешалки, активная реакция среды) представлены на рисунке 9. На первой стадии процесса, первые 25 ч на фоне активного роста бактерий имело место наиболее активное потребление субстратов культурой. Скорость потребления глицерина (q_s) на 15 ч процесса достигала максимума (3,8±0,3 г/г·ч) и далее постепенно снижалась по мере увеличения общей биомассы бактерий в культуре до 3,1±0,2 г/г·ч. К концу первой стадии процесса (23-25 ч) концентрация биомассы составила 78,8±3,9 г/л, внутриклетчоное содержание полимера 45,0±2,2 % (рисунок 9 а). Скорость потребления мочевины культурой ($q_{карб}$) также возрастала на первом этапе, достигала максимума на 10 – 15 ч (0,61±0,05 г/г·ч) (рисунок 9 в). Концентрация растворённого кислорода поддерживалась на уровне 2,4 – 3,0 мг/л (DO 30 %). Максимальный расход воздуха зафиксирован к концу первой стадии процесса (15-20 ч) и составил 200 нл/ч (рисунок 9 г).

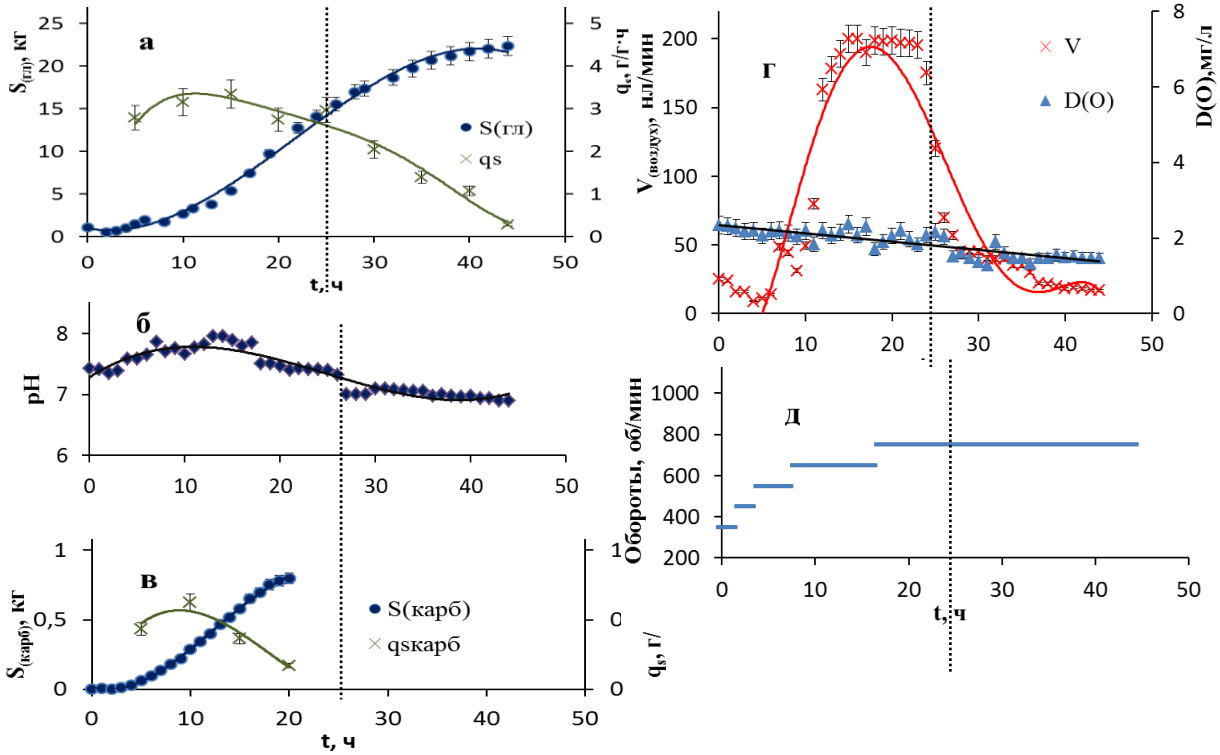

Рисунок 9. Технологические параметры процесса синтеза ПГА в культуре C.eutrophus B-10646 в производственном ферментере ОП на глицерине: а – потребление глицерина культурой C.eutrophus B-10646 (S) и скорость потребления культурой глицерина (q_s); б - изменение pH в процессе; в - потребление карбамида ($S_{карб}$) и скорость потребления карбамида ($q_{карб}$); г - расход воздуха (V) и поддерживаемая концентрация растворённого кислорода (D(O)); д - обороты мешалки

Продукционные показатели культуры *C. eutrophus* B-10646 в производственном ферментере на глицерине иллюстрирует рисунок 10. Максимальные значения удельной скорости роста бактерий по общей и каталитически активной биомассе имели место в начальный период первой стадии процесса на полной питательной среде с лимитированной подачей азота, составив, соответственно, 0,17±0,01 $ч^{-1}$ и 0,16±0,01 $ч^{-1}$ при удельной скорости синтеза П(3ГБ) на уровне 0,20±0,02 $ч^{-1}$ (рисунок 10 б).

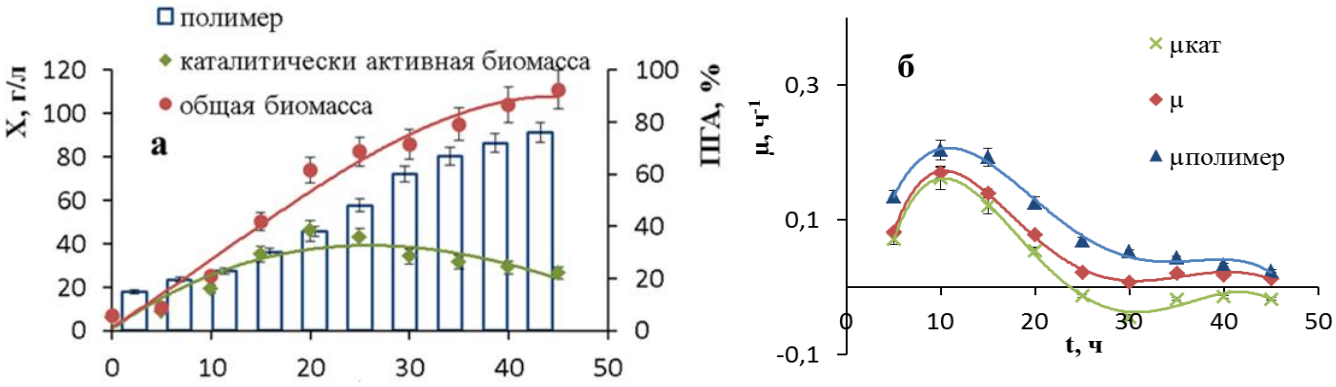

Рисунок 10. Показатели культуры C. eutrophus B10646 в производственном ферментере ОП на глицерине: а - концентрации биомассы клеток в культуре (общей и каталитически активной, г/л) и полимера в клетках (% к АСБ) на глицерине; б - динамика удельной скорости прироста общей (μ, $ч^{-1}$) и каталитически активной ($\mu_{кат}$, $ч^{-1}$) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ($\mu_{полимер}$, $ч^{-1}$) на глицерине

На втором этапе, начиная с 23 ч, процесс продолжали в безазотной среде. Наблюдаемый прирост общей биомассы происходил в основном в результате накопления в клетках полимера, так как собственно рост клеток имел тенденцию к снижению (рисунок 10 б). Удельная скорость роста по общей биомассе к концу второй стадии составила 0,013±0,001 $ч^{-1}$; по каталитически активной биомассе снижалась до нуля, а к концу процесса принимала отрицательные значения. Удельная скорость синтеза полимера к началу второй стадии была на уровне 0,070±0,004 $ч^{-1}$ с последующим снижением (рисунок 10 б). В целом, за процесс экономический коэффициент по глицерину для биомассы и полимера составил, соответственно, 0,43 и 0,32 кг/кг глицерина.

По завершении процесса объём культуры составил 90 л; урожай общей (валовой) биомассы (X, г/л) 110±5,5 г/л; внутриклеточное содержание полимера 76,1±2,3 %. Полученные значения продуктивности процесса в производственном ферментере, составили по общей (валовой) биомассе 2,29±0,01 г/л·ч; по полимеру 1,83±0,06 г/л·ч. Эти показатели превышают ранее полученные на глюкозе в аналогичных условиях культивирования данного штамма бактерий.

7. Материальные затраты и экономическая оценка процесса биосинтеза ПГА на глицерине

На основе полученных экспериментальных данных в условиях опытного производства определена структура затрат на получение ПГА (рисунок 11).

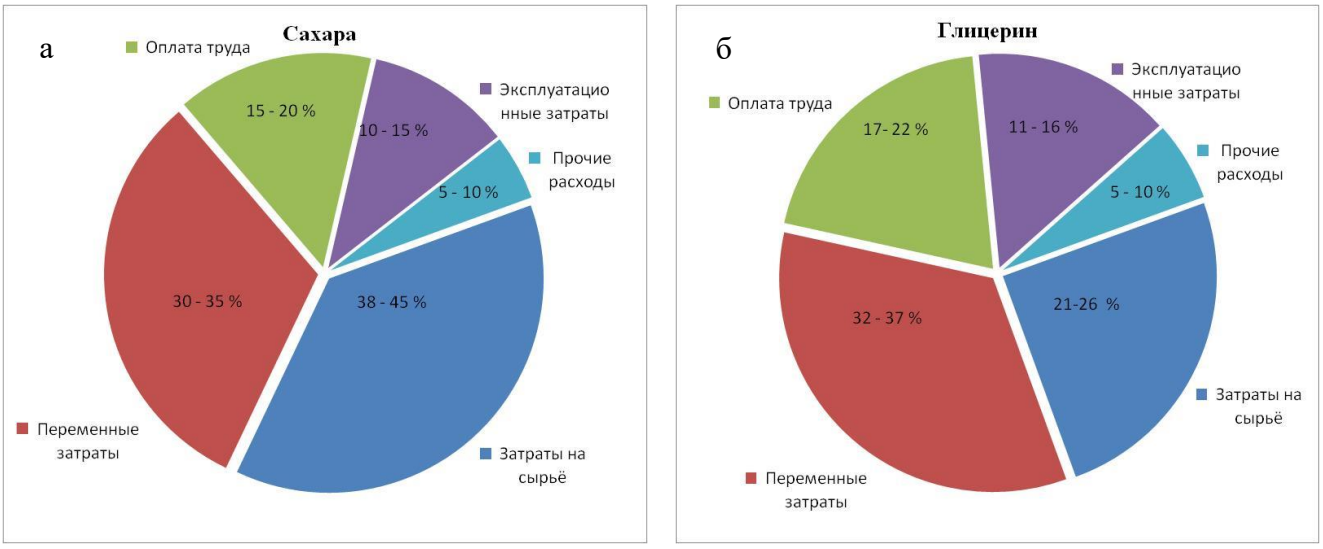

Рисунок 11. Структура затрат при производстве ПГА: а - структура затрат на сырьё и материалы с использованием глюкозы; б - структура затрат на сырьё и материалы с использованием глицерина

Основные затраты приходятся на стадию ферментации, в том числе - затраты на компоненты питательной среды, а также реагенты, используемые для выделения полимера из биомассы. Выполненная предварительная экономическая оценка показала, что наибольшие затраты приходятся на основные средства, расходные материалы и реагенты.

Если капитальные затраты можно отнести к переменным издержкам, влияние которых на итоговую стоимость будет со временем снижаться, то затраты на сырьё и материалы имеют постоянный характер, и их стоимость может колебаться в

зависимости от объемов производства и конъюнктуры рынка.

В значительной мере конечная стоимость ПГА определяется стоимостью материалов и субстратов, используемых для их производства. Затраты на С-сырьё при использовании глюкозы в структуре себестоимости биосинтеза ПГА составляют до 45%, на растворители для выделения и очистки ПГА до 47%. Высокие цены на реагенты, используемые для экстракции полимера, нивелируются разработанной и реализованной технологией их возврата в процесс и многократным использованием. На основе полученных экспериментальных данных в условиях опытного производства определена структура затрат на получение ПГА (рисунок 11 а, б). Показано, что при замене глюкозы глицерином затраты на сырье в общей структуре затрат на производство ПГА снижаются на 17 - 19%.

В таблице 4 представлено сравнение удельных затрат и стоимость различных углеродных субстратов на производство ПГА.

Таблица 4 - Затраты на углеродные субстраты на производство 1 кг ПГА

Наименование субстрата	Стоимость субстратов, руб/кг	Расход субстрата, кг/кг ПГА	Удельная стоимость субстрата, руб/кг ПГА
Фруктоза	101,00	3,0	303,0
Глюкоза	69,00	2,8	193,2
Очищенный глицерин «Duth glycerol refinery», Нидерланды	59,00	3,0	177,0
Неочищенный, сырой глицерин «Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия	44,00	3,1	136,4

Следует отметить, что на синтез ПГА штаммом *C. eutrophus B*-10646 удельный расход различных субстратов (сахаров и глицерина) сопоставим. Однако с учетом различной стоимости сахаров и глицерина, показано, что наибольшие затраты приходятся на фруктозу и составляют 303,0 руб/кг полимера. При замене фруктозы глицерином затраты на углеродный субстрат снижаются на 41,6% при использовании очищенного глицерина и на 55% при использовании «сырого» глицерина. При замене глюкозы глицерином затраты на углеродный субстрат снижаются на 8,4% при использовании очищенного глицерина и на 29,4% при использовании «сырого» глицерина. Таким образом, разработанная и реализованная в опытном варианте технология синтеза ПГА на глицерине, обеспечивает эффективный процесс получения полимеров при значительном снижении затрат на производство.

ВЫВОДЫ:

1. Проведено сравнительное исследование способности природных штаммов водородокисляющих бактерий *Ralstonia eutropha* В-8562, *Ralstonia eutropha* В-5786 и *Cupriavidus eutrophus* В-10646 синтезировать полигидроксиалканоаты (ПГА) при культивировании на глицерине в качестве единственного С-субстрата. Установлено, что наиболее высокие выходы биомассы бактерий и полимеров, сопоставимые с этими показателями при использовании сахаров, характерны для штамма *C. eutrophus* В-10646. Показано, что данный штамм обладает способностью синтезировать на глицерине поли-3-гидроксибутират [П(3ГБ)] и сополимерные ПГА с макровключениями 3-

гидроксивалерата (3ГВ до 35,7 мол%) и 4-гидроксибутирата (4ГБ до 9,7 мол%) при добавках в культуральную среду валерата калия, пропионата калия или ε-капралактона.

2. Исследовано влияние концентрации глицерина на рост *C. eutrophus* B-10646 и показана возможность культивирования бактерий при изменении концентрации глицерина от 1,0 до 60,0 г/л с широким плато насыщения в диапазоне 1,0-30,0 г/л. На основе анализа зон лимитирования и ингибирования роста бактерий определены субстратные константы для культуры бактерий по глицерину, составившие для K_s и K_i, соответственно, 0,004 и 0,673 моль/л.

3. Исследовано влияние глицерина разной степени чистоты с содержанием примесей от 0,3 до 17,9% на рост бактерий *C. eutrophus* B-10646 и выход полимера. Показано отсутствие негативного влияния примесей на продукционные характеристики штамма *C. eutrophus* B-10646.

4. Синтезирована серия образцов ПГА в культуре *C. eutrophus* B-10646 на глицерине разной степени чистоты в качестве единственного источника углерода и исследованы физико-химические свойства полученных полимеров. Показано что, влияние глицерина, участвующего в полимеризации С-цепи ПГА, проявляется в снижении средневесовой молекулярной массы до 304-416 кДа и повышении полидисперсности до 3,42-3,63. Обнаружено, что при синтезе на глицерине происходит выравнивание упорядоченной и неупорядоченной зон и амморфизация полимеров, снижающая степень кристалличности до 50-55% у П(3ГБ) и до 41-52% у сополимеров.

5. Процесс синтеза ПГА *C. eutrophus* B-10646 при культивировании на глицерине реализован в ферментере объемом 30 л. Исследованы кинетические и продукционные характеристики культуры, положенные в основу исходных данных технологии биосинтеза ПГА на этом субстрате. Определено, что концентрация клеток в инокуляте должна быть не менее 2,0 г/л с содержанием полимера до 20% при урожае биомассы и выходу полимера порядка 70±5 г/л и 75±5%, соответственно; значениях средней удельной скорости роста 0,1 $ч^{-1}$, экономическому коэффициенту по биомассе и полимеру 0,38 и 0,29 г/г.

6. Разработан проект, утвержденный госэкспертизой РФ, проведен подбор и комплектация оборудования, выполнены пуско-наладочные работы и введёно в эксплуатацию опытное производство полигидроксиалканоатов производительностью до 500 кг полимера в год, включающее отделения: подготовки инокулята и сред, ферментации с пилотными ферментерами объемом 30 и 150 л, блок выделения и очистки полимеров.

7. Технология синтеза ПГА на глицерине масштабирована в условиях опытного производства; достигнутые показатели по урожаю общей биомассы и выходу полимера составили 110±5,5 г/л и 76,1±2,3% при высоких значениях продуктивности по биомассе и полимеру, соответственно, 2,29±0,1 и 1,83±0,06 г/л·ч, что превышает показатели на глюкозе и известные зарубежные решения.

8. Определены удельные материальные затраты на синтез ПГА на очищенном и сыром глицерине и показано снижение затрат на углеродный субстрат на 8,4 и 29,4%, соответственно по сравнению с глюкозой и на 41,6 и 55%, соответственно по сравнению с фруктозой.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Volova T., **Demidenko A.,** Kiselev E., Baranovskiy S., Shishatskaya E., Zhila N. Polyhydroxyalkanoate synthesis based on glycerol and implementation of the process under conditions of pilot production // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2019. - V.103 (1). - P. 225-237.

2. Киселев Е.Г., **Демиденко А.В.,** Барановский С.В., Волова Т.Г. Масштабирование технологии синтеза биодеградируемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 134-147.

3. Киселев Е.Г., **Демиденко А.В**. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 148-160.

4. **Демиденко А.В**., Виноградова, О.Н., Киселев, Е.Г. Влияние режима высушивания бактериальной биомассы на полноту экстракции и физико-химические свойства продукта (полимера) // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2016. – Т. 9, № 2. – С. 180-189.

5. Киселев Е.Г., **Демиденко А.В.**, Барановский С.В. Пилотное производство полигидроксиалканоатов // Материалы I Международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 10-14 октября 2016, Красноярск. С. 37-39.

6. **Демиденко А.В.**, Сырвачева Д.А., Киселев Е.Г. Глицерин как субстрат для биосинтеза разрушаемых биопласткиов полигидрокисалканоатов // Материалы II Международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 24-29 сентября 2017, Красноярск. С. 37-39.

7. **Демиденко А.В.**, Барановский С.В., Киселев Е.Г. Масштабирование технологии биосинтеза ПГА на глицерине в условиях опытного производства // Материалы III Международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 30 сентября - 4 октября 2018. Красноярск. С. 69-71.

8. Прудникова С.В., **Демиденко А.В.**, Киселев Е.Г. Микробиологический статус опытного производства разрушаемых биополимеров (ПГА) // Материалы III Международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 30 сентября - 4 октября 2018. Красноярск. С. 62-65.

9. **Демиденко А.В.**, Жила Н.О. Исследование возможности синтеза сополимерных полигидроксиалканоатов (ПГА) на глицерине // Материалы III Международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 30 сентября - 4 октября 2018. Красноярск. С. 65-67.

10. **Демиденко А.В.**, Барановский С.В., Киселев Е.Г. Влияние степени очистки глицерина – отхода производства биодизеля, на продукцию поли-3-гидроксибутирата в культуре *C. eutrophus B*-10646 // Материалы III Международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 30 сентября - 4 октября 2018. Красноярск. С. 67-69.

11. **Демиденко А.В.**, Жила Н.О., Киселев Е.Г.. Структура и свойства полигидроксиалканоатов (ПГА), синтезированных на глицерине // Материалы III Международной конференции «Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни», 30 сентября - 4 октября 2018. Красноярск. С. 71-73.

12. **Demidenko A.,** Kiselev E., Baranovskiy S., Volova T. Production and characterization of PHA from biodiesel-glycerol by Cupriavidus eutrophus B10646 // Abstract of 9th International conference “Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety - Toxicology and Ecology Issues". 06-13 May 2018. - Heraklion, Crete - Greece. P. 38.

13. **Demidenko A.,** Kiselev E., Baranovskiy S., Volova T. New technology synthesis of biodegradable bioplastics on glycerol // Abstract of 6th Int. Conference on Natural Polymers, Bio-Polymers, Bio-Materials . 07-09 December 2018. - Kottayam, Kerala - India. P. 4.