Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) –
обособленное подразделение Институт биофизики
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Демиденко Алексей Владимирович

ТЕХНОЛОГИЯ БИОСИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ НА ГЛИЦЕРИНЕ И РЕАЛИЗАЦИЯ ОПЫТНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехологии)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Волова Татьяна Григорьевна

Красноярск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Освоение новых технологий, ориентированных на комплексную переработку отходов и воспроизводство целевых продуктов, получение экологически чистых энергоносителей и материалов, соответствует концепции экологически безопасного устойчивого промышленного развития. Успехи современной биологии, создали предпосылки к образованию комплекса перспективных направлений биотехнологии, которые оказывают влияние на многие сферы деятельности человека и способны решать ключевые проблемы XXI века. Источником для получения разнообразных целевых продуктов медицинского, пищевого и технического назначения служат микроорганизмы. Научной базой для реализации новых биотехнологий является знание закономерностей влияния физико-химических условий среды на синтез клеточных молекул микроорганизмами.

Современным высокорейтинговым направлением планетарного масштаба является развитие индустрии экологически чистых биодеградирующих пластиков. Связано это с тем, что объемы производства синтетических пластмасс составляют более 350 млн. тонн в год, и постоянно растут. Львиная доля пластмасс аккумулируется в виде отходов на свалках, как на суше, так и в океане, причиняя глобальный ущерб природе. Учитывая, что 90 % пластмасс производится из – нефти и газа (не возобновляемых природных ископаемых) поиск альтернативных источников очень актуален.

Учитывая вышесказанное, особый интерес представляют перспективные для применения в различных сферах полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты), обладающие набором ценных свойств, таких как биосовместимость и биоразрушаемость [Byron,1989;1994; Anderson, Dawes,1990; Steinbüchel,1992; Doi,1995; Lee et al., 1995; Madison, Huisman, 1999; Sudesch et al., 2000; Volova, 2004; Volova et al., 2013;2017]. За рубежом коммерциализацией биосинтеза полигидроксиалканоатов (ПГА) занимаются

многие промышленные фирмы и компании («Monsanto Company», «Bioscience Ltd.», «Metabolix Inc.», «Merck», «Procter & Gamble», «Tepha», «Berlin Packaging Corp.», «BioVentures Alberta Inc.» и др.), разрабатывающие технологии биосинтеза ПГА, используя разные субстраты, в том числе отходы [Plastic from Bacteria, 2010; Laycock et al., 2013; Tan et al., 2014; Saharan et al., 2014; Shankar et al., 2015; Rebouillat, Pla, 2016; Koller et al., 2017; Kourmentza et al., 2017].

В РФ первое отечественное опытное производство ПГА было создано и введено в эксплуатацию на территории Красноярского научного центра СО РАН при совместной работе Института биофизики СО РАН и отдела Биотехнологии ОАО «Биохиммаш» (г. Москва) [Волова с соавт., 2006]. В основу процесса была положена технология с использованием штамма бактерий *Ralstonia eutrophus* B-5786, культивируемых 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 культивирования на более доступной глюкозе при продуктивности процесса, вдвое превосходящей ранее достигнутые показатели в культуре *R. eutrophus* B-5786 на фруктозе [Киселев с соавт., 2012].

Увеличение объемов производства и расширение сфер применения ПГА ограничено их стоимостью. При производстве ПГА 40-50 % издержек составляют затраты на углеродное сырьё, поэтому расширение сырьевой базы и привлечение новых доступных субстратов приобретает все большую значимость, наряду с привлечением штаммов-продуцентов, обладающих высокой продуктивностью и созданием эффективных процессов биосинтеза. Среди перспективных субстратов для крупнотоннажного производства ПГА рассматривается глицерин, масштабы производства которого возрастают в связи с ростом производства биодизеля как альтернативного нефти возобновляемого источника энергии [Posada et al., 2011; Fernandez-Dacosta et al., 2015]. Согласно оценке аналитиков Oil World по итогам 2016 г., мировое производство биодизеля достигло рекордных 33 млн. тонн; 10% от этих объемов составляет глицерин как побочный продукт. За рубежом активно исследуются процессы синтеза ПГА на глицерине различной степени очистки с

использованием природных, мутантных и рекомбинантных бактериальных штаммов. Достигнутые в лабораторных условиях уровни продуктивности по урожаю биомассы бактерий и выходу полимеров значительно варьируют, что связано с наличием в глицерине примесей, негативно влияющих на молекулярную массу полимеров и общие выходы целевого продукта [Kumar et al., 2017; Paula et al., 2017; Hsiao et al., 2018]. В целом, анализ публикаций свидетельствует о несомненной перспективности глицерина в качестве субстрата для получения ПГА. Однако для улучшения продукционных показателей производства ПГА на глицерине необходимы поиски новых бактериальных штаммов-продуцентов и совершенствование технологических стадий процесса, в том числе в масштабированных вариантах.

Масштабирование лабораторных биотехнологий получения целевых продуктов и их реализация 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, необходимые для проведения комплекса необходимых испытаний, и исходные данные для последующего масштабирования технологии.

Учитывая вышесказанное, была определена тематика диссертационной работы, которая направлена на расширение сырьевой базы микробиологического синтеза 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 поставленной цели сформулирован следующий ряд **задач:**

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 источника (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 объём задач сформулирован впервые. Решение поставленных задач 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.

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 11 печатных работ: 4 статьи в журналах из списка ВАК, 7 - в сборниках докладов научных конференций.

Личный вклад. Автор непосредственно участвовал во всех этапах исследовательской работы: формулировке цели и задач, подборе и отработке методов исследований, реализации экспериментов с последующей обработкой и анализе результатов, а также в подготовке печатных материалов.

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

Благодарность.

Автор безгранично благодарен своему научному руководителю Воловой Татьяне Григорьевне за помощь в диссертационной работе на всех этапах и постоянное внимание.

Автор благодарит сотрудников ЛХАБ ИБФ СО РАН за помощь в проведении экспериментов и обсуждении результатов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Полигидроксиалканоаты - объект и продукт биотехнологии

Объемы производства синтетических пластмасс превысили 350 млн. тонн в год; до 50 % объема производимых пластиков используется в качестве упаковки и тары, поэтому основная часть полимерных отходов аккумулируется на свалках. И только 16–20 % полимерных отходов подвергается повторной переработке в развитых странах [Kijchavengkul T. et al., 2008]. Каждый год под полигоны твердых бытовых отходов отчуждаются плодородные земли. Пластиковый мусор загрязняет водоемы и выводит из строя инженерные системы городов, [European Bioplastics, 2015;2016]. С целью снижения риска аккумуляции и неконтролируемого распространения в биосфере химических продуктов необходим переход на использование материалов нового поколения, экологически безопасных для окружающей среды и полезной биоты, за счет разработки и применения разрушаемых полимерных материалов. Решающим для расширения сфер и применения новых полимерных материалов является увеличение масштабов их производства, наблюдаемое в настоящее время. Так, если в 2013 году мировые объемы производства разрушаемых биопластиков составили 5,1 млн. тонн, то к 2020 году ожидается рост до 17,0 млн. тонн [Aeschelmann and Carus, 2015].

Среди разрушаемых полимеров (полилактиды, полигликолиды, полиэтиленгликоль, поликапролактан, полиуретаны и др.) особое место принадлежит термопластичным биоразрушаемым биопластикам микробиологического происхождения. Это семейство полимеров запасной природы, так называемые полигидроксиалканоаты (ПГА), биосовместимые и биодеградируемые пластмассы с разнообразным химическим составом, которые обладают различными физико-химическими свойствами. Биосинтез

ПГА осуществляют микроорганизмы прокариоты в условиях несбалансированного роста для запаса энергии и углерода. Эти условия специфичны: для одной группы продуцентов главным фактором, стимулирующим суперпродукцию ПГА, является лимитирование роста бактерий биогенными элементами (азот, сера, фосфаты), для другой группы недостаток кислорода или других компонентов питательной среды [Park et al., 2011; Kessler, Witholt, 2001; Steinbüchel, Füchstenbusch, 1998]. Поэтому для высокопродуктивного биосинтеза ПГА необходимо привлечение новых продуцентов и создание условий, способствующих максимальному внутриклеточному накоплению полимеров у конкретных штаммов продуцентов.

В основополагающей работе профессора Александра Штайнбюхеля с соавтором [Steinbüchel A., Valentin H.E., 1995] дано представление о разнообразии ПГА, механизме их образования и природе микроорганизмов-продуцентов. Полигидроксиалканоаты образованные гидроксикислотами с разной длиной углеродной цепи подразделяются на три основные группы: состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от трех до пяти углеродных атомов - короткоцепочечные (short-chain-length, SCL); состоящие из кислот с длинной С-цепи от 6 до 14 атомов углерода среднецепочечные (medium-chain-length, MCL) и длинноцепочечные (long-chain-length, LCL) с длинной С-цепи 17-18 атомов углерода. Это открывает возможности на основе данных полимеров получать биоматериалы с различными базовыми свойствами.

У ПГА огромные перспективы для применения, например в качестве высокотехнологичных изделий для биомедицины или в качестве одноразовой биоразлагаемой упаковки и тары [Lemoingne, 1927; Macrae, Wilkinson, 1958; Романов,1977; Senior,1984; Byron,1987; Byron,1989; Anderson, Dawes,1990; Steinbüchel,1992; Doi,1995; Lee et al., 1995; Madison, Huisman, 1999; Sudesch et al., 2000; Volova, 2004; Plastic from Bacteria, 2010; Laycock et al., 2013; Volova et al., 2013; 2017; Tan et al., 2014; Saharan et al., 2014; Shankar et al., 2015; Rebouillat, Pla, 2016; Kourmentza et al., 2017].

1.2 Биосинтез ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются резервными макромолекулами клетки (депо энергии и углерода) и синтезируются микроорганизмами прокариотами в специфических условиях несбалансированного роста, когда биосинтез основных соединений (белка и нуклеиновых кислот) ограничен, исключение составляет штамм *Alcaligenes latus* [Antonio et al., 2000; Sudesh et al., 2000]. Параметры, благодаря которым происходит изменение направления конструктивного обмена клеток с белковой программы в сторону синтеза и накопления резервных макромолекул, в частности ПГА, определяются состоянием цитоплазмы, внутриклеточной концентрацией пирувата и свободного CoA [Senior, Dawes,1973]. При оптимальных параметрах культивирования продуцентов пируват и восстановительные эквиваленты в виде NADH и NADPH распределяются преимущественно в цикле трикарбоновых кислот на создание аминокислот и на преобразование энергии в клетке; при этом сохраняется высокий уровень свободного CoA, что препятствует биосинтезу полимера (Рисунок 1.1).

В синтезе ПГА участвуют следующие основные ферменты: β-кетотиолаза (β-КТ), ацетоацетил-CoA-редуктаза (АА-CoA-редуктаза) и ПГА-синтаза, контролируемые следующими генами – соответственно ПГА-синтазой (phbC), β-кетотиолазой (phbA) и NADP+-зависимой ацетоацетил-CoA редуктазой (phbB). У представителей *Ralstonia eutropha* эти гены сцеплены в опероне phbCAB под одним промотором (рис.1.2) [Madison, Huisman,1999]. В несбалансированной культуральной среде, например при лимите азота или кислорода, пируват не включается в цикл трикарбоновых кислот, а подвергается карбоксилированию с образованием ацетил-CoA, уровень свободного CoA при этом является низким. При таких условиях происходит активизация ферментов цикла биосинтеза поли-3-гидроксибутирата (далее П3ГБ) [Chanprateep, 2010; Chanprateep, Kulpreecha, 2006]. Управление

процессом биосинтеза П(3ГБ) может происходить на уровне экспрессии генов в специфических условиях (лимита питательных элементов в среде) или на уровне управления активности ферментов специфическими клеточными составляющими, выступающими для них в качестве субстрата или ингибитора.

В обзорной публикации [Chen, 2010] описаны возможные биохимические пути синтеза ПГА в прокариотах. В различных микроорганизмах с привлечением различных С-субстратов биосинтез ПГА может осуществляться по 8-ми биосинтетическим путям (Рисунок 1.1). Это открывает пути для направленного биосинтеза ПГА различной структуры.

Внутриклеточный метаболизм ПГА носит циклический характер. Уже в ранних работах профессора Г. Шлегеля с соавторами было показано, что при утилизации полимера образуются интермедиаты - 3-гидроксибутират, ацетоацетат, ацетоацетат-КоА и ацетил-КоА [Oeding, Schlegel, 1973; Hippe, Schlegel, 1967]. Процессы эндогенной деградации ПГА сказываются негативно как на общих выходах полимера, так и на его молекулярно-массовых характеристиках. Это усугубляет сложный процесс синтеза ПГА и затрудняет получение высоких выходов полимера, синтезируемого при лимитированных условиях роста продуцентов.

Таким образом, в связи с тем, что аккумуляция полигидроксиалканоатов у подавляющего количества микроорганизмов наиболее активно происходит при несбалансированном росте (за исключением *Alcaligenes latus*), основной проблемой при разработке технологии микробиологического синтеза становится нахождение условий, способствующих одновременно получать высокие урожаи биомассы и высокие выходы целевого продукта. Как правило, для этого предлагаются периодические двустадийные процессы, включающие наращивание биомассы на первом этапе при оптимальных условиях культивирования и синтез собственно полимера в неоптимальных условиях - на втором, например, на безазотной среде.

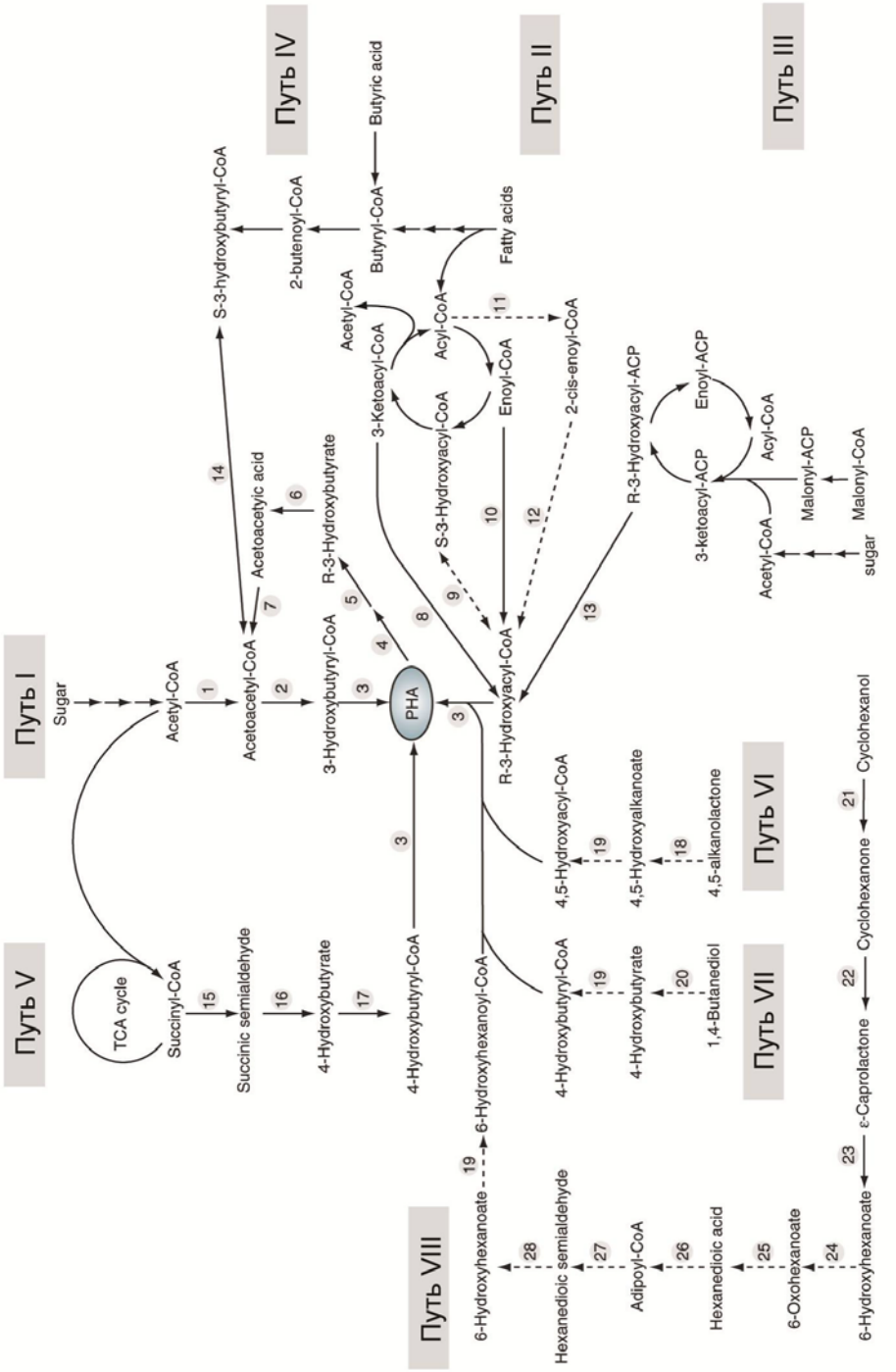


Рисунок 1.1. Биохимические пути синтеза ПГА на различных С-источниках [Chen, 2010]

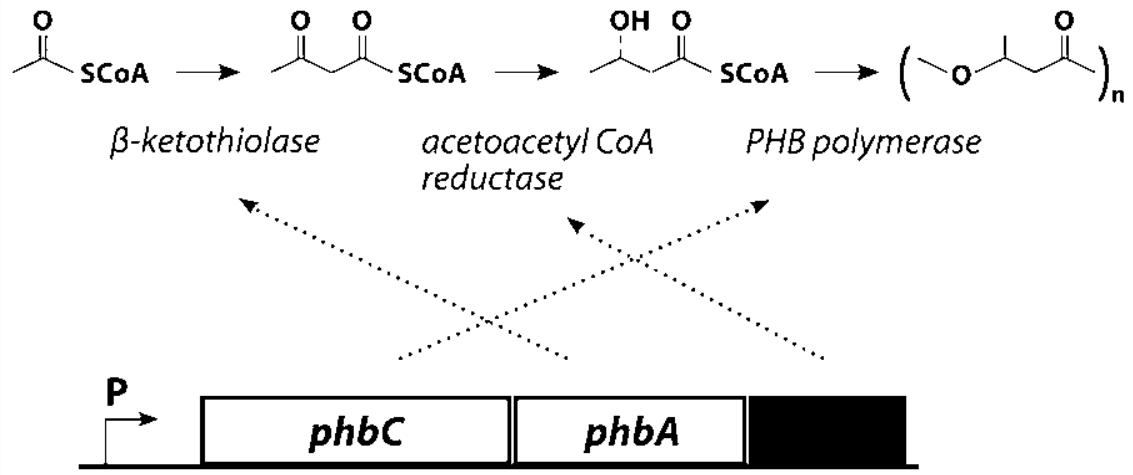


Рисунок 1.2. Стадии биосинтеза поли-3-гидроксибутирата бактериями *Ralstonia eutropha*. Основные ферменты катализаторы: β-кетотиолаза (PhbA), ацетоацетил-CoA редуктаза (PhbB), ПГА-полимераза (синтаза) (PhbC) [Madison, Huisman, 1999].

1.3 Штаммы продуценты ПГА

Количество штаммов продуцентов, способных синтезировать и накапливать ПГА, превышает 300 видов; среди них присутствуют природные и генетически модифицированные штаммы продуценты. Многие природные продуценты ПГА, такие как *Ralstonia eutropha, Alcaligenes latus, Pseudomonas, Aeromonas, Rhodococcus ruber, Syntrophomonas wolfei* и др., способны синтезировать широкий спектр ПГА в зависимости от источника углерода и условий культивирования. В ряду известных штаммов продуцентов – анаэробные, аэробные, гетеротрофные, хемоорганотрофные, хемоавтотрофные, фототрофные прокариоты, олиготрофные полипростековые бактерии, анаэробные фототрофные бактерии, аэробные фотобактерии, архебактерии и др. [Lee et al., 1995; Du et al., 2012; Tan et al., 2014; Shankar et al.,2015; Chen et al., 2016; Sabbagha, Muhamada, 2017]. На первых порах для крупномасштабного использования рассматривали всего несколько видов продуцентов: хемоорганотрофный штамм *Ralstonia,* способный утилизоровать различные

углеродные субстраты, а также гетеротрофные штаммы продуценты (*Pseudomonas, Methylotrophus, Azotobacter, Methylobacterium*) [Lee et al., 1995; Madison, Huisman. 1999; Chen, 2009;2010; Chen et al., 2016; Mozejko-Ciesielska, Kiewisz,2016; Sabbagha, Muhamada, 2017; Kourmentza et al., 2017]. В настоящее время накоплен большой объём знаний, направленный на конструирование и исследование генетически модифицированных микроорганизмов – штаммов продуцентов ПГА. Получены высокопродуктивные рекомбинантные штаммы-продуценты полигидроксиалканоатов [Madison, Huisman, 1999; Kourmentza et al., 2017], в т.ч. на основе *E.coli*, [Lee, Chang, 1994; Lee 1996; Liu, Steinbüchel, 2000; Klinke et al., 1999]; *Pseudomonas putida* [Boynton et al., 1999]; дрожжей, а также трансгенные высшие растения с генами синтеза П(3ГБ) - *Arabidopsis thaliana* [Poirier et al., 1992;1995].

Основными критериями выбора штамма продуцента ПГА являются следующие показатели: продуктивность по биомассе клеток и полимеру, затраты углеродного субстрата на биосинтез полимера, химический состав полимера (таблица 1.1). Представители *Cupriavidus necator* (ранее *Wautersia eutropha, Ralstonia eutropha, Alcaligenes eutrophus*), имеют наиболее сильную внутриклеточную систему синтеза этих полимеров. Бактерии, принадлежащие к этому таксону, аккумулируют ПГА различной химической структуры с высокими выходами при выращивании на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств. Доминирующим мономером в ПГА, синтезируемых природными штаммами *R. eutropha*, однако, является короткоцепочечный 3-гидроксибутират. Выходы П3ГБ могут достигать в специализированных режимах до 80–90 % от веса сухой биомассы. Описанные в литературе достигнутые уровни включений среднецепочечных мономеров (3-гидроксигексаноата, 3-гидроксиоктаноата) в многокомпонентные ПГА поначалу не превышали 1–2 мол.%. В результате комплексных исследований закономерностей образования ПГА у бактерий *R. eutropha* B-5786, выполненных в Институте биофизики СО РАН, реализованы режимы биосинтеза, позволившие синтезировать спектр многокомпонентных ПГА, в

том числе новой химической структуры [Волова Т.Г. с соавт., 2011; Volova T.G. et al., 2008; Volova T.G. et al., 2014; Volova T.G. et al., 2013; Volova T.G. et al., 2016b; Volova T.G. et al., 2016a; Volova T.G. et al. Polymer., 2016c; Волова Т.Г., с соавт., 2017; Виноградова О.Н., Сырвачева Д.А., 2014].

Alcaligenes latus также считается перспективным продуцентом ПГА, но, в отличие от *R. eutropha*, эти микроорганизмы характеризуются способностью синтезировать ПГА при продуктивном росте без каких-либо ограничений компонентами среды. В связи с тем, что эти микроорганизмы аккумулируют ПГА при высоких значениях скорости роста, выращивание проводят в одну стадию или в проточном режиме при наиболее высоких из известных в настоящее время значениях продукции (за 18 ч ферментации урожай и концентрация полимера в культуре достигают соответственно 142 и 68 г/л) [Lee Y. et al.,1996]. Бактерии *Pseudomonas putida* способны синтезировать разнообразные по составу ПГА при росте на глюкозе и различных жиросодержащих субстратах. В многокомпонентном полимере идентифицированы: 3-гидроксигексаноат, 3-гидроксиоктаноат, в качестве доминирующего мономера 3-гидроксидеканоат и насыщенные и мононенасыщенные мономеры с длиной углеродной цепи 12 - 14 атомов углерода.

Таблица 1.1. - Накопление ПГА микроорганизмами на различных субстратах [обобщено по работам: Lee et al., 1995; Du et al., 2012; Tan et al., 2014; Koller et al., 2017; Kootstra et al., 2017; Sabbagha, Muhamada, 2017].

Бактерии	Состав ПГА	Основной источник углерода	X, г/л	ПГА, г/л	ПГА, % от АСБ	Продуктивность г/л·ч
Alcaligenes eutrophus	П3ГБ	глюкоза	164,0	121,0	76,0	2,42
Al. eutrophus	П3ГБ	CO_2+H_2	91,3	61,9	67,8	1,55
Al. eutrophus	П3ГБ	гидролизат тапиоки	106,0	61,9	57,5	1,03

Al. eutrophus	П(3ГБ-со-3ГВ)	глюкоза + пропионат	158,0	117,0	74,0	2,55
Alcaligenes latus	ПЗГБ	сахароза	143,0	71,4	50,0	3,97
Al. latus	ПЗГБ	сахароза	–	16,2	50,0	2,6
Azotobacter vinelandii	ПЗГБ	глюкоза	40,1	32,0	79,8	0,68
Methylobacterium organophilum	ПЗГБ	метанол	250,0	130,0	52,0	1,86
Chromobacterium violaceum	ПЗГБ	валерат	39,5	24,5	62,0	–
Protomonas extorquens	ПЗГБ	метанол	233,0	149,0	64,0	0,88
Pseudomonas oleovorans	ПЗГБ/3ГО	n-октан	11,6	2,9	25,0	0,58
Ps. oleovorans	ПЗГБ/3ГО	n-октан	37,11	12,1	33,0	0,32
рекомбинант E.coli	ПЗГБ	глюкоза	101,4	81,2	80,1	80,1
рекомбинант Klebsiella aerogenosa	ПЗГБ	меласса	37,0	24,0	65,0	65,0
Cupriavidus necator DSM 545	ПГА	FAME (глицерин и метиловые эфиры жирных кислот) в сочетании с глюкозой и валериановой кислотой	-	12	-	-

Haloferax mediterranei	ПГА	Сырой глицерин от биодизеля	-	-	-	0,12
Burkholderia cepacia ATCC 17759	П3ГБ		-	7,4	-	-
highly osmophilic organism	ПГА		-	16,2	-	-
Burkholderia cepacia (formerly Pseudomonas multivorans and Pseudomonas cepacia)	П3ГБ	Глицерин	-	-	31,3	0,103
Haloferax mediterranei	П(3ГБ-со-3ГВ)	Глицерин и сырой глицерин при производстве биодизеля	-	-	76	0,120

К настоящему моменту среди продуцентов ПГА описаны представители различных таксонов, и этот список постоянно пополняется (таблица 1.1). Способностью синтезировать коротко- и среднецепочечные полимеры обладают *Rhodospirillum rubrum, Rhodococcus ruber, Thiocapsa pfennigii, Aeromonas punctata* FA440, *Pseudomonas* sp. 61-3 и *Ectothiorhodospira shaposhnikovii,* накапливающих до 45-55 % полимера. Описана серия штаммов *Halomonas elongate*, выделенных из морской воды, активно синтезирующих ПГА при высокой солености, что облегчает процесс экстракции полимера из клеток [Guzman et al., 2010]. Среди фотосинтетичексих прокариот идентифицирована серия микроорганизмов, способных синтезировать ПГА, это *Synechococcus* sp.MA19, *Synechocystis* sp. *Nostoc muscorum, Spirulina platensis* [de Philippiset al., 1992; Nishioka, et al., 2001; Wu et al., 2002; Yew et al.,

2005;Panda et al., 2005]. Биосинтетики ПГА обнаружены даже среди продуцентов антибиотиков, в том числе, среди представителей *Streptomyces griseorubiginosus* [Manna et al., 1999]. Активно изучаемыми стали природные бактерии рода Aeromonas [Qiu Y. et al., 2004] и генетически модифицированные штаммы, например, *Ralstonia eutropha*, содержащая ген синтазы из *Aeromonas caviae*, синтезирующая сополимеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксигексаноата на продуктах переработки пальмового масла [Loo C.Y. et al., 2004], а также рекомбинантные микроорганизмы, включая *E.coli*, полученные в результате манипулирования генами синтеза полимеров из *Aeromonas* и *Ralstonia* [Qiu et al., 2006]. Большой интерес вызывают ПГА, содержащие мономеры 4-гидрокисбутирата (4ГБ), для синтеза которых возможно привлечение уже хорошо изученных штаммов, а также новых. Например, недавно описанный штамм *Delftia acidovorans DS-17* способен синтезировать на триацилглицеридах сополимер с высоким содержанием 4ГБ без добавления прекурсора этих мономеров в среду в отличие от ранее известных способов, при которых дополнительно используют гамма-батиролактон, 1,4-бутандиол и др. [Romanelli et al., 2014].

В последнее десятилетие начаты исследования смешанных культур для синтеза ПГА [Yue et al., 2014; Sawant et al., 2017]. В отличие от процессов с использованием чистых моносубстратов и монокультур, применение смешанных микробных культур позволяет использовать комплексные субстраты, включая отходы различного происхождения, используя для этого как одно-, так и двустадийные процессы, реализуемые в анаэробных условиях, а также в анаэробно-аэробных условиях [Kleerebezem et al., 2007; Serafim et al., 2009; Johnson et al., 2009; Bugnicourt, et al., 2014; Oliveira et al., 2016]. Для таких процессов показана пригодность глицерина, отходов производства пальмового масла, сыров и других пищевых продуктов [Dionisi et al., 2005; Ntaikou et al., 2014; Kourmentza et al., 2015] и возможность достижения высокой продуктивности в высокоплотных культурах [Kourmentza et al., 2009; Marang et

al., 2013]. Следует отметить, что поиск и выделение новых микроорганизмов, синтезирующих ПГА, продолжается.

1.4 Субстраты для биосинтеза ПГА

Себестоимость ПГА в значительной степени определяется стоимостью исходного сырья для их получения, поэтому одно из ключевых направлений исследований сосредоточено на поиске дешёвых субстратов. Для биосинтеза ПГА используется широкая линейка разных субстратов. Среди них: водород и углекислый газ, спирты, сахара, органические кислоты, а также отходы получаемые при производстве: гидролизатов, сахаров, масел и необычные субстраты, включая токсичные [Gumel et al., 2012; Riedel et al., 2012; Saharan et al., 2014; Tan et al., 2014; Shankar et al., 2015; Koller et al., 2010; 2017; Kourmentza et al., 2017; Sabbagha, Muhamada,2017; Kootstra et al., 2017].

Выбор типа сырья для биосинтеза ПГА, зависит от физиолого-биохимических свойств штаммов продуцентов и экономической конкуренции готовой продукции в выбранной области применения. ПГА перспективны для применения в различных отраслях промышленности, как в пищевой, медицинской, фармакологической, так в сельском и коммунальном хозяйстве. В зависимости от области применения и требований к качеству готового продукта масштабы производства полимеров могут быть различными - от сотен килограммов (для фармакологии и медицины) до сотен тысяч тонн (для сельского хозяйства и упаковки) в год. Следовательно, предъявляемые требования к стоимости и качеству сырья для различных областей применения будут отличаться. Для биосинтеза ПГА в качестве сырья могут быть привлечены разнообразные субстраты с различными параметрами (таблица 1.2).

Таблица 1.2. - Расходы субстрата и его стоимость для биосинтеза поли-3-гидроксибутирата [Collins A.E. et al., 1989; Lee S. Y., 1996]

Субстрат	Выход полимера, т/т субстрата	Стоимость субстрата, $/т	Стоимость субстрата $ /т полимера
Глюкоза	0,38	220–493	580–1300
Сахароза	0,40	290	720
Метанол	0,18	110	610
Этанол	0,50	440	880
Уксусная кислота	0,33-0,38	370–595	1220–1560
Декстроза	0,33	360	1180
Водород	1,0	500	500
Тростниковый сахар	0,33	200	660
Меласса	0,42	220	520
Молочная сыворотка	0,33	71	220
Гемицеллюлозные экстракты	0,20	69	340

В связи с возрастающей потребностью в ПГА и увеличением объёмов их производства, ведутся поиски новых дешёвых субстратов, в том числе рассматриваются возможности применения отходов в качестве сырья для биосинтеза полимеров. Огромным потенциалом для использования в качестве субстрата для крупнотоннажного производства ПГА обладают растительные биомассы, образующиеся ежегодно в огромных массштабах. Для биосинтеза ПГА в качестве субстратов возможно применение отходов кисломолочных производств, производства пальмового масла, сахарной промышленности и др. [Su et al., 2000; Ray et al., 2011; Du et al., 2012; Audic J.L. et al., 2003]. Представительные обзоры по этой тематике [Koller et al., 2010; Shankar et al., 2015; Kootstra et al., 2017] описывают широкий спектр отходов различного происхождения в качестве сырья для синтеза ПГА. Лигниноцеллюлозные материалы (порядка 60% растительной биомассы), содержащие целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин, ежегодно создаются

природой в процессе фотосинтеза в гигантских объёмах, и эти возобновляемые материалы служат источником получения различных сахаров для биотехнологической промышленности, таких как арабиноза, галактоза, гликаны, спирты, ксилоза и др. [Ravindra et al., 2008; Shankar et al., 2015; Koller et al., 2013; 2017]. Состав указанных отходов отличается в зависимости от исходного сырья растительного происхождения и может быть представлен целлюлозой 30–60%, гемицеллюлозой 25–35%, лигнином 10–25% [Kumar R. et al., 2008]. По данным ФАО известно, что ежегодно образуется $7x10^8$ тонн отходов с/х производств и до $2,5x10^9$ тонн лигниноцеллюлозных отходов. Урожай биомассы пальм составляет $6x10^8$ тонн в год, в том числе отходов порядка 90%.

В настоящее время для биотехнологического производства ценных целевых продуктов, таких как биодизель, биоэтанол, ПГА происходит постоянное увеличение масштабов переработки отходов растительного происхождения. У данной концепции развития биоиндустрии две положительные стороны - утилизация отходов и расширение сырьевой базы. Сравнительно недавно развернуты исследования, показавшие пригодность для синтеза ПГА гидролизатов илов очистных сооружений различных производств, – пищевых, текстильных, биодизеля, переработки картофеля, пальмового масла и др. [Serafim et al., 2008; Albuquerque et al., 2011; Saharan et al., 2014; Shankar et al., 2015]. Для этого опробованы различные методы предварительной обработки илов [Bengtsson et al., 2008; Beccariet al., 2009].

В качестве субстратов для синтеза ПГА возможно привлечение различных жиросодержащих отходов, например гидролизаты мясокостных отходов и др. [Chee et al., 2010]. Активные исследования проводятся по привлечению отходов переработки пальмового и соевого масла [Solaiman et al., 2006; Shozui et al., 2010].

Сравнительно недавно в качестве перспективного биотехнологического субстрата рассматривают глицерин, масштабы производства которого в настоящее время возрастают. Связано это с ростом производства биодизеля как

альтернативного нефти возобновляемого источника энергии [Posada et al., 2011]. При получении биодизеля переэтерификацией жироподобных субстратов сырой глицерин является побочным продуктом. Очищенный глицерин является важным сырьем для пищевой, косметической, фармацевтической промышленности, но процессы его получения весьма затратны, поэтому заводы небольшой производительности экономически не оправданы. Сырой, неочищенный глицерин, являющийся побочным продуктом при возрастающих объемах производства биодизеля, перспективен в качестве источника углерода для ряда технологических процессов с целью получения 2,3-бутандиола, 1,3-пропандиола; янтарной кислоты и, с недавних пор, – полигидроксиалканоатов. К настоящему времени активизируются исследования процессов синтеза ПГА природными и рекомбинантными штаммами микроорганизмов в различных культивационных условиях, главным образом, в лабораторных. Выполненный анализ публикаций показал перспективность глицерина и способность представителей различных таксонов утилизировать его для синтеза ПГА. В отличие от глюкозы, которая при синтезе ПГА метаболизируется по пути Энтнера-Дудорова по 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатному пути в пируват и конвертируется дегидрогеназой до ацетил-CoA (центральный метаболит в синтезе полимера); глицерин, также хорошо метаболизируемый в пируват с образованием в качестве интермедиата глицеральдегида-3-фосфата [Khanna et al., 2012; Rodríguez-Contreras, 2015].

Однако достигнутые при культивировании микроорганизмов на глицерине выходы по полимеру в основном ниже, чем на других субстратах. Так в колбочных культурах природных продуцентов достигнутые продукционные показатели по урожаю биомассы и полимеру составили: для *Pseudomonas corrugata* 3,4 г/л и 20% [Ashby et al., 2005]; *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 1,9 г/л и 40% [Ashby et al., 2005]; *Cupriavidus necator* IPT 026 4,34 г/л и 65% (Campos et al., 2014). В культуре мутантного штамма *Cupriavidus necator* DSM 545 получен более высокий урожай биомассы (15 г/л) при невысоком выходе ПГА (46-50%) [Garcia et al., 2013]. Более эффективный

синтез ПГА наблюдался при культивировании в колбах рекомбинантного штамма *Ralstonia eutropha* KNK-DCD1 на глицерине с добавками олеиновой кислоты; выход сополимера П(3ГБ/3ГГ) достиг 84%, но урожай биомассы при этом не превышал 2,2 г/л [Tsuge et al., 2013]. В работе Prasun Kumar с соавторами [Kumar et al., 2018] рассмотрен процесс синтеза в культуре *Paracoccus* sp. LL1 на глицерине двух продуктов – каратиноидов и ПГА. Авторами показано, что за 96 ч культивирования выход каратиноидов составил 3,6 мг/л; ПГА 39,3%; урожай биомассы – 24,2 г/л.

Известны процессы биосинтеза целевых продуктов, масштабированные в ферментационных аппаратах. Реализованы процессы при масштабировании в ферментерах 7,5 и 12 л, соответственно, в культуре *Burkholderia sacchari* DSM 17165 на глицерине и глюкозе урожай биомассы клеток составил 44 г/л при выходе П(3ГБ) 10% [Rodríguez-Contreras et al., 2015]; в культуре *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 на глицерине урожай биомассы клеток не превышал 2,5-3,0 г/л, выход П(3ГБ) составил 31-40% [Ashby et al., 2011]. Относительно штаммов водородных бактерий результаты масштабирования технологии биосинтеза ПГА на глицерине следующие: в 2-х литровом ферментере в культуре природного штамма *Cupriavidus necator* JMP 134 на сыром глицерине урожай биомассы составил 50 г/л, содержание в ней полимера максимально 40% [Mothes et al., 2007]; в культуре мутантного штамма *Cupriavidus necator* DSM 545 наблюдались более высокие показатели: урожай биомассы составил 68-82 г/л, выход полимера - до 62% [Cavalheiro et al., 2009]. Приведённые результаты показывают, что глицерин, несомненно, является перспективным субстратом, а привлечение новых штаммов и совершенствование технологических стадий процесса культивирования будут способствовать улучшению продукционных показателей.

1.5 Способы культивирования штаммов-продуцентов ПГА

Продуктивный микробиологической синтез ПГА – сложная технологическая задача, в ходе решения которой необходимо одновременно достичь высокие выходы резервных внутриклеточных макромолекул и урожая биомассы клеток, находящихся в условиях лимитированного роста. Исходя из физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов - продуцентов ПГА на практике для получения полимеров используют, в основном, два типа культивирования - периодическое и проточное. Однако и при периодическом, и при проточном способах ферментации необходимо создать условия, при которых обеспечивается высокая продуктивность процесса и по биомассе, и по выходу полимера. У микроорганизмов первой группы аккумуляция ПГА наиболее активно происходит при несбалансированном росте в медленно растущих клетках, следовательно, высокопродуктивные проточные системы ферментации для таких продуцентов не приемлемы. В этой связи возникает вопрос - как получить большие урожаи биомассы одновременно с высоким (до 70% и более) внутриклеточным содержанием ПГА. Поэтому микроорганизмы первой группы, как правило, выращивают в периодическом режиме, применяя либо двустадийный процесс, либо два последовательно работающих аппарата. На первой стадии (или в первом аппарате), микроорганизмы выращивают на полной питательной среде, при этом происходит образование практически всей биомассы. На втором этапе используют среду, из состава которой исключают один из биогенных элементов, и процесс продолжают еще некоторое время, в течение которого прироста биомассы практически не происходит, а наблюдаемое увеличение плотности культуры связано, главным образом, с увеличением массы полимера в клетках. Для бактерий второй группы также используют периодический тип культивирования, однако при этом питательная среда содержит все необходимые элементы, концентрацию которых повышают по мере увеличения количества клеток в культуре, а также вводят в состав среды дополнительные органические источники азота (кукурузный и соевый

экстракты, рыбный пептон). Это обеспечивает высокие выходы клеточной биомассы при высоком внутриклеточном накоплении ПГА, так как эти два процесса у микроорганизмов конститутивно сбалансированы [Page, Cornish, 1993; Lee, Chang, 1994].

Рассматриваются варианты синтеза ПГА при проточном культивировании бактерий. Теоретически непрерывное культивирование может обеспечить наивысшую продуктивность. Однако, только с бактериями *Al. latus* и *Ps. oleovorans* получены удовлетворительные результаты продукции ПГА в проточном режиме. Состояние *steady-state* в культуре *Al. latus* на фруктозе достигнуто при уровне П(3ГБ) в 16 г/л при продуктивности, равной 2,5 г/л ч. В культуре *Ps. oleovorans* при выращивании на октане в качестве источника углерода (15% об.), при лимите азота в среднем изменение скорости протока от 0,09 до 0,46 $ч^{-1}$ сопровождалось снижением концентрации биомассы и полимера, соответственно. В состоянии steady-state концентрация полимера составила 11,6 г/л, продуктивность – 0,58 г/л·ч. [Kim, 2002]. Следует отметить, что негативными моментами использования проточных культур являются большие объемы низкоплотной бактериальной суспензии и большая вероятность контаминации.

1.6 Пилотные и промышленные производства ПГА

Производства ПГА в настоящее время осваиваются или планируются во многих странах. Однако рост объемов производства и расширения сфер применения этих перспективных полимеров определяется темпами снижения их стоимости, которая зависит, главным образом, от стоимости сырья, продуктивности штаммов микроорганизмов и затрат на экстракцию и очистку полимеров.

Начиная с 1959 года ряд промышленных компаний начали работы, ориентированные на коммерциализацию процессов производства ПГА, как альтернативы нефте-химическим полиолефинам. Впервые процесс синтеза

поли-3-гидроксибутирата был реализован компанией W.R. Grace & Company, однако низкая продуктивность процесса и проблемы с экстракцией полимера быстро привели к её закрытию [Mozejko-Ciesielska, R. Kiewisz, 2016]. Начиная с 80-х годов процесс коммерциализации ПГА активизировался во многих странах. Наиболее удачными были действия фирм «Zeneka Seeds» и «Zeneka Bio Product» компании ICI, Великобритания - которая с 1992 года первой в мире запустила производство поли-3-гидроксибутирата и сополимеров 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (товарное название продукта Биопол®). Цена Биопола составляла 16000$ за тонну при объёмах производства 10–15 тыс. тонн в год. Полипропилен на мировом рынке стоил на порядок ниже.

Понадобилось несколько десятилетий для того, чтобы были разработаны процессы, обеспечивающие биосинтез со стоимостью полимеров, приближающейся к $ 3000-5000/тонна. Самые последние публикации [Plastics Technology, 2017] показывают стоимость ПГА на уровне США $2.25–2.75/кг. Согласно прогнозам к 2021 году объемы производства ПГА составят 93 млн. тонн в год по сравнению с 73,6 млн. тонн в 2016 году, то есть, прогнозируемый рост ожидается на уровне 4,88% [Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market by Type, Manufacturing Technology & Application - Global Forecast to 2021 - Research and Markets]

Прежде всего, понадобились исследования, повышающие продукционные характеристики штаммов, так как, за исключением представителей *Cupriavidus necator,* большинство из них не обеспечивали эффективную продукцию полимеров, что негативно сказывалось на экономике процесса. Напротив, представители *Cupriavidus* обеспечили высокую (до 80-85%) продукцию различных типов ПГА [Shantini et al., 2015; Huschner et al., 2015] на различных субстратах, включая отходы продуктов переработки пальмового масла, спиртовой промышленности, водород в смеси с диоксидом углерода [Obruca 2010; Ciesielski et al., 2010; García et al., 2014; Passanha et al.,2013; Volova et al., 2013]. Также были выделены и введены в культуру новые

микроорганизмы, положительно оцененные как продуценты для крупнотоннажных производств ПГА: *Burkholderia sacchari*, обеспечивающие высокую продуктивность на различных субстратах [Mendonc et al.,2014]; *Burkholderia sp.* USM (JCM15050), синтезирующие до 70% П(3ГБ) на сыром пальмовом масле [Chen et al.,2014]; выделенный в Малазии *Aquitela sp.* USM4 [Ng and Sudesh, 2016] и др. Перспективы удешевления ПГА связывают с получением рекомбинантных штаммов продуцентов. К настоящему времени получены и исследованы в качестве продуцентов П(3ГБ), двух- и трехкомпонентных ПГА различные рекомбинантные штаммы на основе *Escherichia coli, Burkholderia sp.* USM (JCM 15050), *Shimwellia blatae* и др, в которых клонированы основные ферменты синтеза ПГА из *Cupriavidus necator, Azotobacter sp. (FA8), Bacillus megaterium, Bacillus cereus YB-4, Pseudomonas, Aeromonas caviae* и др. [Mozejko-Ciesielska, Kiewisz, 2016]. В качестве перспективных рекомбинантных микроорганизмов рассматриваются также штаммы *Cupriavidus.* Получен штамм *Cupriavidus necator* Re2160/pCB113 - эффективный продуцент сополимеров 3ГБ с 3-гидроксигексаноатом (до 85%) при культивировании на сыром пальмовом масле, в который клонирована синтаза из *Ralstonia aetherivorans* [Wong et al., 2012]; аналогичный процесс биосинтеза на пальмовом масле реализован с использованием штамма *Cupriavidus necator* H16 с синтазой из *Aeromonas caviae* [Sato et al., 2015]; отходы пальмового масла утилизирует трансформированный штамм *Cupriavidus* [Kamilah et al., 2012]. Серия рекомбинантных штаммов *Ralstonia eutropha* phaC S506G A510K с клонированными генами из *Pseudomonas sp.* MBEL6-19 phaC1437, синтезирующих ПГА на глюкозе и лактате, описаны в работе [Park et al., 2013]. Список штаммов продуцентов постоянно пополняется, что является залогом будущих успехов в производстве ПГА.

Усилия биотехнологов и потенциал синтетической биологии направлены сегодня на снижение стоимости ПГА за счет повышения эффективности технологических процессов и разработки научных основ перехода на стадии промышленных производств [Chen, 2012]. К настоящему времени достигнуты

следующие показатели: плотность культур до 200 г/л с содержанием полимера до 90% и даже до 100% [Fu et al., 2014; Wang, et al., 2014; Jiang, Chen, 2016]. Для этого привлекаются генетически модифицированные штаммы, анаэробные и галофильные микроорганизмы, что позволяет снижать потребность в кислороде (является критическим фактором в высокоплотных культурах), и использовать морскую воду без предварительного опреснения. [Pfeiffer, D.; Jendrossek 2012]. Все это направлено на повышение эффективности биосинтеза и снижения стоимости ПГА.

Масштабирование биотехнологий до уровня пилотных (или опытных) производств является обязательным этапом, предшествующим промышленной реализации технологии. Как правило, при масштабировании лабораторных технологий продукционные показатели снижаются, поэтому требуются дополнительные исследования и технико-технологические решения.

В обзоре [Kourmentza et al., 2017] представлены результаты, интегрирующие серию реализованных пилотных производств, в которых в качестве субстратов использованы гидролизаты и продукты переработки различных отходов. В Индии компанией Lucun WWTP in Wuxi реализовано пилотное производство синтеза сополимеров П(3ГБ/3ГВ) на продуктах гидролиза активного ила с содержанием полимеров до 39-43% [Chakravarty et al., 2010]. В Китае компанией Lucun WWTP реализован синтез ПГА на гидролизатах илов отходов пищевых производств с выходами целевого продукта по субстрату до 0,29 г/г [Jia et al., 2014]. В Швеции фирма Esb v создала пилотное производство сополимеров П(3ГБ/3ГВ) с соотношением мономеров как 85:15 мол.% на гидролизатах ила при производстве кисло-молочных продуктов [Anterrieu et al., 2014]. В Бельгии функционирует пилотное производство сополимеров П(3ГБ/3ГВ) с различным соотношением мономеров и выходами по полимеру и биомассе до 100-140 г/л, созданное компанией Brussels North WWTP [Morgan-Sagastume et al., 2015]. В Нидерландах фирмами Leeuwarden WWTP и Mars company Veghel реализованы пилотные производства сополимеров П(3ГБ/3ГВ) за счет применения в

качестве субстратов сточных вод, образуемых при переработке томатов, а также гидролизатов илов бытовых и ресторанных стоков, в том числе в анаэробных условиях [Bengtsson et al., 2017]. Оптимизация этих процессов позволит далее рекомендовать переход к промышленному производству.

В настоящее время коммерциализацией технологий синтеза различных ПГА занимаются многие ведущие компании (таблица 1.3). Среди активных разработчиков промышленных процессов производства ПГА - «Tepha», «Monsanto Company», «Metabolix Inc.», «Merck», «Procter & Gamble», «Bioscience Ltd.», «Berlin Packaging Corp.», «BioVentures Alberta Inc.», производящие ПГА под марками Nodax™, Biopol®, TephaFLEX™, Biopol™, DegraPol/btc® и др. [Chen G.Q., 2009; Natano R.V. et al., 2001; Chen G.Q., 2010; Poliakoff, Noda, 2004; Tan et al., 2014; Chen et al., 2014; Mozejko-Ciesielska, Kiewisz, 2016; Kourmentza et al., 2017; Kootstra et al., 2017].

Таблица 1.3. - Компании, ориентированные на производство ПГА [интегрировано по работам: Chen G.Q. 2009; Mozejko-Ciesielska, Kiewisz, 2016; Koller et al., 2017; Kourmentza et al., 2017]

Компания	Типы ПГА	Объем производства (тонн/год)	Период времени	Применение
«ICI» (Великобритания)	П(3ГБ)/3ГВ	300	1976–1998 г.	Упаковка
«Chemie Linz» (Австрия)	П(3ГБ)	20–100	1980-е гг.	Упаковка, доставка лекарств
«btF» (Австрия)	П(3ГБ)	20–100	1990-е гг.	Упаковка, доставка лекарств
«Biomer» (Германия)	П(3ГБ)	500-1000	1993 г. до настоящего времени	Упаковка, доставка лекарств
«BASF» (Германия)	П(3ГБ), П(3ГБ)/3ГВ	Пилотный масштаб	1980-е гг. до 2005 г.	Смешивание с Ecoflex
«ADM» (США) (совместно с	Различные ПГА	50 000	с 2005 до настоящего	Сырье

Компания	Типы ПГА	Объем производства (тонн/год)	Период времени	Применение
Metabolix)			времени	
«P&G» (США)	Различные ПГА	Производство по контрактам	1980-е гг. до настоящего времени	Упаковка
«Monsanto» (США)	П(3ГБ), П(3ГБ)/3ГВ	Неизвестно	1990-е гг.	Сырье
«Meredian» (США)	Различные ПГА	10 000	с 2007 г. до настоящего времени	Сырье
«Kaneka» (Япония) (совместно с P&G)	Различные ПГА	Неизвестно	1990-е гг. до настоящего времени	Упаковка
«Mitsubishi» (Япония)	П(3ГБ)	10	1990-е гг.	Упаковка
«Biocycles» (Бразилия)	П(3ГБ)	100	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Bio-On» (Италия)	ПГА	10 000	с 2008 до настоящего времени	Сырье
«Zhejiang Tian An» (Китай)	П(3ГБ)/3ГВ	2 000	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Yikeman, Shandon» (Китай)	ПГА	3 000	с 2008 г. до настоящего времени	Сырье
«Tiangin Northen Food» (Китай)	П(3ГБ)	Пилотный масштаб	1990-е гг.	Сырье
«Shantou Lianyl Biotech» (Китай)	Различные ПГА	Пилотный масштаб	1990-е гг. до 2005	Упаковка и медицина
«Jian Su Nan Tian» (Китай)	П(3ГБ)	Пилотный масштаб	1990-е гг. до настоящего времени	Сырье
«Tianjing Green Bio-Science» (Китай)	П(3ГБ)/4ГБ	10 000	с 2004 г. до настоящего времени	Сырье и упаковка
«Shandolong Lukanng» (Китай)	Неизвестно	Пилотный масштаб	с 2005 г. до настоящего времени	Сырье и медицина

Компания	Типы ПГА	Объем производства (тонн/год)	Период времени	Применение
Metabolix (with Monsanto technology) (США)	П(3ГБ)/3ГВ и др.	Неизвестно	с 1980 г. до настоящего времени	неизвестно
Tepha Inc. (USA)	П(4ГБ), П(3ГБ)/4ГБ	Неизвестно	с 2007 г. до настоящего времени	Неизвестно
Polyferm Canada (Canada)	Средне цепочечные ПГА	0,01	В настоящее время	Неизвестно
PHB Industrial SA/Copersucar (PHBISA) (Brazil)	П(3ГБ), П(3ГБ)/3ГВ	100 (мощность 5000)	с 1995 г. до настоящего времени	Неизвестно

Лидером в области коммерциализации ПГА является компания «Metabolix, Inc.» (США), основанная в 1992 году в Кембридже, Массачусетс, которая производит полимеры с использованием рекомбинантных штаммов *E.coli* K12 культивируемых на сахарах. Торговые марки полимеров – Biopol®, Biopol™. Компанией произведено в 2005 году – 90 тонн ПГА, 2006 году – 907 тонн ПГА. В 2009 году «Metabolix» выпустил на рынок линейку ПГА под маркой «Mirel». При поддержке Департамента торговли США были созданы новые промышленные мощности и запланирован запуск производства трех типов полимера под этой маркой объемом 55 тыс. тонн/год. В 1998 году была создана сестринская компания «Tepha Inc.» (США), деятельность которой ориентирована на производство разрушаемых полимеров, включая полигидроксиалканоаты медицинского назначения под маркой – TephaFLEX™. Для синтеза полимеров применяется запатентованная ферментация на основе рекомбинантных штаммов-продуцентов.

Компания «Procter & Gamble, Chemicals» (США) запустила производство многокомпонентных полимеров, содержащих мономеры с длиной углеродной цепи C_4 - C_{12}. Деятельность компании направлена на производство полимеров

под маркой Nodax™. ПГА марки «Nodax» имеют меньшую температуру плавления, стеклования и меньшую кристалличность по сравнению с «Biopol», что делает их более технологичными при переработке в изделия [Poliakoff M., and Noda I. 2004]. В 2007 г. с целью коммерциализации этого класса ПГА компания «Meredian» выкупила технологию, разработанную «Procter & Gamble». В 2009 г. на пилотном производстве была отработана эффективная технология биосинтеза ПГА и получены необходимые параметры для масштабирования производства. В 2010 году было введено в эксплуатацию промышленное производство. В перспективе компания планирует увеличить объёмы производства этих ПГА до 300 млн. тонн.

В Австрии производят П(3ГБ) до 1 тонны в неделю в 15 $м^3$ ферментерах, в качестве субстрата используют различное сырьё, в том числе и отходы. В качестве штамма продуцента используют *Alcaligenes latus*, обладающий продуктивностью по полимеру до 90%. В Бразилии функционирует пилотное производство П(3ГБ) на сахарозе с экономическим коэффициентом по полимеру порядка 3,1 кг/кг. Сахарной компанией «Copersucar» (Бразилия) в 2001 году реализована технология получения ПГА с использованием в качестве субстрата отходов производства сахара [Natano R.V. et al., 2001]. В Китае производство ПГА основывается на применении высокопродуктивных штаммов продуцентов как природных, так и рекомбинантных. В Китае разработана технология биосинтеза в ферментере объемом 1 000 л сополимера 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом с выходом по биомассе до 160 г/л за 48 ч [Chen G.Q. 2010].

В РФ исследования направленные на изучение биоразрушаемых пластмасс до настоящего времени не получили должного развития, и индустрия биоразрушаемых полимеров пока не создана [Фомин В.А., Гузеев В.В. 2001; Штильман М.И. 2006]. Сегодня в РФ обсуждаются перспективы и планируется создание производства полилактидов. Работы направленные на изучение ПГА проводят несколько научных коллективов следующих академических институтов и ВУЗов: Института биофизики СО РАН, Сибирского федерального

университета, Института нефтехимического синтеза РАН, Института микробиологии РАН, биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, Института физиологии и биохимии микроорганизмов РАН.

Первое отечественное опытное производство полигидроксиалканоатов было создано и введено в строй в январе 2005 г. на базе Красноярского научного центра СО РАН в ходе сотрудничества Института биофизики СО РАН и отдела Биотехнологии ОАО «Биохиммаш» (г. Москва) в рамках проекта Международного научно-технического центра [Волова Т.Г. и соав., 2006]. В основу процесса была положена технология биосинтеза П(3ГБ) и сополимеров П(3ГБ/3ГВ) с использованием природного штамма бактерий *Ralstonia eutrophus* B5786 культивируемого на фруктозе с выходом по биомассе и полимеру до 50 г/л и 80–85% соответственно. Достигнутые показатели продуктивности по общей биомассе и полимеру составили 0,045 и 0,036 кг/ч. Последующие исследования с привлечением нового штамма бактерий *C. eutrophus* B10646 позволили разработать технологию на более доступном субстрате - глюкозе при продуктивности процесса, вдвое превосходящие ранее достигнутые показатели в культуре *R. eutrophus* B5786 на фруктозе [Киселев, 2012].

1.7 Технико-экономические показатели производства ПГА

На стадии планирования объемов производства целевых продуктов биосинтеза, в частности, ПГА, большое значение приобретают работы, связанные с технико-экономическим анализом производства. Такие работы ориентированы на оценку стоимости продукта и определение узких мест в процессе производства, оптимизация которых позволит повысить эффективность процесса и сделать продукт рентабельным. В конце 90-х годов был проведен детальный технико-экономический анализ стоимости П3ГБ, синтезируемого различными бактериальными штаммами на различном углеродном сырье при прогнозных масштабах производства до 2850 и 100 000 тонн в год [Choi, Lee, 1999]. В качестве субстратов сравнивали глюкозу,

сахарозу и метанол; в качестве продуцентов – *Alcaligenes eutrophus, Al. latus, M. organophilum* и рекомбинантный штамм *E. coli*. При планируемом объеме выпуска полигидроксибутирата до 1 млн тонн/год прогнозируемая цена полимера показана на уровне $ 3.84/кг. Теоретически показано, что увеличение объемов производства полимера с 2850 т до 100 000 тонн возможно позволит снизить стоимость продукта в 1,17 раза.

Для снижения стоимость полимера необходимо использовать наиболее дешёвые субстраты. Так, при замене глюкозы кукурузным экстрактом при сохранении продукционных характеристик процесса с одним и тем же штаммом стоимость полимера может быть снижена на $ 1,19/кг и составлять $ 3,72/кг. [Choi, Lee, 1999]. Удельные нормы расхода сырья на синтез ПГА в зависимости от энергетической эффективности, степени восстановленности субстрата, а также характера метаболизма микроорганизмов-продуцентов существенно варьируют и могут составлять от одной до нескольких тонн на тонну целевого продукта. Так, для синтеза тонны ПГА необходимо сахаров – 2,5-3,3 т, этанола – 2,0 т, тростникового сахара – 2,0 т, водорода – 1,0 т (таблица 1.2).

Сравнительный прогнозный технико-экономический анализ синтеза ПГА при производстве 100 000 т/год на различных субстратах выполнен в работе [Киселев, 2012]. За основу взяты реально достигнутые экспериментальные результаты по продуктивности и материальным затратам на синтез ПГА. По выполненным расчетам определена прогнозируемая себестоимость продукта, которая может колебаться от 229 до 290 руб/кг ПГА в зависимости от используемого субстрата.

Новые технико-экономические оценки синтеза ПГА, выполненные сравнительно недавно, также свидетельствуют о большой значимости типа и стоимости углеродного субстрата в структуре общих затрат на производства полимера.

Среди перспективных субстратов для крупнотоннажного производства ПГА в настоящее время рассматривается глицерин, масштабы производства

которого в настоящее время возрастают. Связано это с ростом производства биодизеля как альтернативного нефти возобновляемого источника энергии [Posada et al., 2011; Fernandez-Dacosta et al., 2015]. Согласно статистических данных национального совета по биодизелю за последние два года отрасль произвела более 2 миллиардов галлонов биодизеля [http://biodiesel.org]. Глицерин является побочным продуктом, составляя порядка 10%, при получении биодизеля переэтерификаций животных и растительных жиров и масел (рапсового, горчичного, соевого, пальмового) [Du et al., 2012]. В промышленных марках глицерина содержание воды колеблется в пределах 5,3 - 14,2%; метанола 0,001-1,7%; NaCl следы - 5,5%; K_2SO_4 0,8-6,6% [Mothes et al., 2007]. Глицерин, как возможный источник углерода, пригоден для синтеза водорода, сукциновой и лимонной кислот, жиров одноклеточных [Papanikolaou et al., 2007; Khanna et al., 2012], а также для синтеза ПГА [Da Silva et al., 2009]. Сопоставление результатов биосинтеза ПГА на сыром и очищенном глицерине, полученного при производстве биодизеля из растительного сырья, показало больший выход целевого продукта при использовании очищенного глицерина, несмотря на затраты, связанные с его получением. При использовании очищенного глицерина затраты углеродного субстрата на синтез полимера составляют 8%, а не 40-45% как на сахарах и др. субстратах [Posada et al., 2011;2012]. Выполненные технико-экономические оценки показали повышение эффективности производства ПГА при использовании в качестве субстрата глицерина по сравнению с сахарами, мелассой, спиртами и другими известными субстратами [Du et al., 2012; Koller et al., 2013].

Следует учитывать, что для каждого конкретного вида бактерий применяются характерные субстраты. При выборе субстрата необходимо обращать внимание не только на его стоимость, но и на производительность процесса, содержание полимера в клетке продуцента и его выход, затраты сырья на единицу получаемого продукта. Более высокая цена на сырье может компенсироваться более высоким содержанием полимера в клетках, следовательно, более высокими выходами целевого продукта.

Таким образом, при определяющих затратах на исходное сырье субстрат технико-экономические показатели процесса получения ПГА зависят от многих факторов, включая, физиологическую активность и характеристики штаммов-продуцентов, технологический режим, определяющий продукционные показатели и нормы расхода сырья, объемы производства, состав и свойства полимеров. Поэтому получение научной основы для разработки технологии синтеза ПГА требует комплексного подхода, исходя из специфики синтеза этих макромолекул, а также с учетом соблюдения основных принципов, влияющих на эффективность и экономику процесса. При этом, одной из важнейших задач биотехнологии этих ценных макромолекул является поиск новых штаммов-продуцентов, способных синтезировать ПГА на доступных и дешёвых субстратах.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1 Исследуемые микроорганизмы

Для исследования использованы штаммы из коллекции водородокисляющих бактерий лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза ИБФ СО РАН: *Ralstonia eutropha* B-5786; глюкозоусваивающий мутантный штамм *R.eutropha* B-8562 и *Cupriavidus eutrophus* B-10646. Все штаммы зарегистрированы во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и характеризуются способностью синтезировать полигидроксиалканоаты с высокими выходами.

2.1.2 Среда для культивирования бактерий

За основу принята среда Шлегеля [Schlegel et al., 1961], представляющая собой фосфатный буфер следующего состава: $Na_2HPO_4 \times H_2O$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $MgSO_4 \times H_2O$ – 0,2; $Fe_3C_6H_5O_7 \times 7H_2O$ – 0,025; NH_4Cl – 1,0 (г/л). В качестве источника железа использовали раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который добавляли из расчета 5 мл/л. Микроэлементы добавляли в среду по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 0,228; $CoCl_2 \times 6H_2O$ – 0,03; $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,008; $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 0,008; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,176; $NaMoO_4 \times 2H_2O$ – 0,05; NiCl – 0,008 (г/л). В качестве источника азота использовали мочевину.

В качестве моноуглеродного С-субстрата при синтезе гомополимера 3-гидроксималяной кислоты использовали глицерин при его стартовой концентрации в среде 10-15 г/л и текущей концентрации в культуре не ниже 5 г/л.

Для исследований в качестве основного С-субстрата использовали глицерин различного происхождения и различной степени чистоты:

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: Ɛ-капролактон (Alfa Aesar, Германия), валерьяновую кислоту (Alfa Aesar, Германия) и пропионовую кислоту (Acros Organics, Бельгия).

2.2 Техника и методы культивирования микроорганизмов

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) (Рисунок 2.1).

Рисунок 2.1 - Фото шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova 44 для культивирования бактерий в колбах

Для глубинного периодического культивирования бактерий использовали пилотные ферментеры фирмы Bioengineering (Швейцария) серии NLF 22 с объемом аппарата 30 литров, рабочий объём от 10 до 20 литров (Рисунок 2.2.) и серии P с объемом аппарата 150 литров, рабочий объём от 50 до 100 литров с автостерильным фильтром (Рисунок 2.3).

Рисунок 2.2 - Фото самостерилизующегося ферментера объемом 30 л («Bioengineering», Швейцария)

Рисунок 2.3 - Фото самостерилизующегося ферментера объемом 150 л («Bioengineering», Швейцария)

Бактерии культивировали, соблюдая условия, разработанные для биосинтеза ПГА [Волова с соавт., 1992]. Для инокулята в качестве посевного материала использовали музейные культуры штаммов хемоорганотрофных водородокисляющих бактерий, которые хранятся на агаризованной среде Шлегеля при температуре 5 °С. Инокулят получали в строго стерильных условиях ресуспендированием музейной культуры.

Бактерии культивировали на солевой среде Шлегеля при pH 7,0, при стартовой концентрации глицерина 10-15 г/л и температуре среды 30 ^{o}C с лимитированием роста бактерий по азоту – фактор, стимулирующий суперпродукцию ПГА. Применяли периодический двустадийный процесс. На

первом этапе (20-25 ч) использовали среду с уменьшенным в два раза от физиологической потребности бактерий содержанием азота, составляющим 120 мг/г биомассы клеток при оптимальных условиях роста. В качестве азота использовали карбамид. На втором этапе (20-30 ч) процесс продолжали при тех же параметрах, но в безазотной среде. В высокоплотных ферментационных культурах подачу концентрированных растворов С-субстрата и минеральных элементов в культуру осуществляли с помощью перистальтических насосов-дозаторов.

2.3 Методы контроля параметров процесса культивирования бактерий в режиме синтеза ПГА и определение кинетических и продукционных характеристик

В процессе культивирования бактерий каждые 4 - 6 ч отбирали пробу и на фотоэлектрокалориметре UNICO 2100 (США) определяли оптическую плотность культуры. Для тестирования разводили пробу дистиллированной водой в пропорции 1:5, 1:20 и 1:50, измерения проводили при длине волны λ = 440 нм в кюветах 1 мм. Концентрацию клеток X, г/л оценивали весовым способом. Метод заключается в следующем: культуру с определённым объемом откручивали на центрифуге при 6000 об/мин в течении 10 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок клеток дважды отмывали ресуспендируя клетки в свежем объёме дистиллированной воды и собирая центрифугированием при указанных условиях для удаления остатков питательной среды. Отмытые клетки переносили в бюксы и высушивали при температуре 105 ^{o}C в течение суток до постоянного веса. После охлаждения в эксикаторе пробы взвешивали. Вес бактериальной биомассы вычисляли из разницы между весом бюкса с высушенными клетками и исходным весом бюкса.

Концентрацию глицерина определяли методом, основанным на окислении глицерина периодатом натрия в сернокислом растворе до формальдегида и определении колориметрическим методом с хромотроповой кислотой [Nakamura et al., 2016]. Метод определения состоит из следующих стадий: 2 мл культуры

центрифугируют в течении 2 мин при 6000 об/мин; затем 20 мкл супернатанта переносят в пробирку и добавляют 10 мл воды; далее 2 мл подготовленной пробы переносят в чистую пробирку, в контрольную пробирку добавляют 2 мл воды; в обе пробирки добавляют 0,1 мл H2SO4 10н и 0,5 мл NaIO4 0,1М; выдерживают 5 минут и добавляют 0,5 мл NaHSO3; 1 мл разведений переносят в пробирку с притертым шлифом добавляют 5 мл хромотроповой кислоты, закрывают стеклянными крышками и нагревают на кипящей водяной бане в течении 30 мин; далее пробирки охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность на фотоэлектрокалориметре UNICO 2100 в кюветах с длиной оптического пути 5 мм при λ = 570 нм. Концентрацию глицерина определяют по предварительно подготовленному калибровочному графику.

Содержание в культуральной среде аммонийного азота оценивали двумя методами. 1. Качественный метод – дистиллированную воду объёмом 10 мл смешивали с 1 мл супернатанта, затем добавляли каплю 33 %-ного раствора КОН, далее добавляли реактив Несслера объёмом 0,5 мл. В результате качественной реакции раствор в зависимости от содержания азота изменял свою окраску. Визуально сравнивали окраску раствора с окраской стандартов (следы, №1, №2, №3). 2. Количественный метод – супернатант в соотношении 1:100 разводили дистиллированной водой, далее отмеряли 10 мл приготовленного раствора, затем вносили в него каплю 33 %-ного раствора КОН и реактива Несслера в количестве 0,5 мл [Clesceri et al., 1989]. Затем замеряли оптическую плотность при длине волны 400 нм на фотоэлектрокалориметре UNICO 2100 в кюветах 10 мм. Для контроля применяли дистиллированную воду. Концентрацию азота определяли по заранее построенному калибровочному графику.

В экспериментах оценивали следующие характеристики процесса биосинтеза полимера. Регистрировали урожай биомассы клеток в культуре (X, г/л), выход ПГА (г/л и в % от веса абсолютного сухого вещества клеток). Границы физиологического действия глицерина в культуре, кинетические константы по глицерину (K_s и K_i); удельные скорости роста бактерий и синтеза ПГА (μ, $ч^{-1}$),

продуктивность процесса биосинтеза по биомассе и полимеру (П, г/л·ч), экономический коэффициент (Y, г/г) находили общепринятыми методами.

Удельную скорость роста культуры (μ, $ч^{-1}$) определяли по уравнению

$$\mu = \ln\left(\frac{x_к}{x_н}\right) / \Delta\tau, \qquad (2.1)$$

где:

$x_н$, $x_к$ – начальная и конечная концентрация бактерий кг/м^3;

τ – время культивирования, ч.

Удельную скорость синтеза полимера (μ_β, $ч^{-1}$) определяли по формуле:

$$\mu_\beta = \ln\left(\frac{ПГА_к}{ПГА_н}\right) / \Delta\tau, \qquad (2.2)$$

где:

$ПГА_н$, $ПГА_к$ – начальная и конечная концентрация полимера в клетках, кг/м^3.

Продуктивность процесса по биомассе ($П_х$) и полимеру ($П_{пга}$), кг/л·ч находили, используя:

$$П = q_s \cdot Y_{p/s} \cdot X, \qquad (2.3)$$

где :

q_s – скорость потребления субстрата, кг/(кг·ч);

$Y_{p/s}$- выход продукта (экономический коэффициент), кг/кг;

X – концентрация биомассы, P – продукт, S – субстрат, кг/м^3.

Экономический коэффициент культуры по продукту Y, кг/кг рассчитывали по формуле:

$$Y = m_х / m_с, \qquad (2.4)$$

где:

$m_с$ – масса субстрата, затраченного на получение продукта, кг;

$m_х$ – масса продукта (Х, полимер), кг.

Скорость утилизации компонентов субстрата культурой q, кг/(кг·ч) определяли по формуле:

$$q = \frac{G_г}{x \cdot V}, \quad (2.5)$$

где $G_г$ – расход потребляемого субстрата, кг/ч;

x – концентрация бактерий, кг/м^3.

V – рабочий объем аппарата, м^3.

2.4 Микробиологические исследования

Микробиологический контроль стадий технологического процесса проводили согласно ГОСТ ИСО 14644-1-2002 - Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды.

Исследования включали:

- микробиологический анализ воздушной среды помещений производственной зоны седиментационным методом, методом Коха [Koch, 1881]; места взятия проб устанавливали по типу конверта, из расчета - одна проба воздуха на каждые 20 м^2 площади. Отбор проб воздуха осуществляли на уровне дыхания сидящего или стоящего человека в исследуемых помещениях;

- микробиологический анализ поверхностей производственной зоны и технологического оборудования проводили методом смыва; после взятия пробы осуществляли посев штрихом по поверхности агаризованной питательной среды в чашках Петри. По истечении инкубационного периода подсчитывали КОЕ - количество выросших колоний. Количественную оценку микроорганизмов на поверхностях определяли путем деления количества колоний, выросших в чашке на площадь исследуемой поверхности;

- санитарно-бактериологическое исследование персонала проводили посевом отпечатков пальцев рук на хромогенный колиформный агар (HiMedia Laboratories, India);

- микробиологический контроль стерильности внутренних полостей ферментационных установок проводили после стерилизации оборудования;

- микробиологический контроль технологического воздуха, подаваемого в ферментационную линию, проводили методом, основанном на принципе ударного воздействия струи воздуха из линии на поверхность чашек Петри с питательной средой;

- микробиологический контроль питательных сред, поступающих в ферментер;

- контроль чистоты бактериальной культуры проводили высевом и микроскопией проб на пептонный агар (20 г агара, 10 г пептона, 5 мл 2,5% NaCl на 1 л дистиллированной воды). Разведения проводили стандартным методом [Егоров, 1976] из разведений 10^7, 10^8; культивировали в термостате *Binder (USA)* при температуре 30 °С;

- микробиологический контроль чистоты лиофильно высушенной биомассы культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646 и высушенного конечного продукта (полимера) проводили методом предельных разведений. Сначала получали разведение 10^2 , для этого к 1 г пробы добавляли стерильную воду объёмом 100 мл. Затем продолжали разведение полученной суспензии в соотношениях 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000. Посевы осуществляли на пептонный агар из последнего разведения. Инкубировали в термостате при 30 °С в течение 2-3 суток. По истечении инкубационного периода подсчитывали количество выросших КОЕ, проводили их макро- и микроскопическую характеристику.

Для выявления бактерий использовали питательный агар («Nutrient Agar», HiMedia Laboratories, India), для выявления грибов – среду Сабуро («Sigma-Aldrich», USA). Для идентификации бактерий использовали «Определитель бактерий Берджи», анализировали фенотипические характеристики: морфологические – форма, цвет, величина, особенности взаиморасположения клеток; тинкториальные – характер окрашивания по Грамму; способность к спорообразованию; подвижность.

2.5 Методы исследования химического состава и свойств ПГА

Экстракцию ПГА из клеточной биомассы, которую предварительно сгущали на ультрафильтрационной установке АСФ20 (Владисарт,Россия) до 500г/л и далее высушивали в лиофильной сушилке LP10R (ilShinBioBase, Корея) до остаточной влажности 5%, проводили в блоке экстракции. Экстракцию осуществляли в две стадии: на первой стадии обезжиривали биомассу этиловым спиртом, на второй экстрагировали полимер метиленом хлористым. После этого раствор полимера фильтровали от клеточных стенок и осаждали полимер этанолом.

Состав высокоочищенных образцов ПГА, определяли методом хроматографии заранее полученных метиловых эфиров жирных кислот на хромато-масс-спектрометре GC–MS 7890/5975C (Agilent Technologies, США) и ^{1}H ЯМР спектроскопией растворов ПГА в CDCl3 на ЯМР-спектрометре Bruker AVANCE III 600 (Германия, 600.13 МГц; Красноярский региональный центр коллективного пользования СО РАН).

Физико-химические свойства полимеров определяли, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию, рентгеноструктурный анализ и дифференциально сканирующую калориметрию.

Молекулярную массу ПГА определяли с применением системы гель-проникающей хроматографии Agilent 1200 (США) с набором полистироловых стандартов «Sigma». Значение средней числовой молекулярной массы образцов расчитывали по формуле:

$$M_n = \Sigma\ (N_i \cdot M_i\ /\ N), \qquad (2.6)$$

где:

Ni — количество молекул массы I;

N — общее количество молекул;

Mi — масса молекул длины I.

Среднюю весовую молекулярную массу образцов определяли по формуле:

$$M_в = \Sigma\ (w_i \cdot M_i), \qquad (2.7)$$

где:

w_i – доля массы ($w_i = N_i \cdot M_i / \Sigma\ (N_i \cdot M_i)$.

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различными размерами молекул, вычисляли из соотношения:

$$PD = M_в / M_z. \qquad (2.8)$$

где:

$M_в$ – средневесовая молекулярная масса, г/моль;

M_n – среднечисловая молекулярная масса, г/моль.

Для изучения физико-химических свойств ПГА были использованы образцы полимера в виде порошков. Термический анализ проводили с применением дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария). Образцы навеской 4 мг в алюминиевых тиглях нагревали до 200°С, затем охлаждали до - 20°С, выдерживали в течении 20 минут, затем снова нагревали до 320°С. С помощью программного обеспечения «StarE» по пикам на термограммах определяли температуру стеклования, кристаллизации, плавления и термической деградации.

Степень кристалличности образцов определяли на порошковом дифрактометре D8ADVANCE (Bruker AXS, Германия) с линейным детектором VANTEC. Для этого в непрерывном режиме сняты рентгенограммы с пошаговым запоминанием накопленной за 114 с интенсивностью (шаг 0,016° по 2θ), интервал сканирования от 5° до 60° по 2θ. В промежутке от 48° до 60° наблюдался только равномерно понижающийся фон. В процессе измерений образцы вращались вокруг перпендикуляра к поверхности. Степень кристалличности определяли как величину отношения площади под рентгенограммой с вычтенным аморфным фоном к площади без вычитания фона. Для вычислений использована программа Eva из программного приложения к дифрактометру.

Изучение структуры и физико-механических характеристик полимеров проводили на пленках из образцов ПГА различного химического состава.

Получение пленок осуществляли путём разлива 2% раствора полимера в чашки Петри. Чашки помещали в бокс-ламинар фирмы «Labconco» (США) где в течение 48 ч происходило свободное испарение растворителя, далее плёнки досушивали в диссикаторе «Labconco» (США) до полного испарения растворителя.

Толщину пленок измеряли с помощью электронного микрометра EDM-25-0.001 (Германия).

Микроструктуру поверхности полимерных образцов исследовали методом растровой электронной микроскопии. Образцы в виде пленок размером 5×5 мм помещали на предметный столик и напыляли платиной с помощью установки Emitech K575X («Quorum Technologies Limited», Великобритания) (10 мА, 3×20 секунд). РЭМ снимки образцов получены с применением электронного микроскопа *S5500* («Hitachi», Япония).

Поверхностные характеристики полимерных образцов оценивали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E («Krüss», Германия) с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. На поверхность образца с помощью микрошприцов поочередно наносили капли воды и дийодметана объемом 1,5 мкл с видеофиксацией моментов взаимодействия каждой жидкости с поверхностью образца. Для нахождения краевых углов смачивания кадр видеозаписи капли после ее стабилизации обрабатывался в полуавтоматическом режиме встроенным в программный пакет методом «Circle». Из полученных значений методом Оунса-Вендта-Рабеля-Кьельбле рассчитывали свободную поверхностную энергию, ее дисперсную и полярную составляющие (мН/м).

Физико-механические свойства пленочных образцов в форме гантелей исследовали при комнатной температуре с помощью электромеханической разрывной машины Instron 5565 (Великобритания). С помощью программного обеспечения Bluehill 2 (Elancourt, Франция) были рассчитаны удлинение при разрыве (ε, %), напряжение при разрыве (σ, МПа) и Модуль Юнга (E, МПа). Погрешность измерений не превышала 10 %.

2.6 Статистические методы обработки результатов

Статическую обработку экспериментальных данных проводили по методике [Мальцева, П.М. Емельянова Н.А., 1982]. Определяли средние значения результатов; рассчитывали отклонения от среднего значения для каждого результата; дисперсию, стандартное отклонение отдельного результата и стандартное отклонение среднего результата. Достоверность полученных результатов определяли по критерию Стьюдента при избранной доверительной вероятности α = 0.95. Рассчитывали ошибку полученного среднего результата (степень адекватности). Устанавливали интервал, в котором с доверительной вероятностью α находится средний результат. Затем рассчитывали относительную ошибку. 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.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА СИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ НА ГЛИЦЕРИНЕ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВНОГО УГЛЕРОДНОГО СУБСТРАТА

Водородокисляющие бактерии, обладающие наиболее сильной внутриклеточной системой синтеза полигидроксиалканоатов и способные синтезировать полимеры различного химического состава, характеризуются широким органотрофным потенциалом. Поэтому используя их в качестве продуцентов для биосинтеза ПГА возможно привлечение широкой линейки углеродных субстратов, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств. Способность представителей водородных бактерий, в частности, *Alcaligenes eutrophus* Z-1 из коллекции хемолитотрофных культур Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (позднее переименованных в *Ralstonia eutropha*) использовать глицерин для синтеза поли-3-гидроксибутирата была показана в 1990 году [Волова, Калачева, 1990]. На основе этого штамма в результате селекционной работы в Институте биофизики СО РАН получена серия штаммов, характеризующихся более высокими скоростями роста и белоксинтезирующей активностью рибосом, синтезом ПГА на различных субстратах (H_2 + CO_2, синтез-газе, фруктозе, глюкозе, ацетате, жирных кислотах, растительных маслах). Наиболее продуктивными по выходу полимеров и способности синтезировать ПГА различного химического состава являются следующие штаммы: *Ralstonia eutropha* B-5786, *Ralstonia eutropha* B-8562, *Cupriavidus eutrophus* B-10646.

Оценке способности синтезировать ПГА этими штаммами, отбору наиболее продуктивного продуцента и исследованию особенностей и закономерностей аккумуляции ПГА при росте на глицерине посвящена настоящая глава.

3.1 Сравнительное исследование способности природных штаммов хемоорганотрофных водородокисляющих микроорганизмов синтезировать полигидроксиалканоаты на глицерине

Бактерии выращивали в периодической культуре в колбах на солевой среде Шлегеля с уменьшенной концентрацией источника азота (0,5 г/л). Все исследуемые штаммы оказались способными к усвоению глицерина в качестве единственного источника углерода (на этом начальном этапе был использован очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция). После замены сахаров глицерином бактерии не сразу утилизировали новый субстрат, а после лаг-фазы, длительность которой составляла 20-30 ч и более. Варьирование исходной концентрацией глицерина в среде от 5 до 20 г/л не влияло на длительность лаг-фазы. Более высокий урожай биомассы за 80 ч культивирования 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 *C. eutrophus* B-10646 57%; у штаммов *R. eutropha* B-5786 и *R. eutropha* B-8562, соответственно, 45 и 38% (рисунок 3.1).

Для адаптации культур к глицерину делали их пересевы в течение нескольких десятков циклов. Постепенно, по мере адаптации бактерий к данному субстрату длительность латентного периода сокращалась до полного его исключения на фоне повышения урожая биомассы клеток и выхода полимера.

Результаты продукции ПГА штаммами, адаптированными к глицерину, представлены на рисунке 3.1. Достигнутые в колбочной культуре урожаи по биомассе клеток составили у исследуемых штаммов от 5,0 до 7,0 г/л. Это сопоставимо с показателями при выращивании бактерий исследуемых штаммов на сахарах. Концентрация полимера в клетках у разных штаммов варьировала от 57 до 70% (к весу абсолютно сухой биомассы). Это выше показателей, полученных в аналогичных условиях культивирования многих природных штаммов: *C. necator* IPT 026, *Ps. oleovorans* NRRLB-14682, *Ps. corrugate* 388, *Paracoccus* sp. LL1 [Campos, 2014; Ashby, 2005; Kumar et al., 2018].

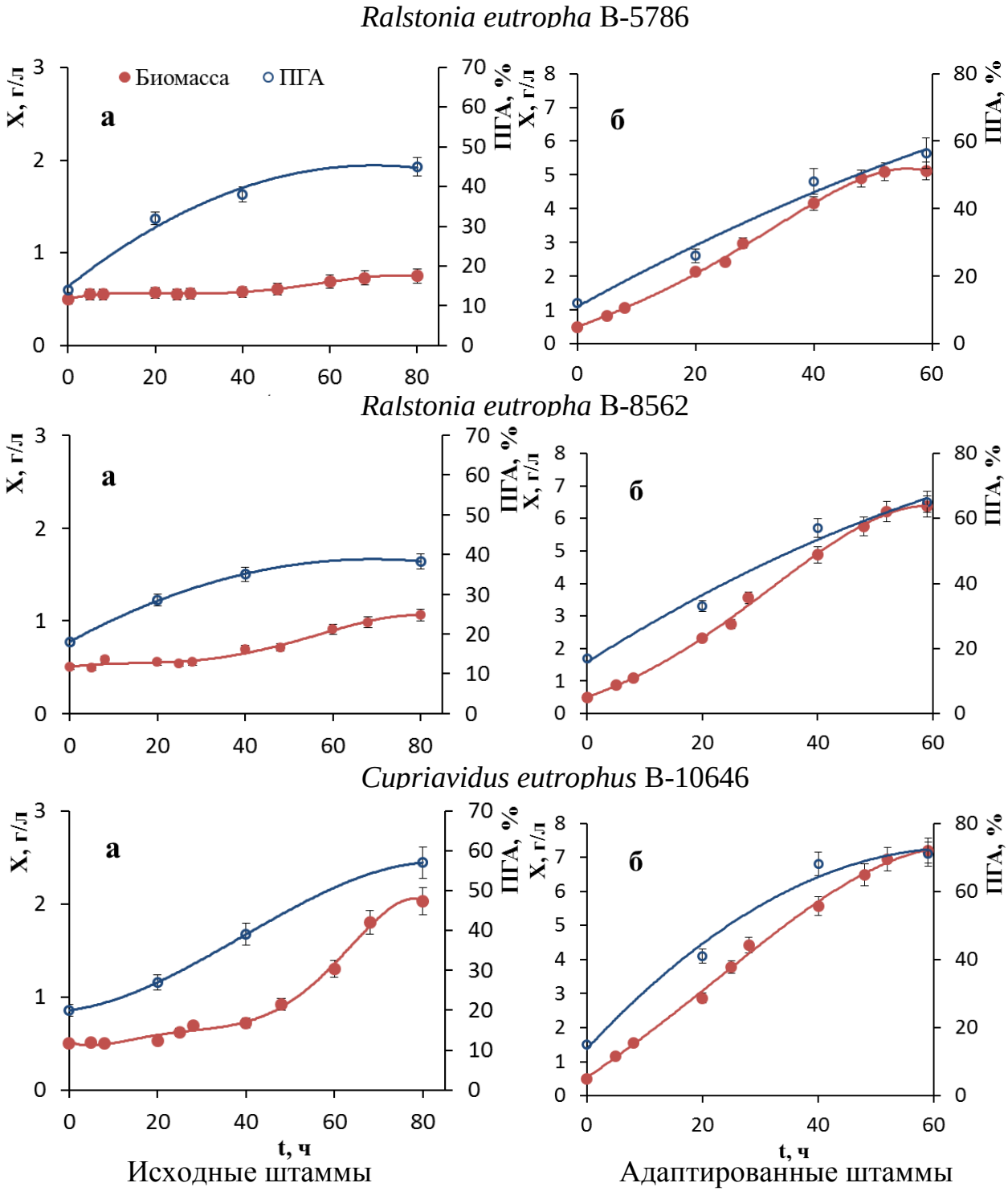


Рисунок 3.1. Продукционные характеристики исходных, не адаптированных к глицерину музейных штаммов (а) и после их адаптации (б) к глицерину, как единственному источнику углерода: урожай биомассы клеток (X, г/л) и выходы ПГА (% от АСБ)

Исходя из полученных данных более продуктивным был признан штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646, который был отобран для дальнейших исследований и масштабирования процесса.

3.2 Исследование способности штамма *C. eutrophus* B-10646 синтезировать сополимерные ПГА на глицерине в качестве основного С-субстрата

Наиболее ценными продуцентами ПГА являются штаммы, способные синтезировать, помимо высококристалличного поли-3-гидроксибутирата, сополимеры, содержащие мономеры, отличные от 3ГБ, что является весьма сложной технологической задачей. Включение различных мономеров в С-цепь 3-гидроксибутирата зависит от многих факторов: физиолого-биохимической специфики штаммов, субстратной специфичности ПГА-синтазы, устойчивости клеток к ингибирующему воздействию субстратов-предшественников искомых мономеров, условий аккумуляции ПГА на смешанном углеродном субстрате.

Известно, что штамм *C. eutrophus* B-10646 характеризуется способностью синтезировать сополимерные ПГА с различным набором мономеров при использовании в качестве основного С-субстрата сахаров, ацетата, жирных кислот, смесей H_2 и CO_2 и субстратов-предшественников (валерата, гексаноата, бутиролактона и др.) [Obruca 2010; Ciesielski et al., 2010; García et al., 2014; Passanha et al.,2013; Volova et al., 2013]. Цель данного раздела работы - исследование аккумуляции сополимерных ПГА в культуре *C. eutrophus* B-10646, выращиваемой на глицерине с добавками валерата калия (C_4H_9COOK), пропионата калия (C_2H_5COOK) и ε-капролактона - предшественников синтеза мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидроксибутирата.

Бактерии выращивали в периодической двустадийной культуре в стеклянных колбах на качалке, как описано в методической части. В период наиболее активного синтеза полимеров (10-12 ч от начала культивирования) в культуру добавляли субстрат-предшественник с концентрацией (0,5 – 1,0 г/л). Применение прекурсоров по-разному влияло на урожай биомассы клеток, выходы ПГА и

соотношение мономеров. Варьирование количества добавок валерата калия, пропионата калия и ε-капролактона позволило синтезировать серию сополимерных ПГА различного состава (рисунки 3.2 – 3.4)

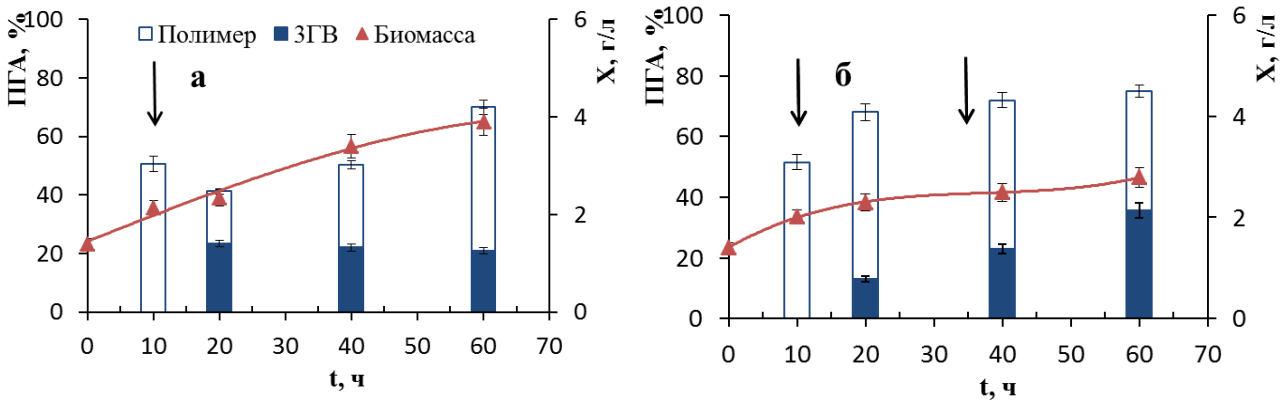


Рисунок 3.2 Синтез сополимерных ПГА *C. eutrophus* B-10646 при выращивании на глицерине с добавками в культуру валерата калия: а – однократная добавка; б – две последовательные добавки. Стрелками показаны моменты добавления прекурсора в среду культивирования.

При однократной добавке в культуру бактерий валерата калия в количестве 1,0 г/л через 10 ч зафиксировано включение мономеров 3-гидроксивалерата (3ГВ) в полимер до 23,4±1,4 мол.% (рисунок 3.2а) при общем содержании полимера в клетках 40,0±2,8%. К концу культивирования бактерий (через 60 ч) на фоне накопления внутриклеточного содержания полимера до 70,0±3,5% содержание мономеров 3ГВ несколько снижалось - до 21,0±1,0 мол.%. Было выявлено, что валерат калия оказывает ингибирующее действие на бактериальные клетки изучаемого штамма, что приводит к снижению выхода биомассы до 3,9±0,2 г/л.

При двух последовательных добавках валерата калия, содержание полимера в конце процесса культивирования составляло 70,0±4,0%, включение мономеров 3ГВ увеличилось до 35,7±2,0 мол.%. На фоне увеличившегося ингибирующего фактора накопление биомассы снизилось до 3,0±0,3 г/л (рисунок 3.2б).

При использовании в качестве прекурсора мономеров 3ГВ пропионата калия в количестве 1,0 г/л через 10 ч после его добавки включение мономеров

3ГВ в полимере составило 14,0±0,9 мол.%, содержание полимера 80,0±4,4% (рисунок 3.3а).

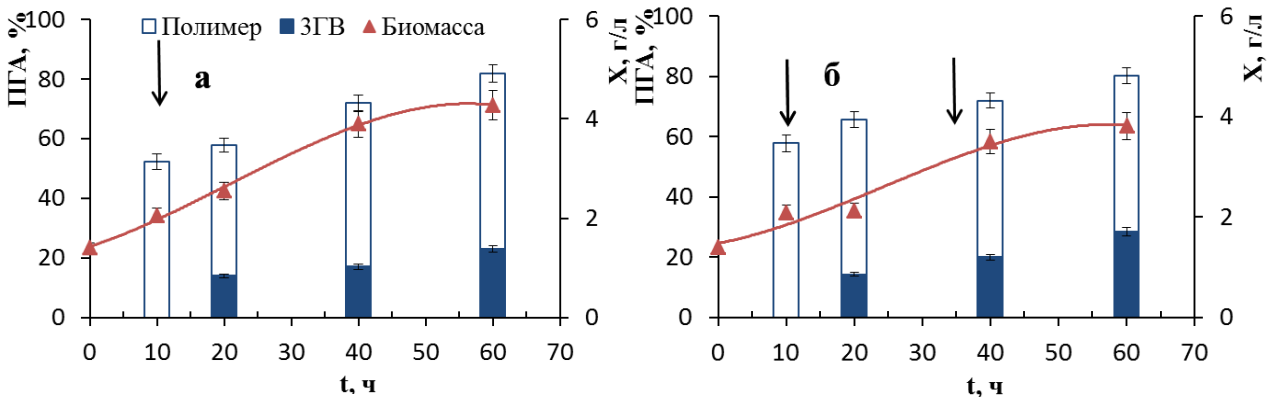


Рисунок 3.3 Синтез сополимерных ПГА C. eutrophus B-10646 на глицерине с добавками в культуру пропионата калия: а – однократная добавка; б – две последовательные добавки. Стрелками показаны моменты добавления прекурсора в среду культивирования.

К завершению эксперимента содержание полимера возросло до 81,9±4,9%, содержание мономеров 3ГВ - до 23,0±1,6%. При этом количество биомассы в культуре составляло 4,3±0,2 г/л.

Следует отметить, что в случае использования пропионата калия включение в полимер мономеров 3ГВ возрастает в течении всего периода культивирования и достигает максимума в конце. Тогда как в случае с валератом калия максимальное включение мономеров 3ГВ зафиксировано через 10 ч после добавления прекурсора.

При двукратной добавке пропионата калия, содержание полимера к концу эксперимента составило 81,3±5,7%, при этом включение мономеров 3ГВ увеличилось до 28,5±2,0 мол.%. В то же время количество биомассы снизилось до 3,8±0,2 г/л (рисунок 3.3б).

Из двух прекурсоров мономеров 3ГВ, пропианат калия проявляет меньший токсический эффект на клетки-продуценты, в результате урожай биомассы выше,

чем при использовании валерата калия. Оба прекурсора обеспечивают включение мономеров 3ГВ в полимер на уровне 30%.

Однакратная добавка ε-капролактона на 10 ч процесса в количестве 1,0 г/л в качестве предшественника мономеров 4-гидроксибутирата (4ГБ) привела к включению 4ГБ в полимер на уровне 5,0±0,2 мол.% (рисунок 3.4а).

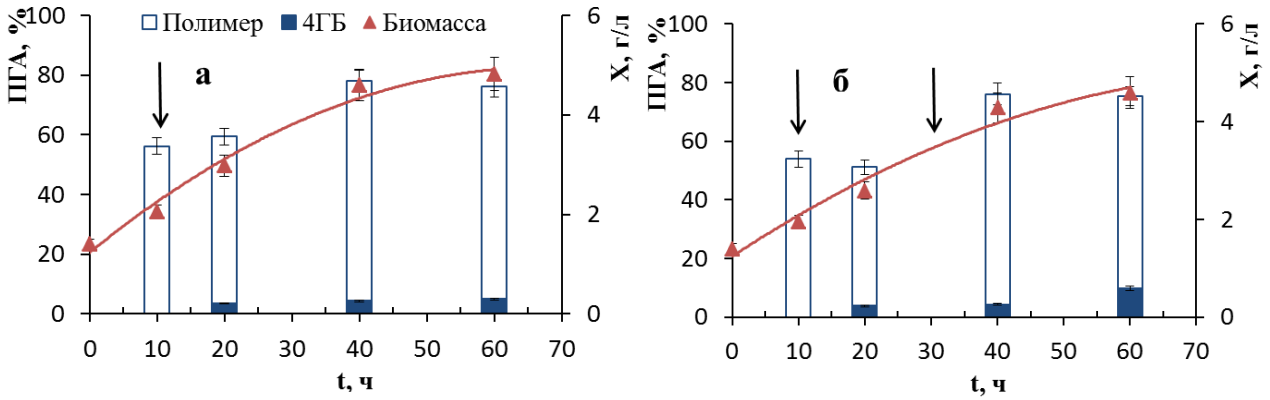


Рисунок 3.4 Синтез сополимерных ПГА *C. eutrophus* B-10646 на глицерине с добавками в культуру ε-капролактона: а – однократная добавка; б – две последовательные добавки. Стрелками показаны моменты добавления прекурсора в среду культивирования.

Урожай биомассы составил при этом 4,8±0,2 г/л, то есть вероятно имело место ингибирование культуры ε-капролактоном.

При двух добавках в культуру бактерий -капролактона отмечено увеличение содержания мономеров 4ГБ до 9,8±0,6 мол.%. Урожай биомассы составил 4,5±0,3 г/л (рисунок 3.4б). Хотя ε-капролактон и оказывает ингибирующее воздействие на культуру, но это воздействие ниже 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 возможен синтез не только гомополимера П(3ГБ), но и более технологичных сополимерных ПГА с различным набором и соотношением мономеров при некотором снижении продукционных показателей культуры.

3.3 Исследование влияния концентрации глицерина на кинетические и продукционные показатели процесса микробиологического синтеза ПГА

Для оценки влияния концентрации глицерина в среде на удельную скорость роста бактерий изучаемого штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 бактерии выращивали в периодической культуре в колбах объемом 1,0 л при разных концентрациях данного субстрата (рисунок 3.5).

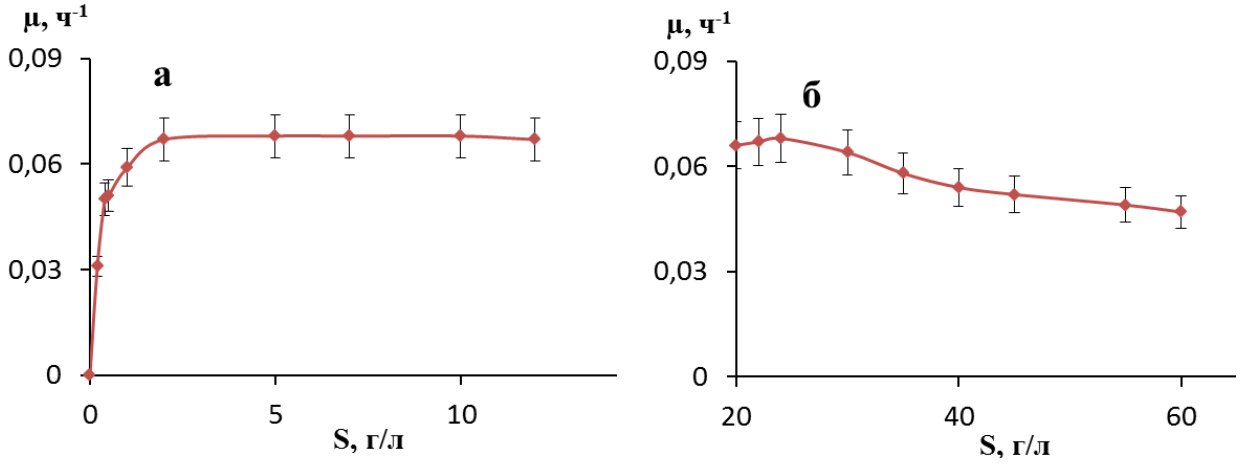


Рисунок 3.5. Зависимость удельной скорости роста *C. eutrophus* B-10646 от концентрации глицерина в среде (а – зона лимитирования; б – зона ингибирования)

Как следует из представленных данных, рост бактерий возможен при изменении концентрации глицерина в широких пределах, в диапазоне 1,0 - 60,0 г/л. Выявлено наличие широкого плато (при концентрации субстрата от 3,0 до 30,0 г/л), не влияющего на рост бактерий. Исследованные зоны лимитирования (рисунок 3.5а) и ингибирования (рисунок 3.5б) роста бактерий по глицерину составили, соответственно, 0,1 – 3,0 и 30 – 60 г/л. При этом следует отметить, что в зоне ингибирования не наблюдали экстремального снижения скорости роста бактерий.

Полученная в эксперименте 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) были рассчитаны кинетические константы для изучаемого штамма (K_s, K_i, μ_{max}) (рисунок 3.6).

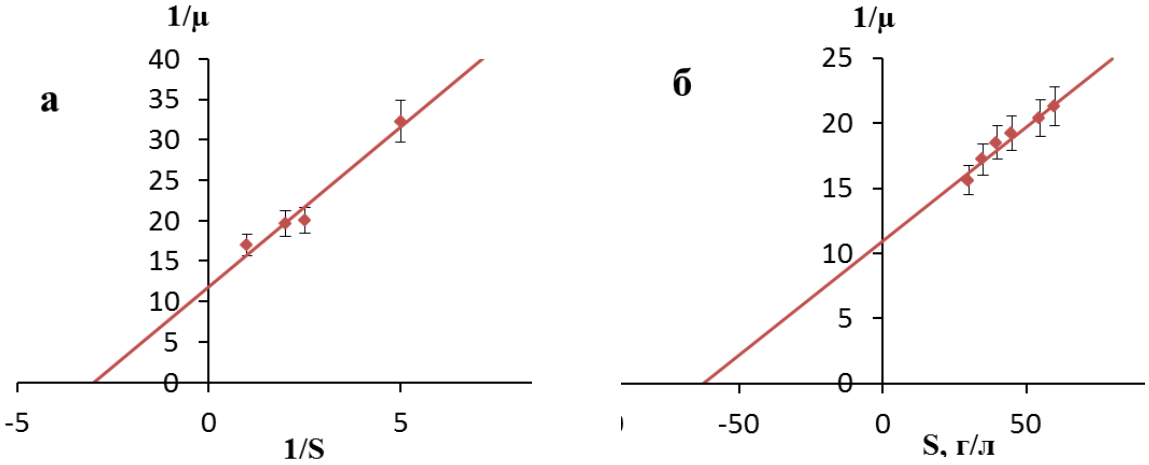


Рисунок 3.6 Зависимости удельной скорости роста бактерий *C. eutrophus* B-10646 от концентрации глицерина в области лимитирования по Лайнуиверу-Берку (а) и ингибирования субстратом по Диксону (б)

Таким образом, установлено, что для штамма *C. eutrophus* B-10646 возможен продуктивный рост на глицерине при его концентрации от 3 до 30,0 г/л. Субстратная константа по глицерину (K_s) для данного 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 $ч^{-1}$.

3.4 Исследование процесса синтеза ПГА при использовании глицерина различной очистки

Глицерин в зависимости от степени очистки имеет различные содержания основного вещества и примесей, а также стоимость. С точки зрения повышения экономичности биотехнологического процесса целесообразно привлечение «сырого», то есть неочищенного глицерина. Однако при этом возникает вопрос, как присутствующие в субстрате примеси будут влиять на рост бактерий и синтез полимера.

Для исследования этого аспекта были взяты три марки глицерина, с содержанием основного вещества: 99,3% (глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция)); 99,7% (глицерин-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды)); 82,07% (глицерин-III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия)). Состав и количество примесей в глицеринах представлены в главе 2 «Материалы и методы». Исходная концентрация глицерина в питательной среде во всех вариантах составила 15,0 – 16,0 г/л. Бактерии выращивали в стеклянных колбах в шейкере инкубаторе на солевой среде при содержании источника азота, составляющего 50% от физиологической потребности культуры (0,5 г/л).

Результаты исследования продукционных показателей колбочной культуры *C. eutrophus* B-10646 по выходу полимера и урожаю биомассы на различных глицеринах представлены на рисунке 3.7.

Как видно из представленных данных, на очищенном глицерине-I за 60 ч урожай биомассы клеток составил 6,1±0,3 г/л, с содержанием полимера в них 78,0±3,9% (рисунок 3.7а).

Аналогичный результат был получен при культивировании на очищенном глицерине-II: урожай биомассы и выход полимера составили 5,9±0,3 г/л и 77,1±3,9% (рисунок 3.7б). На не очищенном, «сыром» глицерине-III изучаемые показатели были близки двум предыдущим; общий урожай биомассы составил 5,2±0,3 г; содержание полимера в клетках составило 75% (рисунок 3.7в).

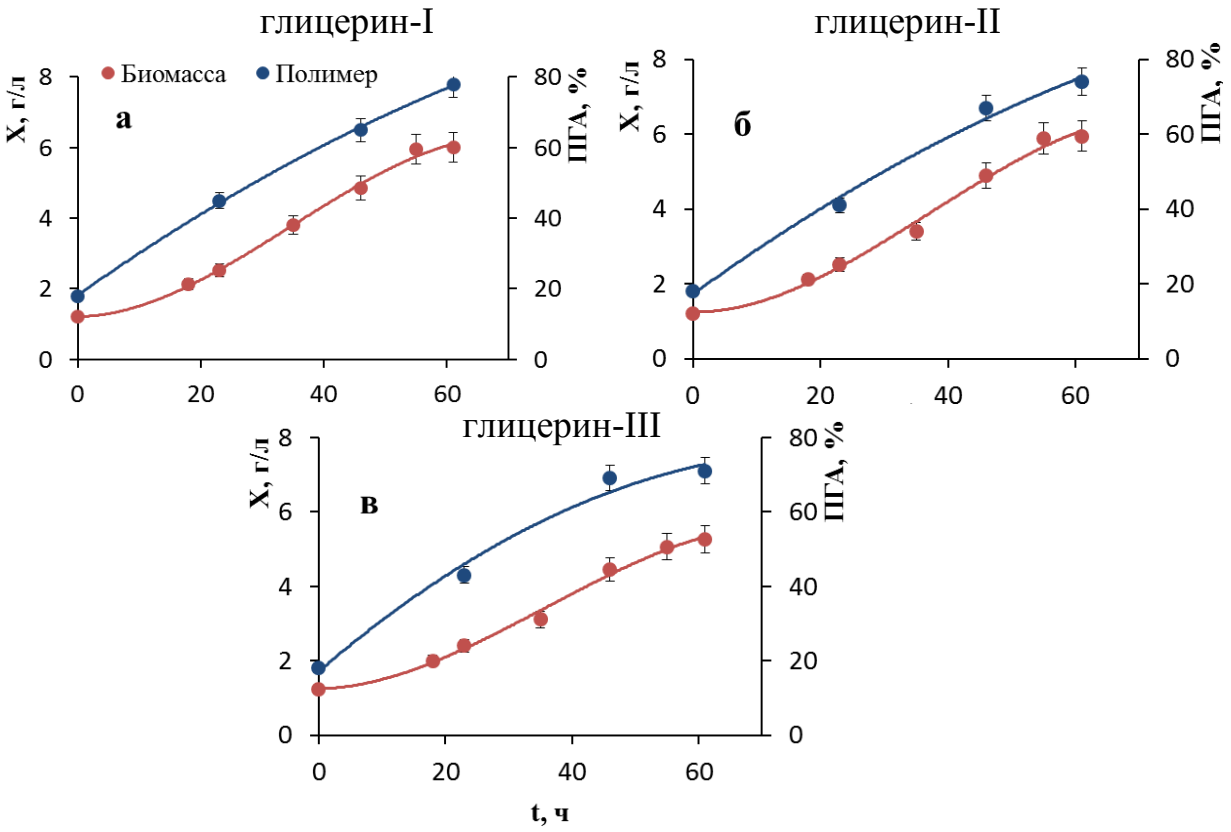


Рисунок 3.7 Продукционные характеристики культуры *C. eutrophus* B-10646 при культивировании на разных глицеринах.

Таким образом, показано, что для продуктивного синтеза ПГА исследуемым штаммом бактерий *C. eutrophus* B-10646 пригоден глицерин различной степени очистки. Это позволило перейти к следующему этапу работы - исследованию процесса биосинтеза ПГА в масштабированном варианте.

Культивирование штамма *C. eutrophus* B-10646 проводили в 30-ти литровом ферментере при рабочем объеме культуры 18 - 20 л и стартовой концентрации клеток в инокуляте 2,0 – 2,5 г/л.

Процесс реализован в двустадийной культуре на солевой среде, лимитируя рост клеток по азоту на первом этапе в течение 30 ч и на втором этапе в безазотной среде в течение 30 ч. Текущую концентрацию глицерина в культуре поддерживали на уровне 10-15 г/л при его дозировании в среду перистальтическим насосом. Результаты биосинтеза ПГА при росте на глицерине-I в условиях ферментера на представлены на рисунке 3.8.

Полученные результаты оценки продукционных показателей культуры *C.eutrophus* B-10646 на глицерине различной степени очистки по урожаю биомассы клеток и выходу полимера оказались близкими. Независимо от степени очистки глицерина, урожай общей биомассы составил за 60 ч порядка 70 г/л, содержание полимера в клетках 72-75%.

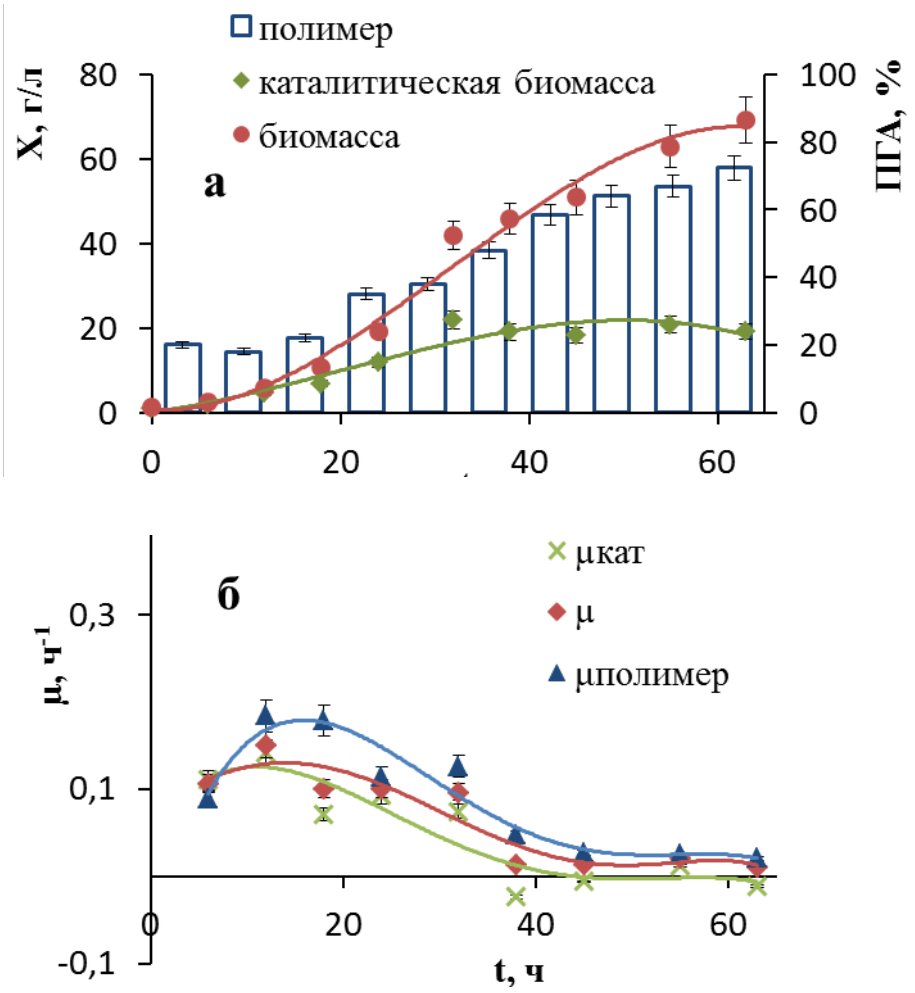


Рисунок 3.8 Показатели процесса синтеза ПГА в 30-л ферментере культурой *C.eutrophus* B-10646 на глицерине-I: а - концентрации общей и каталитически активной биомассы клеток в культуре (г/л) и полимера в клетках (% к АСБ); б - динамика удельной скорости прироста общей (μ, $ч^{-1}$) и каталитически активной ($μ_{кат}$, $ч^{-1}$) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ($μ_{полимер}$, $ч^{-1}$).

На очищенном глицерине-I урожай общей биомассы максимально достиг 70 г/л, содержание полимера в клетках 72-75%. Анализ полученных результатов, не выявил достоверно значимых отличий в кинетических показателях. Как показано

на рисунке 3.8б, удельные скорости прироста общей и активной биомассы клеток, а также потребление очищенного глицерина-I закономерно изменяются по ходу эксперимента. Максимальные значения удельной скорости роста бактерий (по общей и по активной биомассе) имели место в начальный период первого этапа процесса, составив, соответственно, 0,15±0,01 $ч^{-1}$ и 0,14±0,01 $ч^{-1}$ (рисунок 3.8б). Этому периоду соответствует наиболее активное потребление глицерина культурой, в среднем 4,0±0,2 г/г·ч. Скорость синтеза полимера на этом этапе составила 0,19±0,02 $ч^{-1}$ и имела во времени тенденцию к снижению. Спустя 30 ч общая концентрация биомассы клеток составила 42,1±1,7 г/л, содержание полимера в клетках достигло 47,8±%. С 31-го часа начался второй этап процесса, при котором подача азота в культуру была прекращена; контролируемая подача глицерина и минеральных элементов исключала возникновение дефицита этих субстратов в культуре. На втором этапе имели место постепенное снижение удельных скоростей роста бактерий и синтеза полимера на фоне падения потребления глицерина. В конце ферментационного периода (60 ч) общий урожай биомассы клеток составил 69,3±3,5 г/л, выход полимера 72,1±3,6%. Расход глицерина за весь период составил 3,5±0,2 кг, что соответствует экономическому коэффициенту Y_p 0,29±0,02 г/г.

На очищенном глицерине-II максимальные значения удельной скорости роста бактерий (по общей и по активной биомассе) на первом этапе процесса составили 0,15±0,02 $ч^{-1}$ и 0,13±0,02 $ч^{-1}$, что сопоставимо, с результатами на глицерине-I в этот период. Потребление глицерина в этот период составляло от 3,8 до 4,0 г/г·ч – при скорости синтеза полимера 0,18±0,02 ч-1 с тенденцией к снижению (рисунок 3.9б).

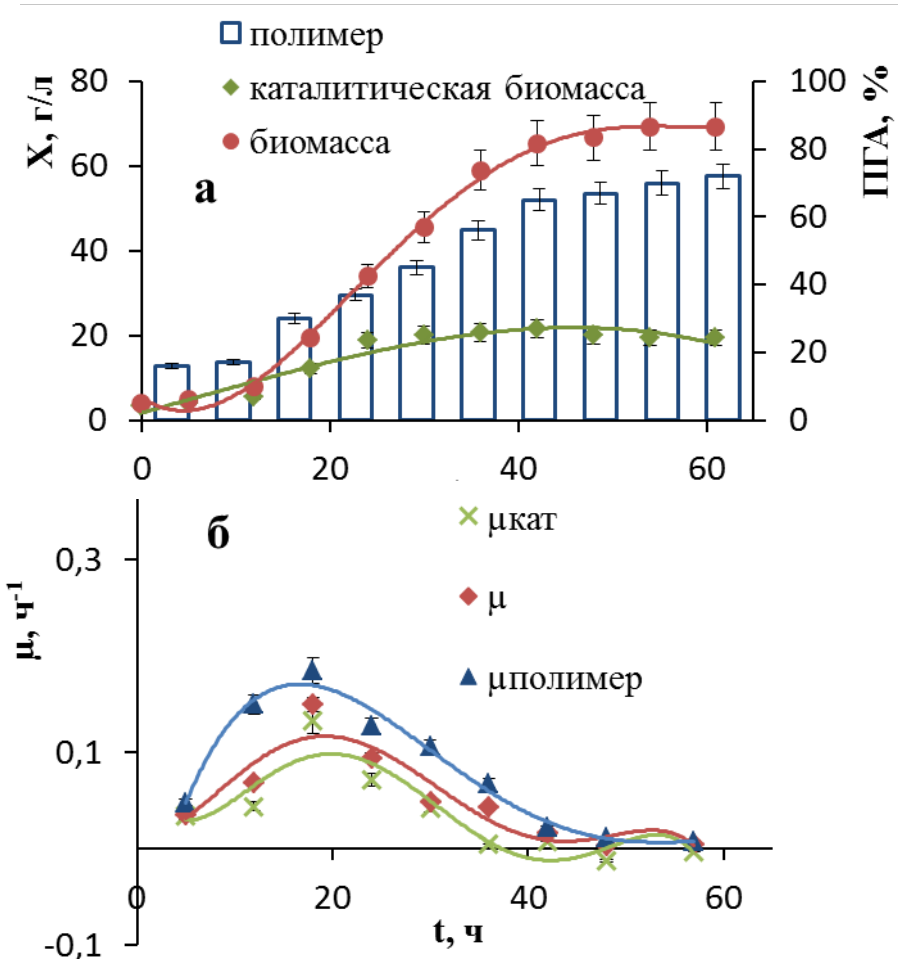


Рисунок 3.9 Показатели процесса синтеза ПГА в 30-л ферментере культурой *C.eutrophus* B-10646 на глицерине-II: а - концентрация общей и каталитически активной биомассы клеток в культуре (г/л) и полимера в клетках (% к АСБ); б - динамика удельной скорости прироста общей (μ, $ч^{-1}$) и каталитически активной ($μ_{кат}$, $ч^{-1}$) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ($μ_{полимер}$, $ч^{-1}$).

Спустя 30 ч общая концентрация биомассы клеток составила 45,6±2,2 г/л, содержание полимера в клетках достигло 55,1±2,7%. В конце ферментационного периода (60 ч) общий урожай биомассы клеток составил 69,8±3,5 г/л, выход полимера 73,3±3,6% (рисунок 3.9а). Расход глицерина за весь период составил 3,4±0,2 кг, что соответствует Y_p 0,29±0.02.

На неочищенном глицерине-III, максимальные значения удельной скорости роста бактерий были несколько ниже, чем полученные на очищенных глицеринах и составили в среднем на первом этапе процесса 0,14±0,01 $ч^{-1}$ и 0,13±0,01 $ч^{-1}$ при

потребление глицерина культурой на уровне 4,2±0,2 г/г·ч. Средняя скорость синтеза полимера на этом этапе составила 0,17±0,02 $ч^{-1}$ (рисунок 3.10).

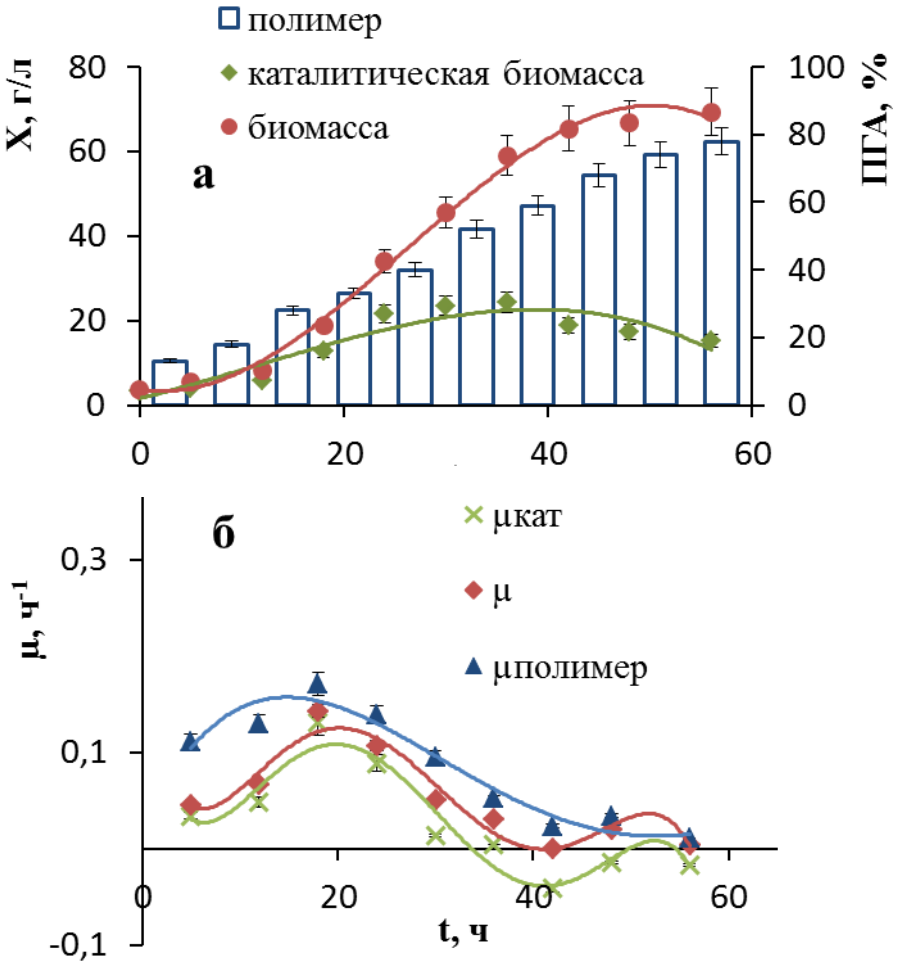


Рисунок 3.10 Показатели процесса синтеза ПГА в 30-л ферментере культурой *C.eutrophus* B-10646 на глицерине-III: а - концентрации общей и каталитически активной биомассы клеток в культуре (г/л) и полимера в клетках (% к АСБ); б - динамика удельной скорости прироста общей (μ, $ч^{-1}$) и каталитически активной ($\mu_{кат}$, $ч^{-1}$) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ($\mu_{полимер}$, $ч^{-1}$).

В конце этапа общая концентрация биомассы клеток достигла 46,2±2,7 г/л, содержание полимера в клетках 52,2±2,1%. В конце ферментационного периода (60 ч) общий урожай биомассы клеток составил 69,3±2,9 г/л, выход полимера 73,3±3,2%. Расход глицерина-III за весь период составил 3,8±0,2 кг, что

соответствует экономическому коэффициенту по полимеру Y_p - 0,26±0,02. Учитывая, что концентрация глицерина сырца составляет 82,07%, то экономический коэффициент в пересчёте на абсолютный глицерин составил Y_p - 0,29±0,02 г/г.

Продукционные характеристики процесса биосинтеза ПГА на разных глицеринах представлены в таблице 3.1

Таблица 3.1.- Продукционные показатели процесса синтеза ПГА на глицерине

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

* - удельная скорость роста в экспоненциальной фазе с 12 по 30 час

Сопоставление результатов с публикациями показывает, что применение неочищенного глицерина, как правило, сопровождается ингибированием роста бактерий и синтеза полимера. В выполненном исследовании показано, что продукционные характеристики культуры исследуемого штамма *C.eutrophus* B-10646 при использовании глицерина различной очистки сопоставимы; применение неочищенного сырого глицерина не ингибировало рост бактерий и общего урожая биомассы бактерий, а также накопление полимера в клетках. Экономические коэффициенты для глицерина-III, несколько ниже, чем для двух других, это связано с более низкой концентрацией целевого компонента в его составе.

3.5 Исходные данные для масштабирования процесса синтеза ПГА в условиях опытного производства

Выполненные эксперименты позволили сформулировать исходные данные для масштабирования процесса синтеза ПГА на глицерине до уровня опытного производства (таблица 3.1).

Таблица 3.1.- Исходные данные для масштабирования процесса синтеза ПГА на глицерине

Наименование	Значение	Примечание
1	2	3
Производственный штамм	*Cupriavidus eutrophus* B-10646	
Основной ростовой субстрат	Глицерин	Гетеротрофный режим
Режим процесса выращивания бактерий	периодический	
Длительность цикла с учетом получения посевного материала, ч	150±2	
Концентрация клеток в посевном материале, г/л	10±2	
Конечная концентрация биомассы клеток в культуре, Х, г/л	110±10	
Концентрация ПГА в посевном материале, %	не выше 20	
Длительность первого этапа периодического процесса, ч	27±3	лимит азота, 50% от потребности
Длительность второго этапа периодического процесса, ч	27±3	азот в среде отсутствует
Конечная концентрация ПГА в клеточной биомассе, % (к а.с.б.)	не ниже 75 ±5	
Продуктивность процесса по биомассе, Х, г/л ч	не ниже 1,1	
Продуктивность процесса по продукту (ПГА), г/л ч	не ниже 0,9	

Удельный расход кислорода, мг/г ПГА	0,045±0,001	
Удельный расход глицерина, г/г ПГА	3,4 – 3,8	
Текущая концентрация глицерина в культуре, г/л	10 - 20	
Режим контроля кислорода	DO-стат DO 30±5%	
Удельная подача азота в форме $CO(NH_2)_2$ в культуру, мг/г: - первый этап процесса - второй этап	 60 0	Первый этап – 50% от физиологической потребности
Текущая остаточная концентрация азота в культуре, мг/л	50-100	первая стадия периодического процесса,
Источник минеральных макро- и микроэлементов (г/л): $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $MgSO_4 \cdot H_2O$ – 0.2; $Fe_3C_6H_5O_7 \cdot 7H_2O$ – 0.025	Стандартная среда Шлегеля Железо лимоннокислое микроэлементы – по Хоагланду	При увеличении Х, г/л, свыше 10, вносить концентрат среды в режиме подпитки
Температура культуры, ^oC	31±1	стабилизация автоматически
pH	от 6,0 до 7,8	

Полученные исходные данные легли в основу масштабирования процесса синтеза ПГА в условиях опытного производства.

РЕЗЮМЕ:

В результате сравнительного исследования способности природных штаммов хемоорганотрофных водородокисляющих микроорганизмов синтезировать ПГА на глицерине в качестве наиболее продуктивного отобран штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646, обеспечивающий выходы по общей биомассе бактерий и полимеру, сопоставимые с процессом на сахарах. Установлена возможность штамма синтезировать на глицерине сополимерные ПГА с использованием в качестве прекурсоров валерата или пропионата калия и ε-капролактона. Синтезированы образцы полимеров 3ГБ/3ГВ с включением

мономеров 3ГВ от 20 до 37 и 3ГБ/4ГБ с содержанием мономеров 4ГБ (от 5,0 до 9,7 мол%). Исследованы влияния концентрации глицерина на кинетические и продукционные показатели процесса микробиологического синтеза ПГА, в результате определены границы физиологического действия глицерина, кинетические константы для исследуемого штамма бактерий и экономический коэффициент по субстрату. Показано, что исследуемый природный штамм *C.eutrophus* B-10646 не ингибируется при использовании не очищенного «сырого» глицерина и обеспечивает продуктивный синтез ПГА на глицерине различной очистки, по выходу биомассы (не менее 70 г/л) и полимеру (75-80%), сопоставимый с процессом на глюкозе. В результате проведенных исследований получены исходные данные для реализации опытного производства биосинтеза ПГА культурой *Cupriavidus eutrophus* B-10646 на глицерине.

ГЛАВА 4. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПГА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ НА ГЛИЦЕРИНЕ

Свойства ПГА значительно варьируют и определяются их структурой, прежде всего они зависят от строения боковых групп в полимерной С-цепи, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле. Различия физиолого-биохимической специфики штаммов продуцентов, варьирование условиями культивирования и углеродного питания позволяют получать полимеры различного химического состава, существенно различающиеся базовыми физико-химическими свойствами.

4.1 Влияния глицерина на состав и свойства ПГА

Синтезирована серия образцов ПГА в культуре *C. eutrophus* B-10646 на глицерине различной очистки в качестве единственного источника углерода с различным содержанием основного вещества (таблица 4.1).

Таблица 4.1. 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

Как следует из представленных ионных хроматограмм (рисунок 4.1), образцы ПГА, синтезированные на исследованных марках глицерина, представляли собой гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты - П(3ГБ).

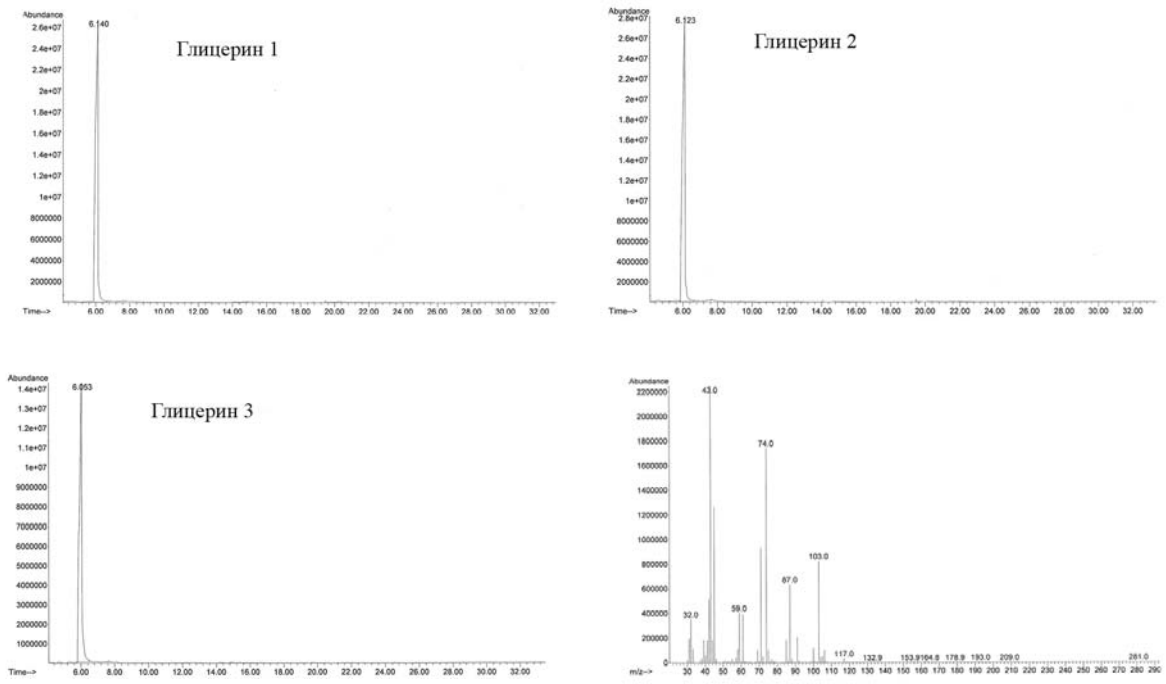


Рисунок 4.1. Ионные хроматограммы образцов П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* B-10646 на глицерине различной очистки: 1 -очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция); 2 - очищенный глицерин-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды); 3 - сырой глицерин-III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия); масс-спектр метилового эфира мономеров 3-гидроксибутирата – время удержания 6,053-6,140.

Одной из базовых характеристик ПГА являются молекулярно-массовые характеристики, которые определяют возможность переработки полимеров в изделия и механические характеристики последних. Исследование свойств образцов П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* B-10646 на трех типах глицерина, не выявили драматических изменений при использовании очищенного и неочищенного глицерина (рисунок 4.1).

Полимер, синтезируемый адаптированной к глицерину продуктивной культурой *C. eutrophus* B-10646 на двух типах очищенного глицерина, имел

близкие значения $M_ч$ - 104 и 115 кДа; и $M_в$ - 355 и 416 кДа, а также полидисперсности (D), соответственно, 3,42 и 3,63. При использовании неочищенного глицерина значения $M_ч$ и $M_в$ были несколько ниже - 87 и 304 кДа. При этом все полученные значения в целом ниже, чем получаемые ранее на образцах П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* В-10646 на других С-субстратах.

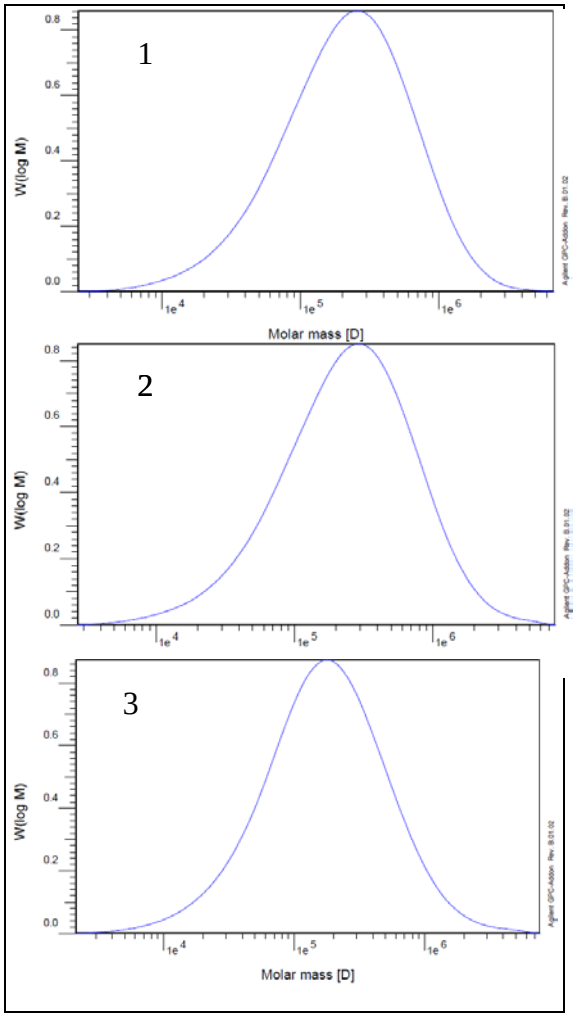


Рисунок 4.2. Хроматограмма распределения молекулярных масс образцов П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* В-10646 на трех марках глицерина различной очистки: 1-очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция); 2-очищенный глицерин-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды); 3 - сырой глицерин-III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия).

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 дальнейшей полимеризации мономеров, происходит блокирование (закупорка) С-цепи, проанализирована структура образцов полимера с применением ЯМР (рисунок 4.3). Полные спектры ^{1}H ЯМР трех образцов П(3ГБ), синтезированных на трех марках глицерина, оказались сходными (рисунок 4.3) 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.

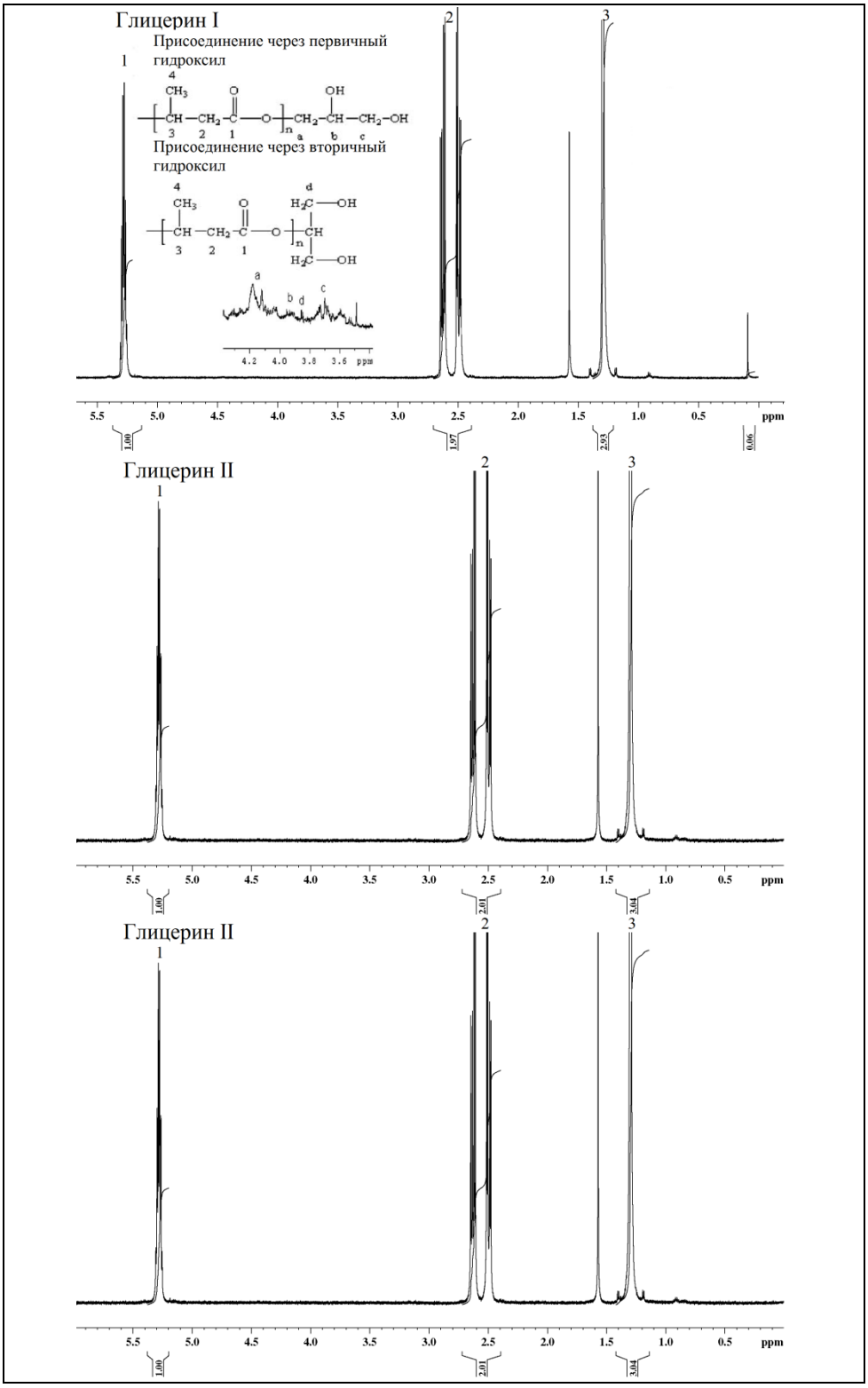


Рисунок 4.3. ^{1}H-ЯМР спектры образцов П(3ГБ), синтезированных бактериями *C. eutrophus* B-10646 на трех марках глицерина различной очистки: 1 - CH группа, 2 - CH_2 группа, 3- CH_3 группа.

Расширение спектральной области между 3,0 и 4,5 м.д. выявило наличие дополнительных резонансов, соответствующих терминальным группам глицерина. Расширенная область 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. Глицерин состоит из 2 первичных и 1 вторичной гидроксильных групп, поэтому существует вероятность того, что присоединение глицерина к мономерам 3ГБ в цепи П(3ГБ) также может быть результатом ковалентного связывания во вторичной гидроксильной группе глицерина [Zhu et al., 2010; Ashby et al., 2005; 2011].

ПГА относятся к полукристаллическим полимерам, у которых соотношение аморфной и кристаллической фаз изменяется в зависимости от химического состава, набора и соотношения мономеров. На рисунке 4.4 представлены рентгенограммы образцов П(3ГБ), синтезированных на глицерине различной очистки.

Все три образца П(3ГБ) имели близкие значения степени кристалличности (50-55%). Это не характерно для высококристалличного поли-3-гидроксибутирата, у которого упорядоченная фаза преобладает над неупорядоченной, и степень кристалличности (C_x) составляет от 65 до 80%. Отбор и анализ образцов полимера, синтезированного *C. eutrophus* B-10646 в разные фазы роста культуры на глицерине, показал, что, независимо от возраста культуры, то есть от скорости синтеза полимера и его внутриклеточного пула, C_x не превышает 50-55 % (таблица 4.2). Таким образом, на глицерине синтезируются образцы полимеров, в которых имеет место выравнивание аморфной и кристаллической фаз в объеме полимера.

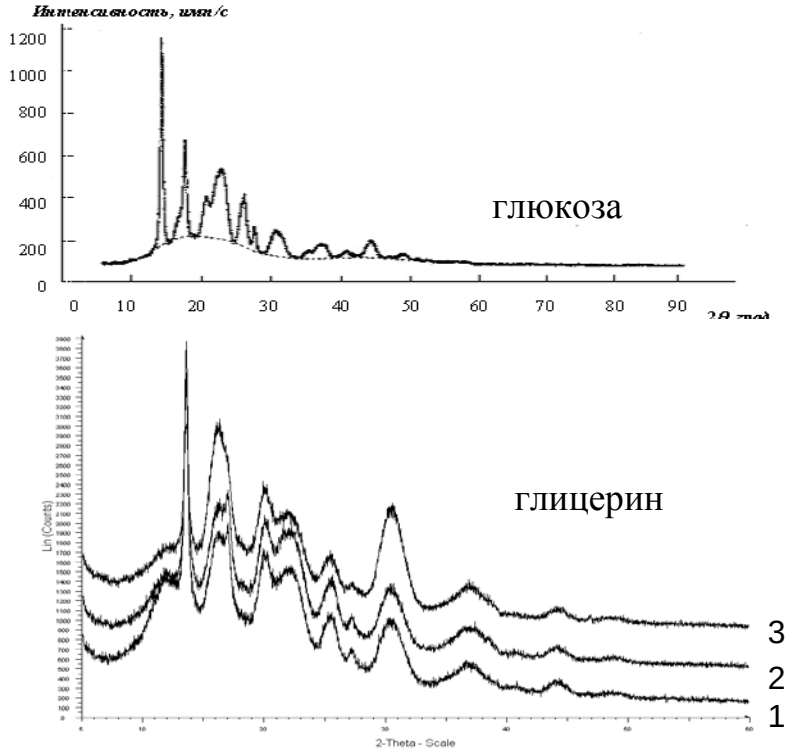


Рисунок 4.4. Рентгенограммы образцов П(3ГБ), синтезированных бактериями *C. eutrophus* B-10646 на глюкозе и глицерине различной очистки:
1 - очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция); 2- очищенный глицерин-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды); 3- сырой глицерин-III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия)

Таблица 4.2. – Степень кристалличности П(3ГБ), синтезированного в ходе развития периодической культуры *C. eutrophus* B-10646 на глицерине

Возраст культуры, ч	Урожай биомассы, г/л	Внутриклеточное содержание П(3ГБ), %	Степень кристалличности, %
7	6,1	21	54
18	19,4	37	46
28	39,3	42	58
40	63,3	65	56
55	71,0	71	55

На рисунке 4.5 представлены результаты дифференциальной сканирующей калориметрии образцов П(3ГБ). Отклонений в показателях температурных характеристик, у исследованных образцов П(3ГБ) не обнаружено. Температуры: плавления (Тпл); кристаллизации (Ткрист); деградации (Тдегр) находились в ранее выявленных пределах значений, полученных на образцах П(3ГБ), синтезированных на других С-субстратах (СО2 и сахарах).

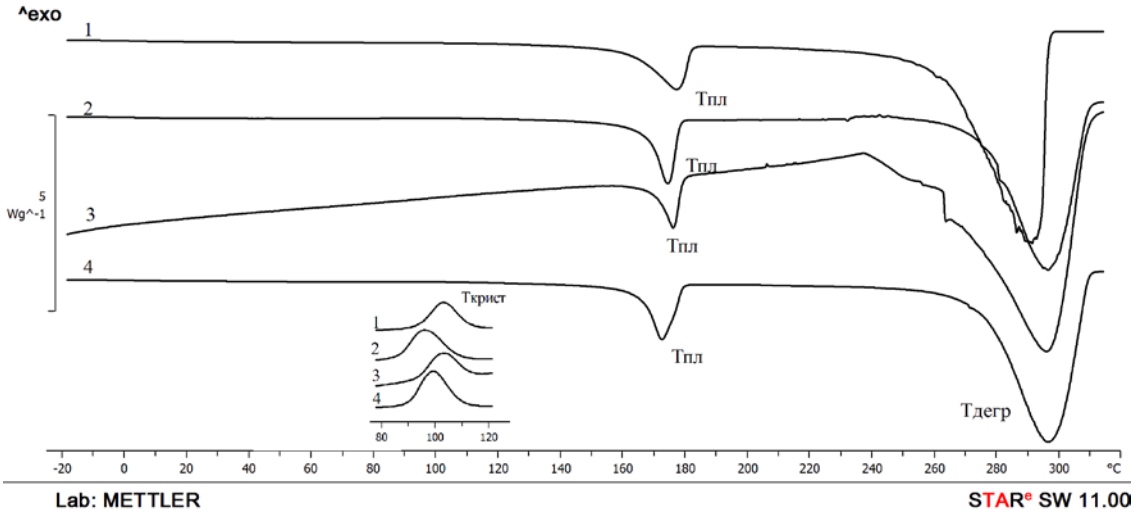


Рисунок 4.5. Термограммы образцов П(3ГБ), синтезированных бактериями *C. eutrophus* B-10646 на глюкозе и глицерине различной очистки: 1 – глюкоза; 2 - очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция); 3- очищенный глицерин-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды); 4- сырой глицерин-III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия).

Температура плавления, для полимеров, полученных на других углеродных субстратах ранее, находилась в пределах 172 – 178 ^{0}C. Для образцов, синтезированных на глицерине, $T_{пл}$ составила 172 – 176 ^{0}C (рисунок 4.5 кривые 2 – 4), для П(3ГБ), синтезированного на глюкозе, $T_{пл}$ 178 ^{0}C (кривая 1 рисунок 4.5).

Для полимера, синтезированного на глицерине II, отмечается ранее начало деградации образца 242±2 ^{0}C, по сравнению с остальными образцами 268±2 ^{0}C. Полная деградация образцов происходит в пределах от 290 до 310 ^{0}C.

Для образцов, полученных на глицерине I и III, зафиксирована температура стеклования ($T_{стекл}$) 2,7±0,2 ^{0}C и 2,9±0,2 ^{0}C соответственно. Для П(3ГБ), синтезированных ранее на сахарах, зафиксировать изменения, протекающие в аморфной части, не удавалось. По литературным данным $T_{стекл}$ для П(3ГБ) фиксируется в диапазоне от минус 2 до 7 ^{0}C.

Таким образом, при синтезе на глицерине, за исключением температурных характеристик, происходят изменения физико-химических свойств П(3ГБ), включающие снижение значений средневесовой молекулярной массы ($M_в$ до 304-416 кДа), а также степени кристалличности ($C_х$) до 50-55%, что является значимым фактом, так как ПГА с пониженной степенью кристалличности более технологичны и обеспечивают получение изделий более высокого качества.

4.2 Структура и физико-механические свойства пленок, полученных из П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* B-10646 на глицерине

РЭМ снимки наливных пленок, полученных из растворов П(3ГБ), синтезированных на глицерине, представлены на рисунке 4.6. Структура поверхности пленок из П(3ГБ), синтезированного на двух марках очищенного глицерина сходна и аналогична образцам пленок из полимера, синтезированного на глюкозе. Пленки, полученные на двух марках очищенного глицерина (рисунок 4.6, 1 и 2) имели выраженную рельефную структуру поверхности с крупными разнонаправленными складками и многочисленными порами диаметром от 0,5 до 3,0 мкм. При этом пористость более выражена на пленках, полученных из П(3ГБ), синтезированного на очищенном глицерине до 1250 пор на мм^2. Пленки, полученные из полимера, синтезированного на неочищенном (сыром) глицерине - плотной структуры, практически лишены пор.

Рельефность (складчатость) поверхности выражена в меньшей степени, - складки менее глубокие и характеризуются ориентированностью в отличие от беспорядочной складчатости, характерной для пленок из П(3ГБ), синтезированного на очищенном глицерине.

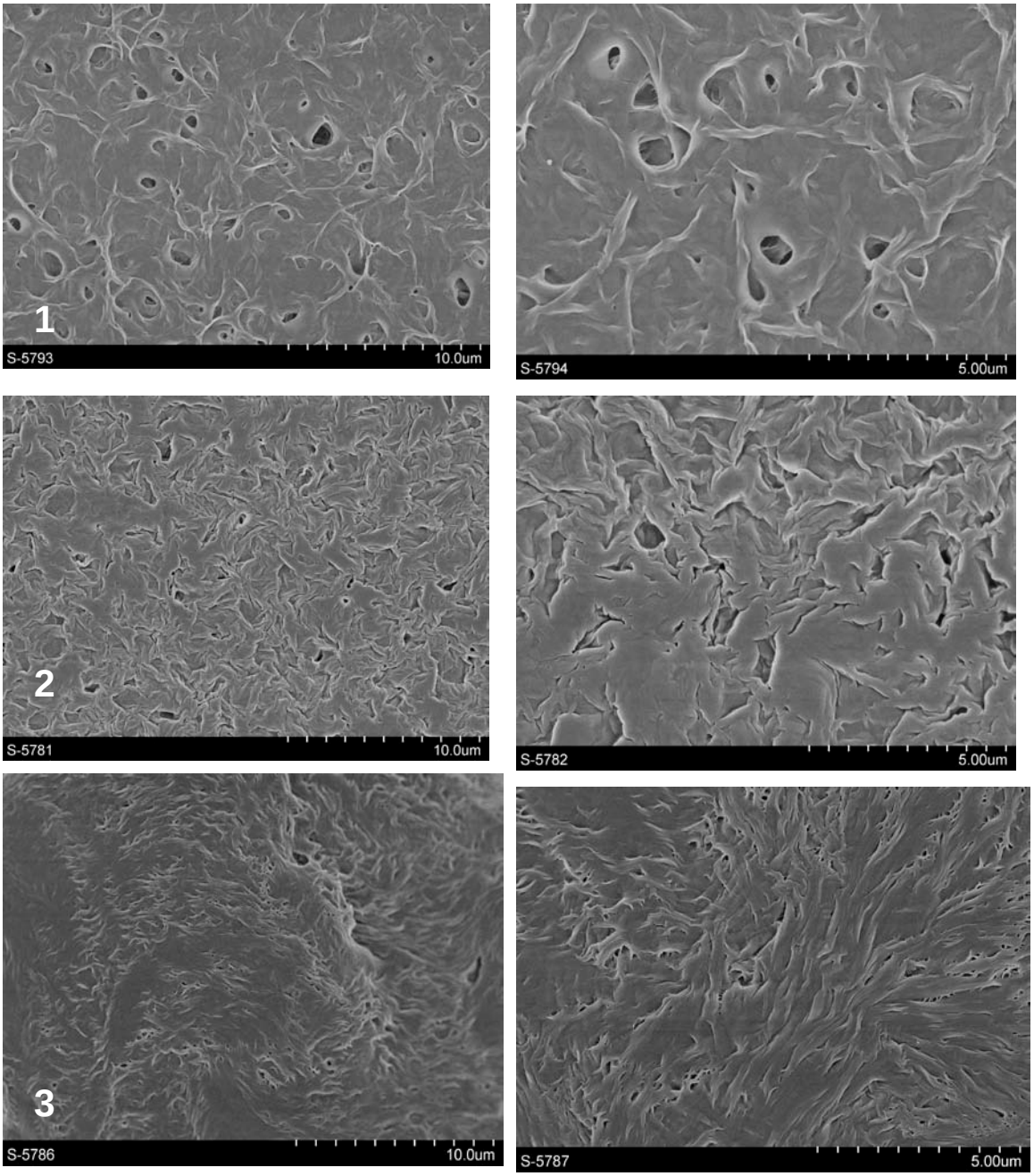


Рисунок 4.6. РЭМ снимки образцов пленок, полученных из П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* B-10646 на глицерине различной очитки: 1 - очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция); 2 - очищенный глицерин-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды); 3 - сырой глицерин -III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия)

Шероховатость поверхности является важным параметрам, оказывающим влияние на свойства изделий. Шероховатость поверхности на уровне нанометров

может определять адгезию, распластывание и двигательную активность клеток, а также синтез специфических белков. Результаты исследования полимерных пленок атомно-силовой микроскопией также показали влияние типа глицерина на структуру поверхности (рисунок 4.7; таблица 4.2). Значения шероховатости поверхности пленок из П(3ГБ) в зависимости от типа С-субстрата существенно различались. Наиболее высокие значения показателя среднего арифметического отклонения профиля, т.е. шероховатости (Ra) – 41 нм, зарегистрированы для образца на глюкозе, наиболее низкое значение шероховатости поверхности – 17,36 нм определено для образца на сыром глицерине. Относительно высокие значения показателя среднеквадратичной шероховатости (Rq) 46 и 52 нм, зарегистрированы у образцов на глюкозе и у пленок из П(3ГБ), полученных на очищенном глицерине. Высота неровностей профиля по десяти точкам (Rz) варьировала от 190 до 241 нм и была значительно выше у пленок из полимера, синтезированного на очищенном глицерине, в отличие от пленок из П(3ГБ) на сыром глицерине – 190,6 нм.

Таблица 4.2 - Показатели шероховатости образцов пленок из П(3ГБ), синтезированного на глицерине различной очистки по результатам АСМ

П(3ГБ), субстрат	Ra – среднее арифметическое отклонение профиля (шероховатость), нм	Rq– среднеквадратичная шероховатость, нм	Rz – высота неровностей профиля по десяти точкам, нм
Глюкоза	41,321	52,2407	197,6
Очищенный глицерин (I)	36,70	46,8	241, 1
Сырой глицерин (III)	17,36	23,25	190,6

Результаты АСМ иллюстрируют различия шероховатости поверхности пленок (рисунок 4.7).

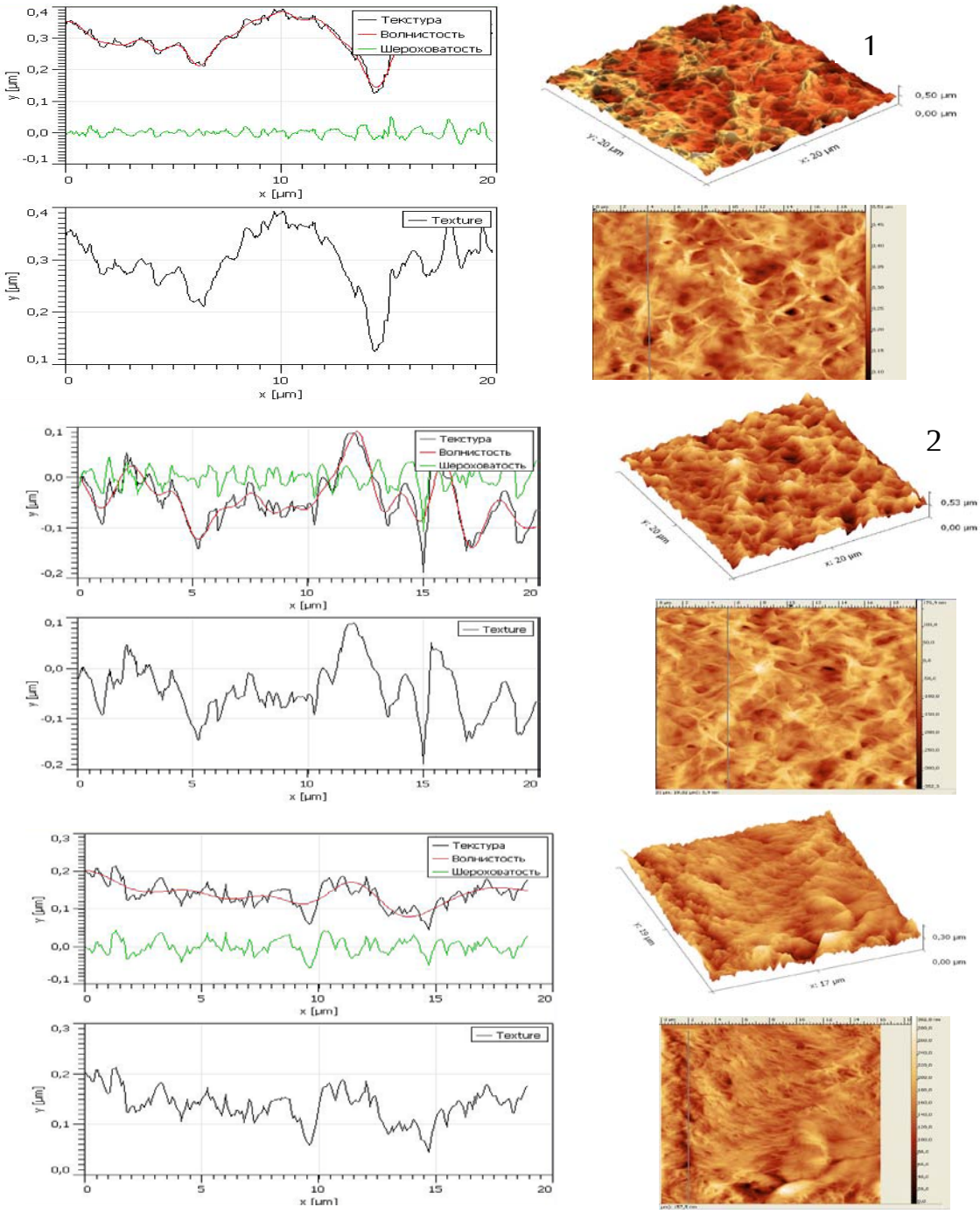


Рисунок 4.7. АСМ снимки образцов пленок, полученных из П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* B-10646 на глюкозе (1) и глицерине различной очистки: (2) - очищенный глицерин-I («Corporate Oleon», Швеция); (3) - сырой глицерин-III («Prisma comercial exportadora de oleoquimicos LTDA», Бразилия)

Результаты исследования характеристик поверхности пленок из П(3ГБ) на базе измерения краевого угла смачивания поверхности жидкостями, представлены в таблицах 4.3-4.4, из которых видно значительное влияние типа С-

субстрата на эти показатели. Величина краевого угла смачивания водой у пленок, полученных из П(3ГБ), синтезированного на глицерине, по сравнению с этой величиной у пленок из полимера, синтезированного на глюкозе (87,42^{o}), значительно ниже, 55,7^{o} и 64,3^{o} соответственно, для очищенного и сырого глицерина. Аналогично, рассчитанная с учетом данных по краевым углам смачивания водой и диодметаном полярная составляющая свободной поверхностной энергии примерно в 2 и 1,5 раза выше для образцов, полученных на средах с очищенным и сырым глицеринах, соответственно, чем при использовании глюкозы в качестве субстрата. Это свидетельствует о положительном влиянии глицерина как субстрата, выражающемся в повышении гидрофильности поверхности изделий.

Таблица 4.3. - Результаты измерения краевых углов смачивания жидкостями поверхности пленок из П(3ГБ), синтезированного на глицерине различной очистки

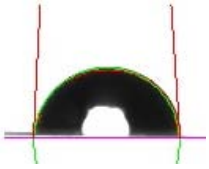
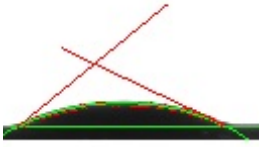
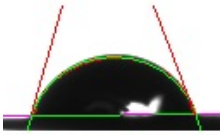
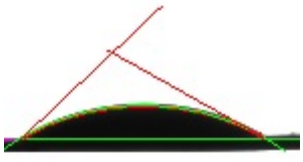
П(3ГБ), субстрат	Вода	Дииодметан
Глюкоза		
Очищенный глицерин (I)		
Сырой глицерин (III)		

Таблица 4.4. - Свойства поверхности полимерных пленок, полученных из П(3ГБ), синтезированного на глицерине различной очистки

П(3ГБ), субстрат	Краевой угол смачивания водой [^{o}]	Дисперсная составляющая [mN/m]	Полярная составляющая [mN/m]
Глюкоза	87,42±2,63	30,43±1,01	8,23 ± 1,37
Очищенный глицерин-I	55,7 ± 7,6	44,7 ± 2,18	16,2 ± 1,06
Сырой глицерин-III	64,3 ± 7,9	44,3 ± 2	10,7 ± 0,8

Исследование физико-механических свойств плёнок (таблица 4.5) показало, что прочностные характеристики плёнок, синтезированных на глицерине несколько ниже, чем пленок синтезированных на глюкозе. Самыми низкими прочностными характеристиками обладают плёнки из полимера, синтезированного на сыром глицерине.

Таблица 4.5. - Физико-механические свойства полимерных пленок, полученных из П(3ГБ), синтезированного на глицерине различной очистки

П(3ГБ), субстрат	Модуль Юнга, МРа	Предел прочности, МРа	Удлинение при разрыве, %
Глюкоза	2071,20	16,70	2,5
Глицерин-I	1653,79	14,66	1,45
Глицерин-II	1715,85	16,78	1,19
Глицерин-III	1436,82	12,46	1,16

4.3 Свойства сополимерных ПГА, синтезируемых *C. eutrophus* B-10646 на глицерине

С использованием в составе питательной среды, помимо глицерина в качестве основного углеродного субстрата, субстратов предшественников

мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидроксибутиратата, соответственно, валерата калия или пропионата калия и ε-капролактона синтезирована серия сополимеров с различным соотношением мономеров (таблица 4.6). Химический состав полимеров подтвержден снятыми ионными хроматограммами с масс-спектрами (рис. 4. 8 а,б) и ^{1}Н ЯМР спектрами (рис. 4.9).

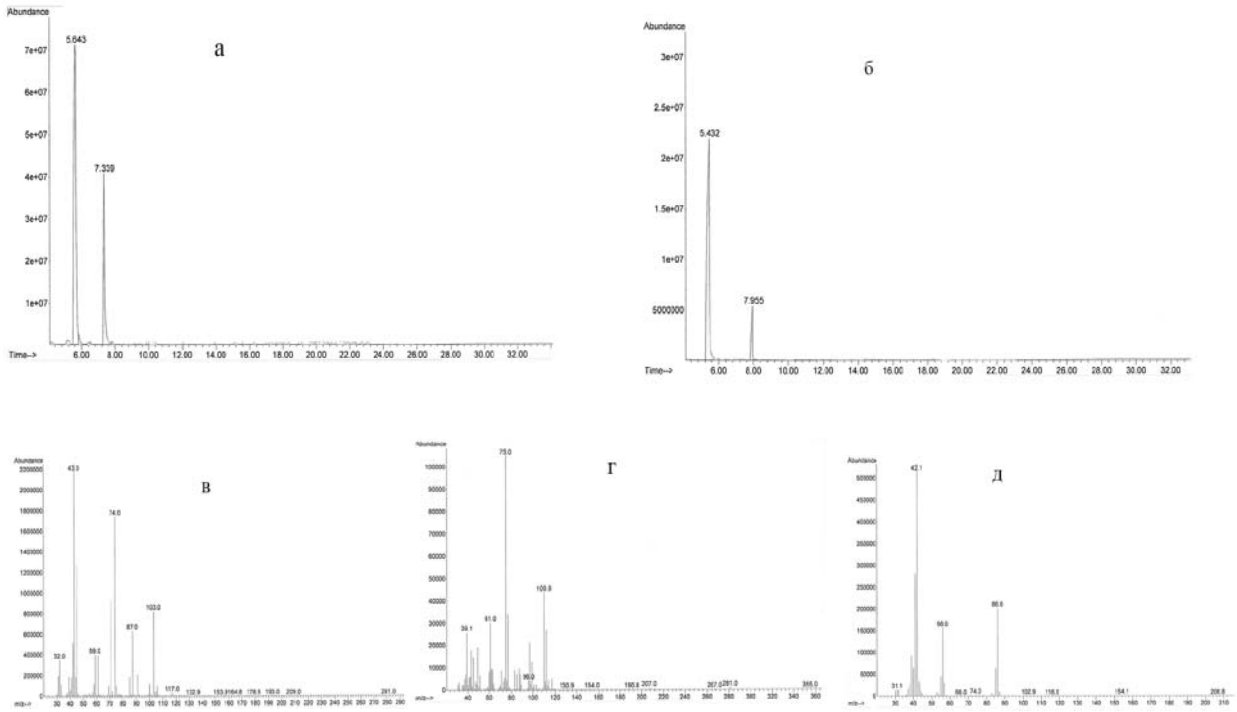


Рис. 4.8. Ионные хроматограммы сополимерных образцов ПГА, синтезированных на глицерине в качестве основного источника углерода: П(3ГБ/3ГВ) с содержанием мономеров 3ГВ 35,7 мол.% - (а); П(3ГБ/4ГБ) с содержанием мономеров 4ГБ 9,8 мол.% - (б) и масс спектры метиловых эфиров мономеров, входящих в состав сополимеров: метил-3ГБ - (в), метил-3ГВ - (г) и γ-бутиролактон - (д) с временами удержания 3ГБ, 3ГВ, 4ГБ, соответственно, 5,432-5,643, 7,339, 7,955.

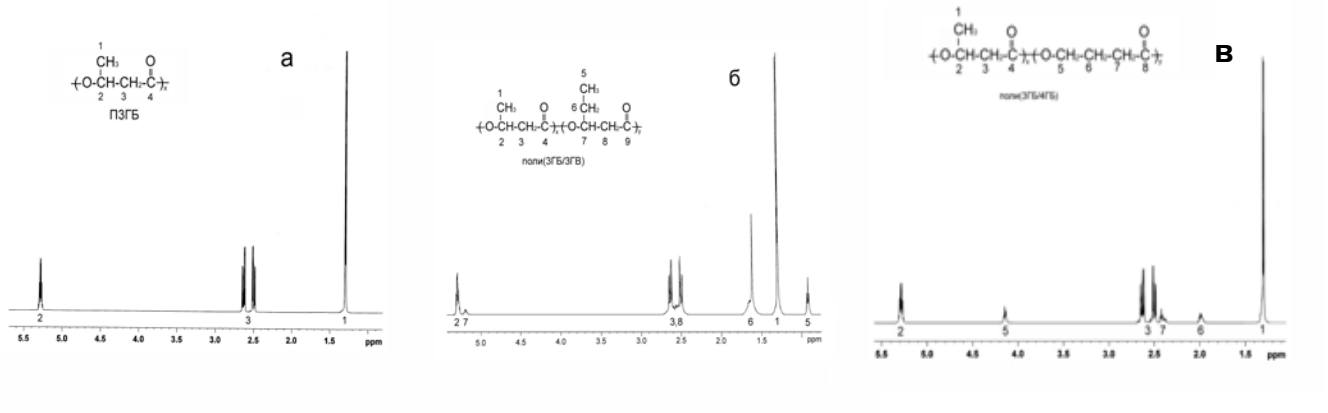


Рис. 4.9. ^{1}H ЯМР спектры образцов ПГА, синтезированных на глицерине в качестве основного источника углерода: П(3ГБ) – а; П(3ГБ/3ГВ) – б; П(3ГБ/4ГБ) – в; масс спектры мономеров 3ГБ, 3ГВ, 4ГБ.

Таблица 4.6. Химический состав и свойства сополимерных ПГА, синтезированных *C. eutrophus* B-10646 на очищенном глицерине-I с добавками субстратов предшественников

Субстрат	Состав полимера, мол.%			$M_ч$ кДа	$M_в$, кДа	D	$C_х$, %	$T_{стекл}$, °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

Как и у ПГА синтезированных на других углеродных субстратах, для образцов полученных с использованием глицерина характерно снижение средне весовой молекулярной массы ($М_в$), степени кристалличности ($С_х$), и температурных характеристик при введении бокового заместителя.

$М_в$ у сополимеров содержащих мономеры 3ГВ находилась в диапазоне от 253 до 287 кДа, что на 50 – 100 кДа ниже чем у П(3ГБ). Увеличение количества 3ГВ в составе к дальнейшему снижению $М_в$ не приводит. Для образцов содержащие мономеры 4ГБ снижение $М_в$ было значительно ниже, $М_в$ находилась в диапазоне 290 – 299 кДа. Среднечисловая молекулярная масса практически не изменилась и находилась в диапазоне от 97 до 119 кДа (табл. 4.2).

Для всех образцов зафиксировано снижение $С_х$ по сравнению с П(3ГБ), синтезированном на глицерине без прекурсоров. Для сополимеров содержащих мономеры 3ГВ этот показатель находился в диапазоне 41 – 46% и не зависел от количества включённого 3ГВ. Для сополимера содержащего 5% мономеров 4ГБ $С_х$ составила 52% и с увеличением включения 4ГБ до 10% снизилась до 46%.

Термограммы сополимерных образцов представлены на рисунке 4.11.

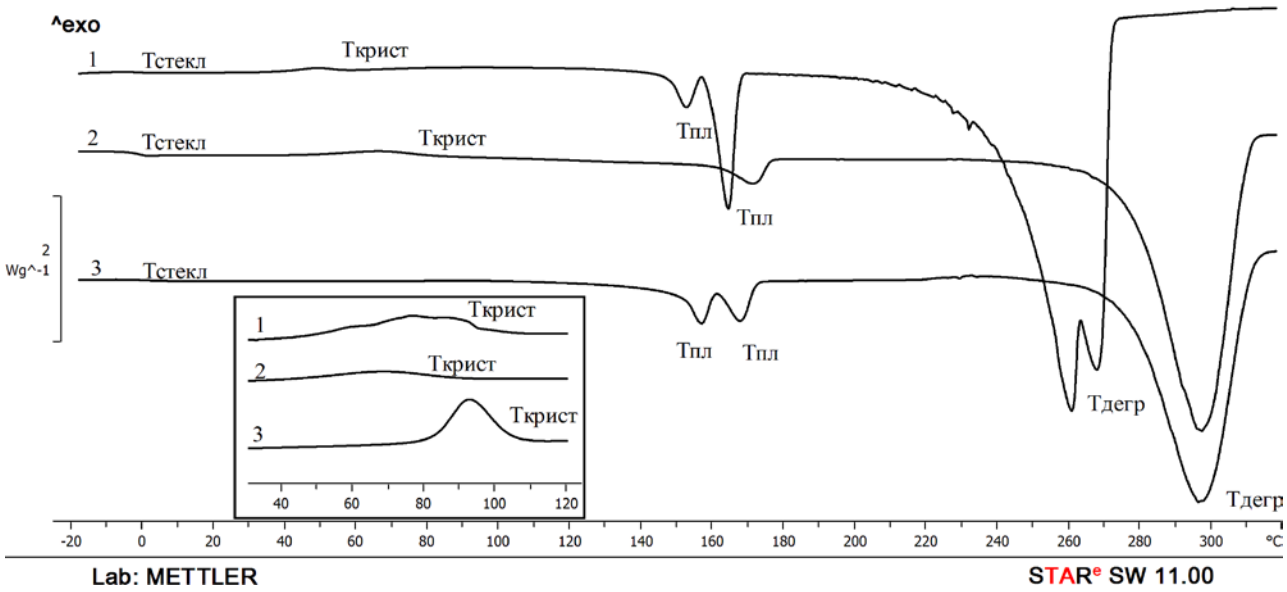


Рисунок 4.11 – Термограммы образцов сополимеров: 1 – одна добавка $С_4Н_9СООК$ включение 3ГВ 28 %; 2 – одна добавка $С_2Н_5СООК$ включение 3ГВ 23 %; 3 – одна добавка ε-капралактона включение 4ГБ 5 %.

У всех образцов наблюдалось снижение $T_{пл}$ и $T_{крист}$ по отношению к гомополимеру (табл. 4.2). Практически у всех образцов наблюдается наличие двойных пиков (рис. 4.11) в области плавления, что связанно с расслоением образца при переходе из твёрдого состояния в расплав. Расслоение происходит между гомополимером и сополимером. Молекулы содержащие боковой заместитель начинают плавиться раньше в результате происходит изменение термодинамических условий, что вызывает снижение $T_{пл}$ гомополимера со 174 ^{0}C до 162 -168 ^{0}C.

Так же практически у всех образцов зафиксировано по два пика кристаллизации. Первый пик появляется при охлаждении, а второй при повторном нагреве. То есть часть образца кристаллизуется при охлаждении, в результате чего подвижность молекул снижается и дальнейшая кристаллизация затруднена, но при последующем нагреве с увеличением температуры увеличивается подвижность молекул и происходит докристаллизация образца. Данный эффект характерен для ПГА содержащих заместители и не встречается у гомополимера, так как наличие заместителя создаёт пространственные затруднения и оказывает влияние на подвижность молекулы в целом.

РЕЗЮМЕ:

С применением современных физико-химических методов исследованы свойства образцов ПГА различного химического состава (гомополимера – П(3ГБ) и сополимеров 3-гидроксибутирата с 3-гидрокисвалератом и 4-гидроксибутиратом с различным соотношением мономеров). Независимо от набора и соотношения мономеров в ПГА при синтезе на глицерине, за исключением температурных характеристик, происходят изменения физико-химических свойств полимеров, включающие снижение значений средневесовой молекулярной массы ($M_в$ до 304-416 кДа), а также степени кристалличности ($C_х$) до 50-55%, что является значимым фактом, так как ПГА с пониженной степенью кристалличности более технологичны и обеспечивают возможность получения изделий более высокого качества. Для образцов пленок, полученных из П(3ГБ) на

глицерине характерно снижение показателей шероховатости и краевых углов смачивания водой, свидетельствующее о гидрофилизации поверхности. Механические характеристики плёнок, полученных из П(3ГБ) на глицерине ниже, чем пленок синтезированных на глюкозе, что связано с увеличением аморфных фаз в структуре полимеров синтезированных на глицерине.

ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА ОПЫТНОГО ПРОИЗВОДСТВА И РЕЗУЛЬТАТЫ МАСШТАБИРОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПГА НА ГЛИЦЕРИНЕ

Реализация разрабатываемых биотехнологий до уровня опытного производства (ОП) является необходимым этапом масштабирования для перехода к промышленному производству. Испытание технологии в условиях ОП позволяет составить материально-энергетический баланс процесса, разработать технологический регламент, уточнить физико-химические параметры ферментации, получить партии продукта, необходимые для проведения испытаний.

5.1. Характеристика опытного производства ПГА

Опытное производство ПГА спроектировано, укомплектовано необходимым оборудованием и введено в строй в Сибирском федеральном университете приказом № 751 от 28.06.2014г. Проект ОП прошел государственную экспертизу (заключение № 24-1-50196-12). По завершению пуско-наладочных работ получено разрешение на ввод опытного производства в эксплуатацию (RU-24308000-01/3719-дг от 17.04.2013).

Опытное производство площадью 347,1 м^2 размещено в отдельно стоящем корпусе 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. Технологическая схема опытного производства представлена на рисунке 5.1.

Общая технологическая схема ОП включает серию стадий технологического процесса: подготовки воды (ВР.1) и воздуха (ВР.2); санитарную обработку помещения и оборудования опытного производства (ВР.3); подготовку и стерилизацию компонентов питательной среды (ВР.4); получение инокулята из музейной культуры в колбах (ТП.1); наращивание инокулята в ферментере инокуляторе (ТП.2); биосинтез полигидроксиалканоатов в пилотном ферментере (ТП.3); концентрирования биомассы бактерий (ТП.4); выделение, очистку и сушку продукта (полимера) (ТП.5), регенерацию растворителей (ВР.5).

Подготовка воды осуществляется в две стадии и включает на первой стадии очистку от механических примесей и избыточного содержания железа; на второй стадии происходит очистка методом обратного осмоса. Для подачи технологического воздуха используется безмасляный компрессор Remeza, подготовка воздуха включает в себя многоступенчатую фильтрацию. Санитарная обработка (ВР.3) заключается в обработке поверхностей оборудования и строительных конструкций дезинфицирующим раствором «Аламинол». Для дезинфекции воздуха рабочей зоны используется озонирование.

На стадии «подготовка и стерилизация сред (ВР.4)» готовятся и стерилизуются питательные среды, посуда и оборудование. Приготовление маточных растворов и стерилизация реализуются в отделении средоподготовки. Для стерилизации посуды, растворов микроэлементов, сред и субстратов для колб используется автоклав SANYO MLS-3781L.

Подготовка ферментёров ОП осуществляется с использованием CIP-мойки в автоматическом режиме; управление процессом - с использованием программы BioScadaLab (ВР.3). Контроль качества помывки осуществляется кондуктометрическим датчиком CIP-мойки, который измеряет сопротивление воды на выходе из ферментёра.

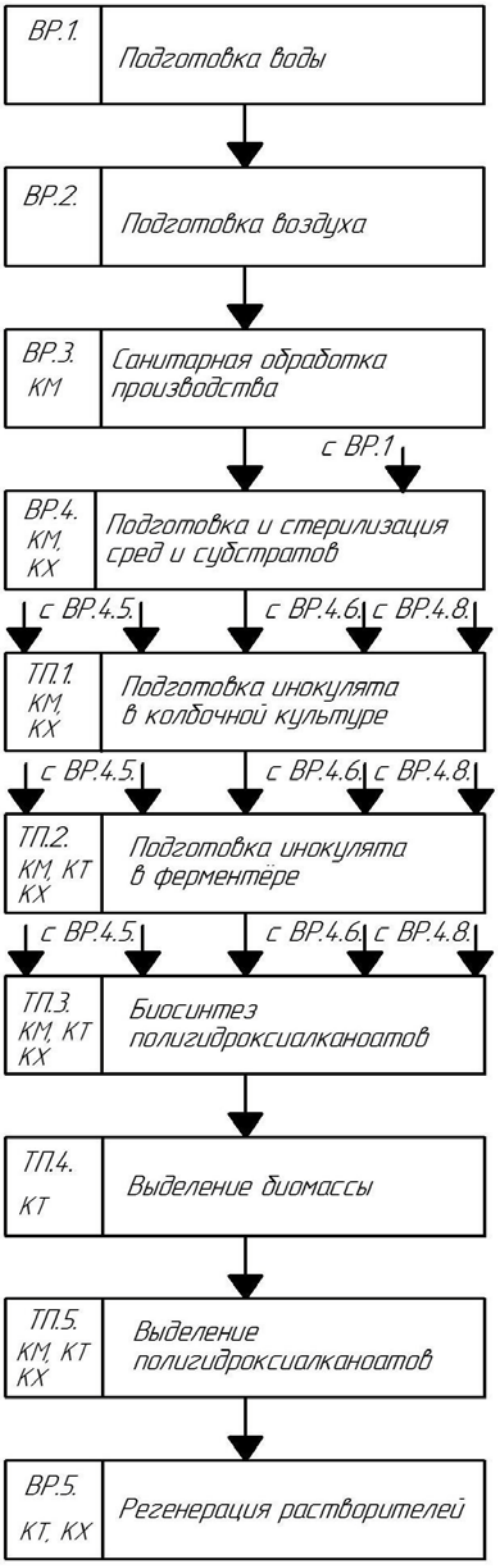


Рисунок 5.1. Технологическая схема опытного производства (ОСТ 64-02-003-2002). Условные обозначения: ВР – стадии вспомогательных работ; ТП – стадии основного технологического процесса; КМ – контроль микробиологический; КТ – контроль технологический; КХ – контроль химический.

Отделение музейной культуры предназначено для хранения и поддержания музейной культуры, а также для первой стадии получения инокулята (ТП.1). Полученный инокулят переносят в простерилизованный посевной 30-литровый ферментер (ТП.2). Наращивание инокулята в ферментёре инокуляторе (4) осуществляется на полной питательной среде с подпиткой культуры глицерином и раствором мочевины. Насыщение кислородом (DO) поддерживается на уровне 27 – 32%.

Фото блока ферментации опытного производства ПГА представлено на рисунке 5.2. Аппаратурная схема блока ферментации опытного производства ПГА представлена на рисунке 5.3.

Рисунок 5.2. Фото блока ферментации опытного производства ПГА

Полученный инокулят из ферментёра инокулятора перекачивается по стерильной посевной линии в 150-л пилотный ферментер Р150 (9), в котором реализуется стадия биосинтеза полигидроксиалканоатов (ТП.2) при стабилизации параметров культивирования бактерий (pH, температура, концентрация компонентов питательной среды, скорость подачи воздуха) в течение 30-60 ч в зависимости от задачи.

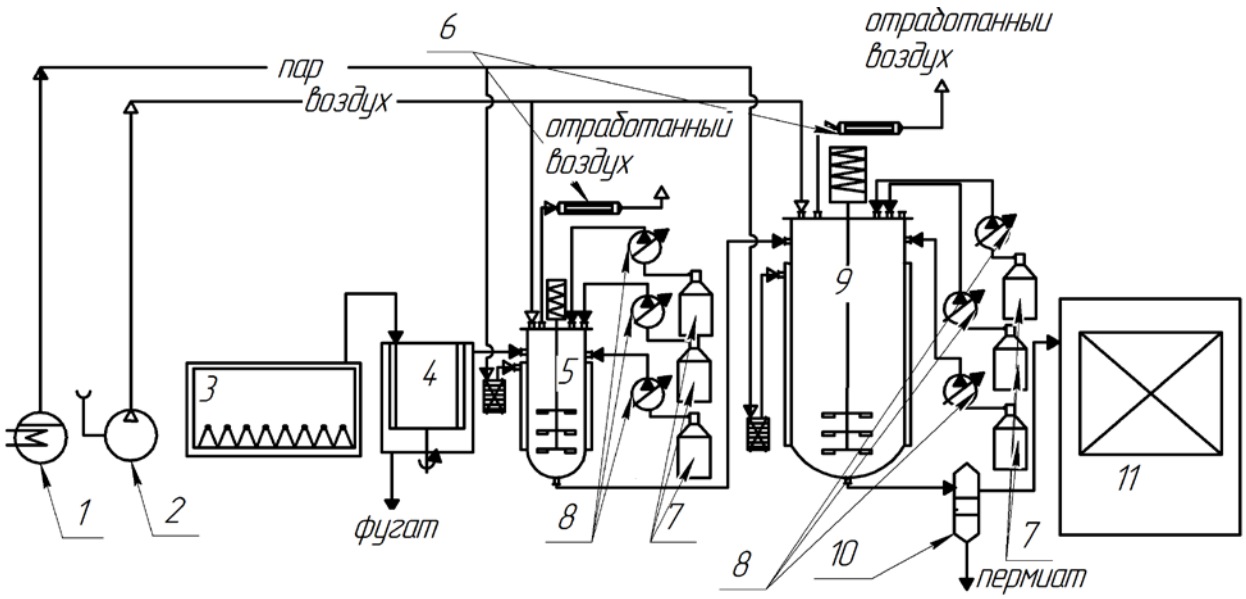


Рисунок 5.3. Аппаратурная схема блока ферментации опытного производства ПГА: 1 – парогенератор Biotron (Корея); 2 – поршневой компрессор Remeza (Беларусь); 3 – шейкер инкубатор Innova 44 (США); 4 – центрифуга AVANTI J-HC; 5 – ферментер инокулятор NLF 30 (“Bioengjneering”-Швейцария); 6 – обратный холодильник; 7 – стеклянные ёмкости для подпиток; 8 – перистальтические насосы (Швейцария); 9 – пилотный ферментёр P150 (“Bioengjneering”-Швейцария); 10 – установка ультрафильтрации АСФ20 (Россия); 11 – лиофильная сушилка LP10R (ISHin Южная Корея)

Полученная на стадии ферментации культура объемом до 80 - 100 л концентрируется на ультрафильтрационной установке АСФ20 (10) в 5 - 6 раз и высушивается в лиофильной сушилке LP10R до остаточной влажности 5 - 7%.

Лиофильно высушенная биомасса бактерий передается в блок экстракции и очистки полимера (рисунок 5.3). Для этого биомассу засыпают в экстрактор (21), который оснащён встроенным сетчатым фильтром. Экстракцию ведут в две стадии: на первой стадии происходит обезжиривание биомассы этиловым спиртом; на второй происходит экстракция полимера дихлорметаном. Полученный экстракт отфильтровывают с использованием друг-фильтра (22) и собирают в осадителе (23), в который вносят двойной объём спирта.

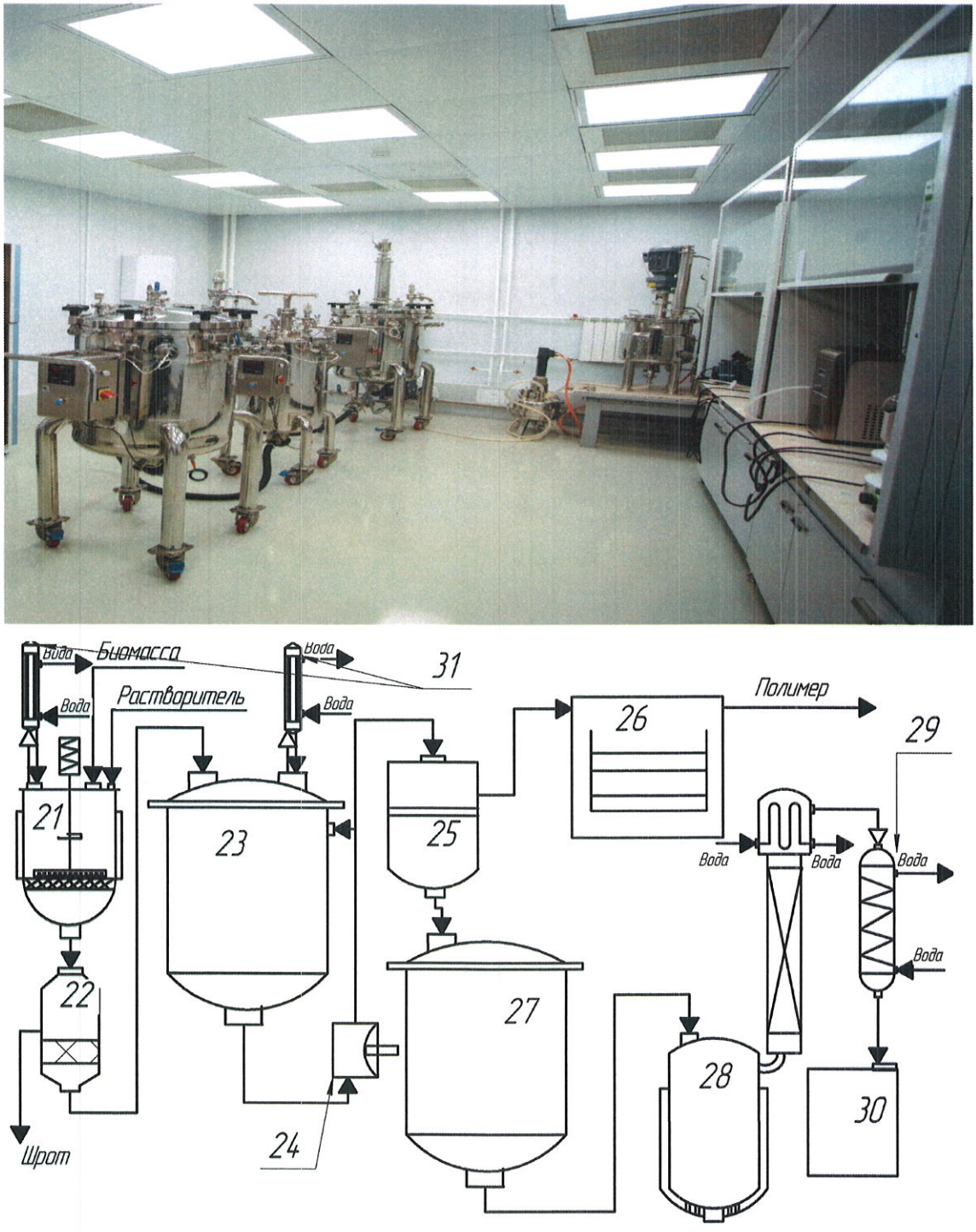


Рисунок 5.3 – Фото и аппаратурная схема блока экстракции и очистки полимера: 21 – экстрактор (Россия); 22 – друг-фильтр (Россия); 23 – осадитель (Россия); 24 – мембранный пневматический насос (Италия); 25 - друг-фильтр (Россия); 26 – сушильный шкаф MEMMERT UF110 (Германия); 27 – ёмкость для сбора отработанных растворителей (Россия); 28 – установка ректификации (Россия); 29 – система конденсаторов; 30 – сборник чистых растворителей; 31 – обратные холодильники.

Для повышения эффективности процесса осаждения, реакционную массу перемешивают с помощью пневматического мембранного насоса (24). Выпавший в осадок полимер отфильтровывают на друг-фильтре (25), в котором в качестве фильтрующего материала используется бельтинг.

Отфильтрованный полимер помещают в сушильный шкаф MEMMERT UF110 (26). Отработанные растворители собирают в сборнике (27) и подают на регенерацию в установку ректификации (29. 30), в которой на первом этапе происходит удаление из смеси дихлорметана, а на второй стадии происходит регенерация этилового спирта. Восстановленные растворители поступают обратно в процесс экстракции.

5.2 Результаты масштабирования технологии биосинетза ПГА бактериями *C.eutrophus* B-10646 в условиях опытного производства на глицерине

Анализ полученных результатов исследования процессов синтеза ПГА на глицерине различной степени очистки показал пригодность для не ингибированного роста и эффективного синтеза полимеров в культуре бактерий *C.eutrophus* B-10646, независимо от марки глицерина и содержания в нем примесей. Для масштабирования технологии выбран вариант процесса, реализуемый на глицерине-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды) (Глава 3, таблица 3.2). Полученные и разработанные Исходные данные (Глава 3, раздел 3.5) использованы для масштабирования технологии производства полимеров в условиях опытного производства.

Технология биосинтеза ПГА в условиях опытного производства включает три биотехнологические стадии: предферментационную (подготовка и стерилизация оборудования, получение инокулята и питательных сред), стадию ферментации (реализация процесса в пилотном ферментере и наращивание биомассы клеток с максимальными выходами полимера) и постферментационную стадию (получение готового продукта и регенерация эктсрагентов).

Основной задачей на стадии получения инокулята является обеспечение физиологической активности клеток для минимизации лаг-фазы в пилотном ферментере. Физиологическая активность клеток в инокуляте в основном зависит от возраста культуры и внутриклеточной концентрации полимера, – чем она выше, тем менее активен инокулят. Связано это с тем, что высокое содержание полимера влияет на физиологическое состояние культуры, - дыхательную активность клеток и удельную скорость роста.

Полученная зависимость удельной скорости роста *C.eutrophus* B-10646 от внутриклеточной концентрации полимера описывается уравнением Иерусалимского (рисунок 5.4). Определено, что константа ингибирования удельной скорости роста бактерий внутриклеточным содержанием полимера П(3ГБ) (продуктом, $К_р$) составляет 20±2 %.

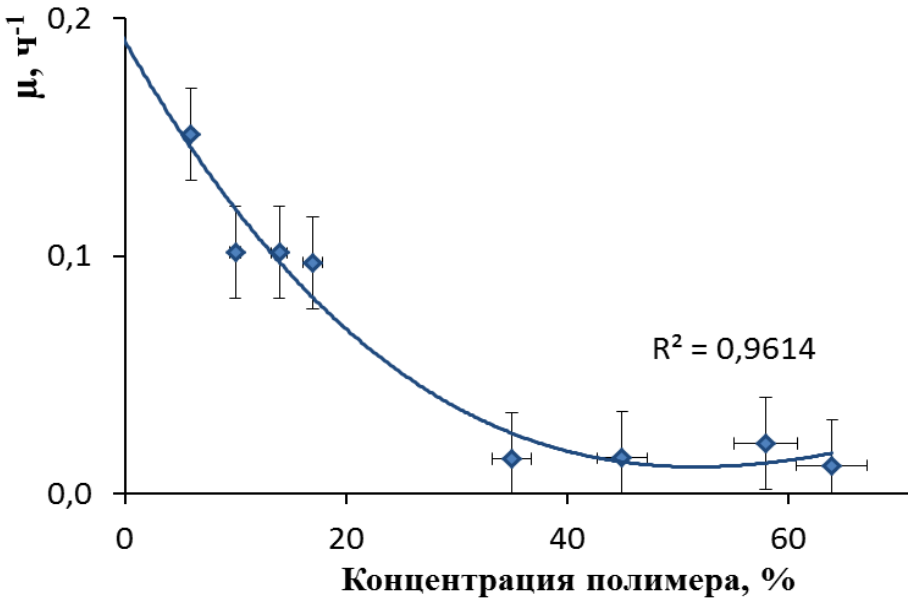


Рисунок 5.4 Влияние содержания полимера в клетках на удельную скорость роста *C.eutrophus* B-10646.

Таким образом, содержание полимера в инокуляте, предназначенном для засева пилотного ферментера, должно составлять менее 20%, порядка 10% (к АСБ). В связи с этим длительность первого этапа получения инокулята из музейной культуры в колбах строго контролируется для получения культуры с минимально возможным содержанием в клетках полимера. Процесс реализуется в

стеклянных колбах объемом 2 л на полной питательной среде в течение 95-97 ч и обеспечивает получение 24 л культуры с концентрацией клеток 3,0±0,2 г/л и содержанием полимера в них порядка 10±5 %.

Полученный инокулят с соблюдением правил стерильности центрифугируют для сокращения объема культуры до 5 л с концентрацией клеток 14±2 г/л. Инокулят засевают в ферментёр-инокулятор, в котором содержится 6 л предварительно простерилизованного фосфатного буфера; стартовая концентрация клеток снижается до 7,5±0,5 г/л. В течение 8±2 ч происходит наращивание инокулята на полной питательной среде при стабилизации pH и температуры на уровне 6,8±0,2 и 31±1 ^{o}C в режиме подпитки культуры субстратом для исключения возникновения лимита по отдельным компонентам среды (мочевина, глицерин, макро- и микроэлементы). Концентрацию мочевины и глицерина в культуре поддерживают на уровне, соответственно, 0,7±0,3 и 15±5 г/л внесением соответствующих подпитывающих растворов. Подача стерильного воздуха в ферментер по мере увеличения концентрации клеток в культуре увеличивалась от 0 до 5,4 нл/мин, концентрация кислорода в культуре поддерживалась автоматически в режиме DO-стат на уровне 2,4±0,3 мгO_2/л. Объем полученного инокулята достигает 14±1 л, концентрация клеток порядка 25,0±1,5 г/л.

Полученный инокулят по стерильной посевной линии перекачивается в пилотный ферментёр P150, в котором находится 50 л предварительно простерилизованного фосфатного буфера. Стартовая концентрация клеток в культуре составляет порядка 7,0±1,5 г/л.

Процесс синтеза полимера реализовали в две стадии. На первой стадии выращивали бактерии в режиме лимитирования роста бактерий концентрацией азота – основной фактор, стимулирующий внутриклеточную аккумуляцию П(3ГБ) (50% от физиологической потребности клеток), регулируя входной поток в ферментер раствора мочевины насосом дозатором при стабилизации остаточной концентрации азота в культуре не выше 0,7 г/л. Все остальные компоненты среды, включая источник углерода (глицерин), макро- и микроэлементы подавали в

ферментер в избытке. Это обеспечивается регулируемой раздельной подачей соответствующих потоков субстратов насосами дозаторами. Показатели параметров технологического процесса (динамика потребления азота и глицерина культурой, расход воздуха, обороты мешалки, активная реакции среды) представлены на рисунке 5.5.

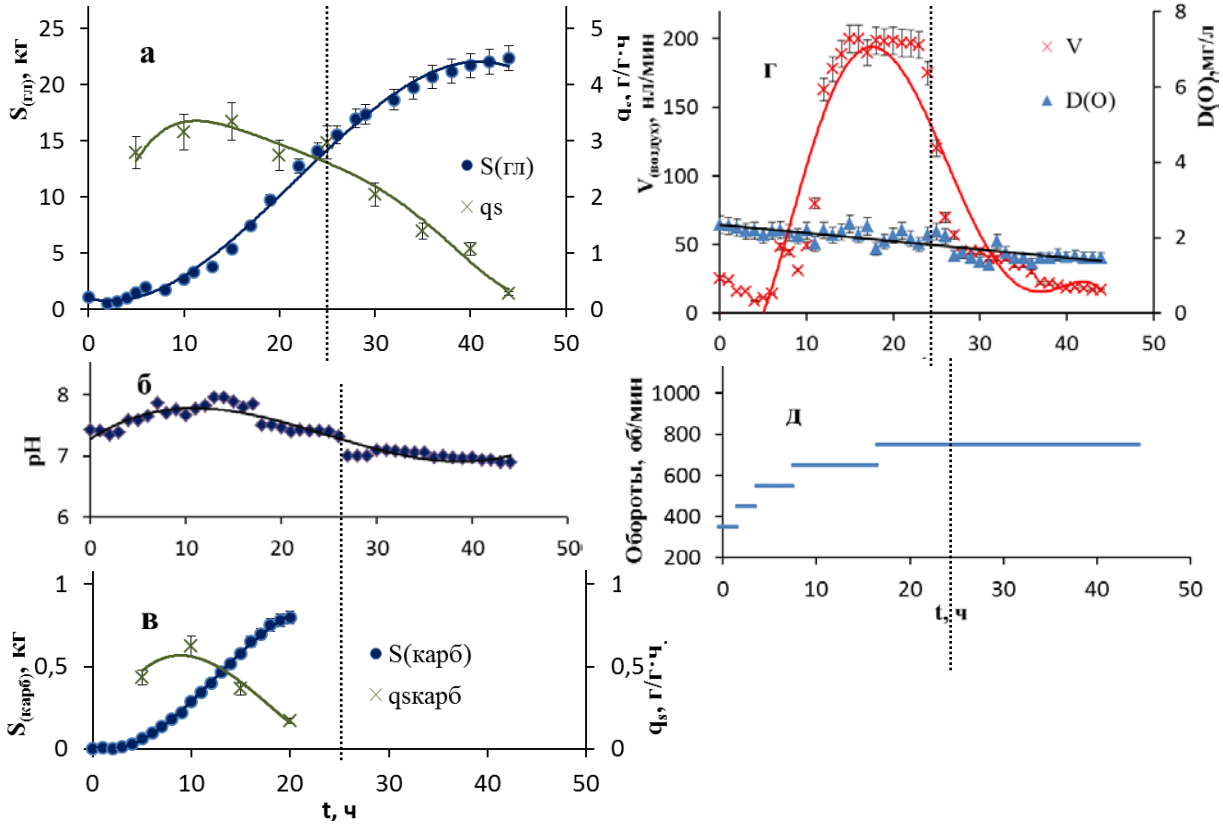


Рисунок 5.5 Технологические параметры процесса синтеза ПГА в культуре *C.eutrophus* B-10646 в пилотном ферментере ОП на глицерине: а – потребление глицерина культурой *C.eutrophus* B-10646 (S) и скорость потребления глицерина (q_s); б - изменение pH в процессе; в - потребление карбамида культурой *C.eutrophus* B-10646 ($S_{карб}$) и скорость потребления карбамида ($q_{карб}$); г - расход воздуха (V) и поддерживаемая концентрация растворённого кислорода (D(O)); д - обороты мешалки.

На первой стадии процесса, в 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 (рисунок 5.5а). К концу первой стадии процесса (23-25 ч) концентрация биомассы составила 78,8±3,9 г/л, внутриклеточное содержание полимера 45,0±2,2 % (рисунок 5.6 а). Скорость потребления мочевины культурой ($q_{карб}$) также возрастает на первом этапе, достигает максимума на 10 – 15 ч (0,61±0,05 г/г·ч) (рисунок 5.5в). На фоне роста потребления азота отмечено некоторое увеличение pH (рис. 5.5б), от 7,2 до 7,9. Это связано с накоплением в культуре ионов NH_4^+. На второй стадии процесса, по мере исчерпания азота pH стабилизируется на уровне 7,0±0,2. Контроль насыщения культуры кислородом осуществляли в каскадном режиме с автоматическим регулированием количества продуваемого воздуха. Концентрацию растворённого кислорода поддерживали на уровне 2,4±0,3 мгO_2/л (D(O) 30 %). Максимальный расход воздуха зафиксирован к концу первой стадии процесса (15-20 ч) и составил 200 нл/ч (рисунок 5.5г).

На первом этапе в результате прироста биомассы необходимо увеличение расхода воздуха для исключения лимитирования роста бактерий по кислороду. Регулируемое ступенчатое изменение оборотов мешалки в условиях каскадного управления концентрацией растворённого кислорода в культуре количеством продуваемого воздуха позволяет компенсировать возрастающую потребность культуры в кислороде. Обороты мешалки на первом этапе постепенно увеличивали от 300 до 750 об/мин (с максимумом к концу первого этапа) и стабилизировали на этом уровне в течение второго этапа (рисунок 5.5д). Верхняя пропеллерная мешалка, установленная на границе раздела фаз жидкость – воздух, выполняет функцию механического пеногасителя, так как по мере увеличения величины X, г/л, имело место незначительно выраженное пенообразование.

Продукционные показатели культуры *C.eutrophus* B-10646 в производственном ферментере иллюстрирует рисунок 5.6. 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$ч^{-1}$. Удельная скорость синтеза П(3ГБ) при этом составила 0,20 ±0,02 $ч^{-1}$ (рисунок 5.6 а,б). Достигнутые на глицерине показатели удельной

скорости роста в условиях ОП превышают ранее полученные на глюкозе, которые составили для каталитически активной биомассы 0,13 $ч^{-1}$ при скорости синтеза полимера 0,14 $ч^{-1}$ [Volova et al., 2014]. На второй стадии, начиная с 23 ч, подачу азота в культуру прекращали. На этом этапе прирост общей биомассы происходил в основном в результате накопления в клетках полимера, так как собственно рост клеток имел тенденцию к снижению, а значения удельной скорости роста (по каталитически активной биомассе) приобретали отрицательные значения (рисунок 5.6 б).

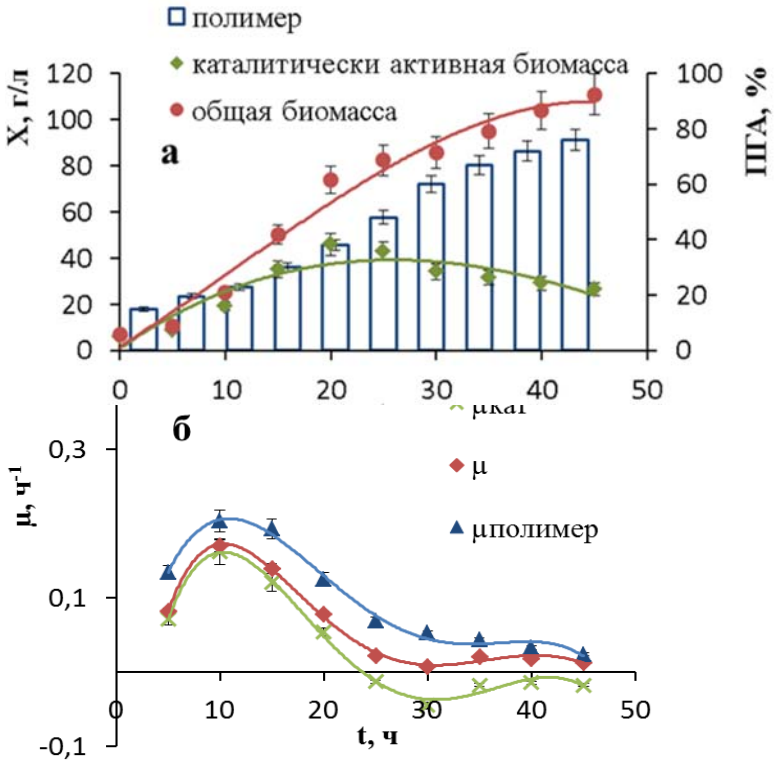


Рисунок 5.6 Показатели процесса синтеза ПГА в культуре *C.eutrophus* B-10646 в пилотном ферментере на глицерине: а - концентрация биомассы клеток в культуре (общей и каталитически активной, г/л) и полимера в клетках (% к АСБ) на глицерине; б - динамика удельной скорости роста общей (μ, $ч^{-1}$) и каталитически активной ($\mu_{кат}$, $ч^{-1}$) биомассы клеток, удельной скорости синтеза полимера ($\mu_{полимер}$, $ч^{-1}$) на глицерине.

На втором этапе, на фоне возрастания общей биомассы клеток и снижения каталитически активной биомассы за счет увеличения внутриклеточной

концентрации полимера, физиологическая активность культуры постепенно снижалась. 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 5.6 б). На этом фоне происходило снижение потребления основных субстратов. Если скорость потребления глицерина в начале второй стадии составляла 3,1±0,2 г/г·ч, то далее она снизилась до 0,3±0,1 г/г·ч (рисунок 5.5а). Для этой стадии также характерно снижение дыхательной активности культуры, что сказывается на расходе подаваемого в ферментер воздуха, который снижается к концу процесса до 40 нл/мин (рисунок 5.5г).

При 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%. Общий расход глицерина за процесс составил 21,8 кг. Это обеспечило получение экономических коэффициентов по глицерину для биомассы и полимера, соответственно, 0,43±0,02 и 0,32±0,02 г/г глицерина. Полученные значения продуктивности процесса, достигнутые за 45 ч в производственном ферментере, составили по общей (валовой) биомассе 2,29±0,1 г/л·ч; по полимеру 1,83±0,06 г/л·ч.

5.3. Микробиологический статус опытного производства и получаемого продукта (ПГА)

Микробиологический мониторинг и комплекс обязательных мероприятий необходимы для надлежащего микробиологического статуса производства и отсутствия контаминации на всех стадиях технологического процесса. Инфицирование производственной культуры посторонней микрофлорой вызывает снижение качества получаемого продукта и производительности процесса вплоть до полного вытеснения штамма-продуцента посторонней микрофлорой. Первичными источниками контаминации биотехнологических процессов

являются потоки, входящие в ферментационные аппараты на стадии культивирования (инокулят, воздух, питательные среды); вторичными могут стать дискретные потоки воздуха производственных помещений, спецодежда персонала и т.п. Исходя из этого разработана следующая схема микробиологического мониторинга и отбора проб в процессе исследования микробиологического статуса ОП (рисунок 5.7).

В целях мониторинга работы фильтров тонкой очистки проводили микробиологический контроль технологического воздуха, поступающего в ферментеры (Таблица 5.1)

Таблица 5.1. - Уровень контаминации воздушной среды помещений производственной зоны опытного производства

№ п/п	Место взятия проб	Численность бактерий, КОЕ/м^3	Численность грибов, КОЕ/м^3	ПДК, КОЕ/м^3
1	Ферментационный зал	189 ± 63	не обнаружены	200
2	Отделение средоподготовки	142 ± 88	не обнаружены	
3	Блок дежурных операторов	142 ± 95	не обнаружены	
4	Отделение музейной культуры	47 ± 26	не обнаружены	
5	Блок обработки биомассы	95 ± 63	не обнаружены	

Анализ полученных данных показал, что полученные значения не превышали ПДК, предусмотренных для производственных помещений микробиологических производств [ГН 2.2.6.1080-01]. Среди микроорганизмов, присутствующих в воздушной среде, выделены бактерии, принадлежащие к 6 родам: *Micrococcus, Streptococcus, Bacillus, Mycobacterium, Pseudomonas, Arthrobacter* с преобладанием бактерии родов *Bacillus* и *Micrococcus* в количественном соотношении 36 и 28%, соответственно, от общего числа бактерий.

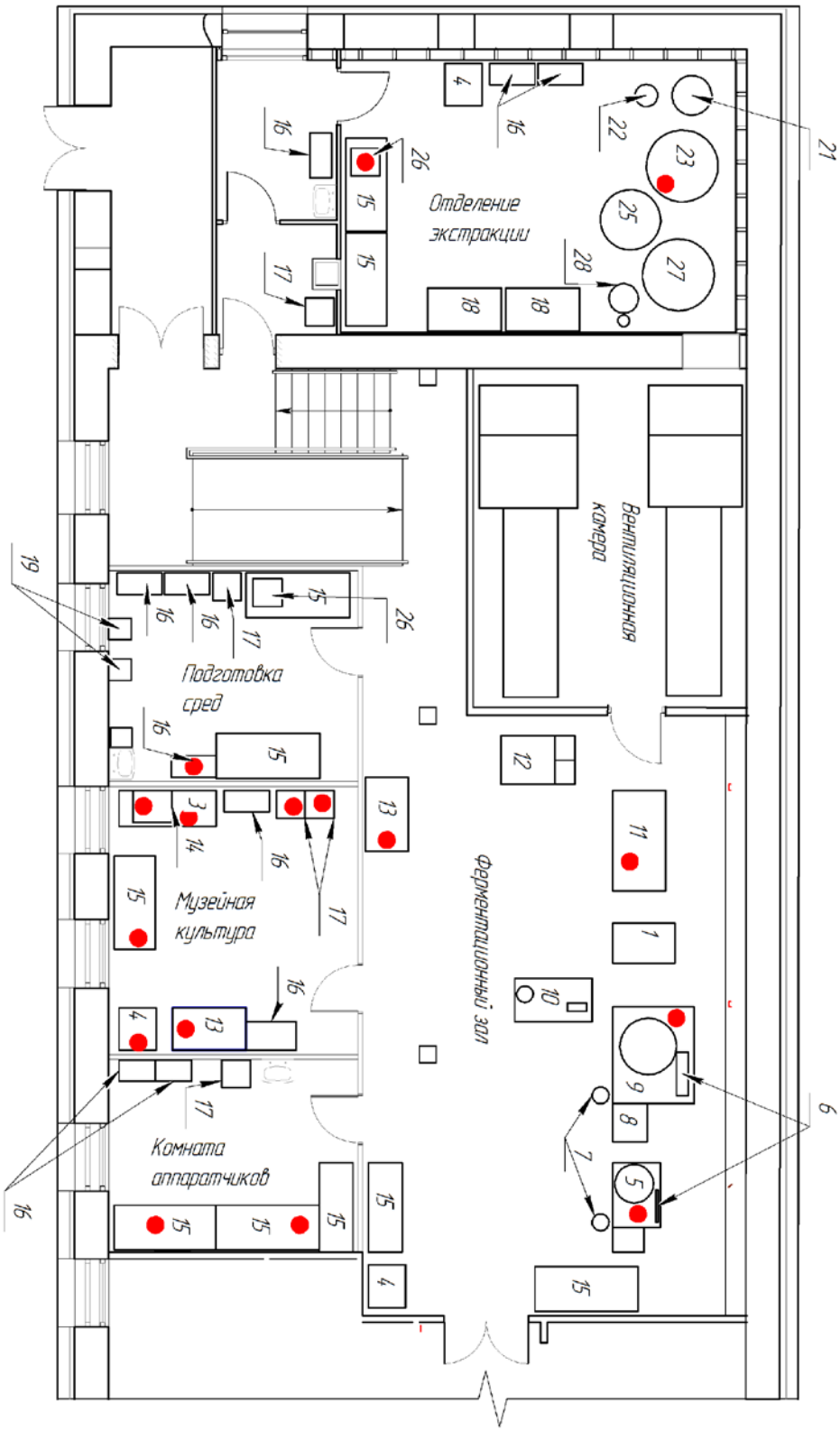


Рисунок 5.7. Схема отбора проб в ходе микробиологического мониторинга опытного производства ПГА

Остальные представители воздушной среды были в равном соотношении и составляли 9% от общего числа микроорганизмов. Микогенной контаминации воздушной среды помещений производственной зоны не обнаружено. Показатели соответствуют значениям предельно допустимых концентраций [GMP, ГОСТ Р 52249-2009].

Результаты микробиологического контроля производственного помещения и аппаратуры представлены в Таблице 5.2.

Таблица 5.2. - Микробиологический анализ производственных помещений после деконтаминирующих мероприятий

№ п/п	Место взятия проб	Численность бактерий, КОЕ/см^2	Численность грибов, КОЕ/см^2
1	Ферментационный зал	0,068 ± 0,011	не обнаружены
2	Отделение средоподготовки и автоклавирования	0,064 ± 0,016	не обнаружены
3	Блок дежурных операторов	0,055 ± 0,028	не обнаружены
4	Отделение музейной культуры	0,015 ± 0,008	не обнаружены
5	Блок обработки биомассы	0,040 ± 0,024	не обнаружены

Результаты микробиологического анализа обнаруженной численности микроорганизмов показали, что она ниже предела допустимой микробной обсеменённости [МУ-45-116]. Это представители *Micrococcus, Bacillus, Propionibacterium, Corynebacterium, Sarcina, Acinetobacter* и 1 филум *Actinobacteria,* при этом преобладали бактерии родов *Bacillus* и *Micrococcus* в количественном соотношении 27 и 19%, соответственно, от общего числа бактерий; бактерии рода *Sarcina* - 15%, бактерии рода *Acinetobacter* - 12%, бактерии рода *Propionibacterium* и *Corynebacterium* были в равном соотношении и составляли 10% от общего числа микроорганизмов, филум *Actinobacteria* составлял 7%. Микромицетов в смывах исследуемых поверхностей не обнаружено.

С целью выяснения возможных источников заражения культуры анализировали питательные среды [МУК 4.2.734-99], которые использовали для приготовления инокулята, а также воду - конденсат после стерилизации ферментеров и воздух, поступающий в ферментационную линию во время технологического процесса. Во всех маточных растворах микро и маркоэлементов живых микроорганизмов не обнаружено. Результаты микробиологического анализа блоков ферментационной линии, включая внутренние полости ферментеров, коммуникационные линии, а также воздуха, поступающего в технологический процесс, показали отсутствие живых микроорганизмов.

Результаты микробиологического анализа чистоты культуры в процессе ферментации представлены в Таблице 5.3.

Таблица 5.3. - Микробиологический анализ культуры продуцента *Cupriavidus eutrophus* B-10646 в процессе ферментации

№ п/п	Место отбора проб	Период отбора проб	Наличие (посторонней микрофлоры)
1	Инокулят из колб	За 2-3 суток до засева в ферментер-инокулятор	Не обнаружены
2	Ферментер-инокулятор (V=30 л)	В течение 1 ч после засева в ферментер-инокулятор (V=30 л)	Не обнаружены
3	Производственный ферментер (V=150 л)	В течение 1 ч после засева в промышленный ферментер (V=150 л)	Не обнаружены
4	Производственный ферментер (V=150 л)	В конце культивирования на завершающей стадии микробиологического синтеза (40-60 ч)	Не обнаружены

Микробиологические исследования культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646, включая инокулят и производственную культуру, посторонней микрофлоры не выявили. Макрофотография однородности колоний и результаты

микроскопирования культуры свидетельствуют об отсуттствии контаминации (рисунок 5.8).

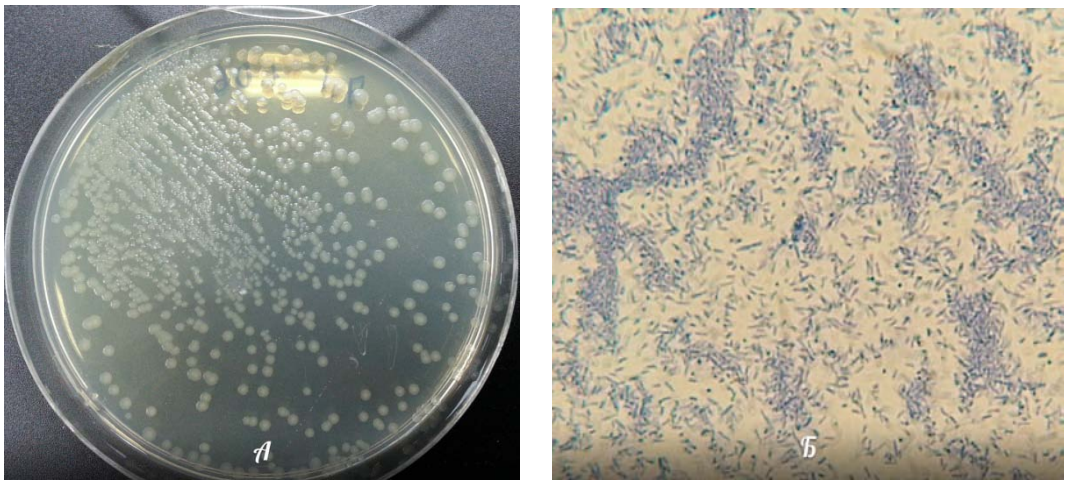


Рисунок 5.8 Микробиологическое исследование чистоты культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646 (А – макрофотография, Б - микроскопирование)

На постферментационной стадии проанализированы высушенная биомасса бактерий и полученный полимер (таблица 5.4). Выявленные микроорганизмы являются типичной аэробной флорой, обнаруженной ранее в воздухе блока обработки биомассы. При исследовании лиофильно-высушенной биомассы *Cupriavidus eutrophus* B-10646 обнаружена микрофлора бактерий рода *Bacillus* и рода *Micrococcus* в количестве 3,7%, что связано с контактом биомассы с воздушной средой помещений производственной зоны. Плесневых грибов, представителей группы кишечной палочки и сальмонел не обнаружено.

При микробиологических исследованиях партий готового продукта (высушенного полимера) микроорганизмов – контаминантов не выявлено. Отсутствие контаминации можно объяснить обработкой полимера экстрагентами, которые используют для получения высокоочищенного продукта и упаковкой его в стерильные пластиковые емкости для хранения. Конечный продукт, изготавливаемый для медицинского использования, подвергается стерилизации.

Таблица 5.4. - Микрофлора лиофильно высушенной биомассы *Cupriavidus eutrophus* B-10646

Физиологическая группа микроорганизмов	Идентифициро-ванные представители	Наличие к общему количеству жизнеспособных микроорганизмов, %
Наличие живых клеток штамма продуцента	C.eutrophus B-10646	Не выявлены
Общее количество аэробных микроорганизмов, в т.ч.:		3,7
Мезофильные аэробы	p.Bacillus	2,1
Облигатные аэробы	p.Micrococcus	1,6
Представители группы кишечной палочки	-	Не выявлены
Сальмонелы		Не выявлены
Плесневые грибы		Не выявлены

Таким образом, принятый комплекс мер и санитарно-гигиенических мероприятий обеспечили микробиологический статус опытного производства ПГА в соответствии с действующими требованиями международных и российских нормативных документов.

5.4. Материальные затраты на синтез ПГА и характеристика конечного продукта (полимера)

Анализ материальных затрат на синтез ПГА, полученных при масштабировании технологии, позволяет оптимизировать расходы на производство целевого продукта, снизить потери, а так же прогнозировать технико-экономические показатели массового производства. Материальные затраты на процесс получения ПГА в условиях опытного производства даны в таблице 5.5.

Таблица 5.5. – Удельные затраты реагентов на синтез 1 кг ПГА (гомополимер-3-гидроксимасляной кислоты, П(3ГБ)

Показатель	Значение параметра
Расход углеродного субстрата (глицерин), кг/кг	3,0±0,2
Расход солей, кг/кг:	
мочевина	0,11
фосфаты калия и натрия водные (безводные)	0,165 (0,55)
магний сернокислый	0,01
железо лимоннокислое	0,003
микроэлементы	0,001
Вода для приготовления сред, кг/кг	50

Результаты исследования конечного продукта опытного производства представлены в таблице 5.6.

Таблица 5.6. - Характеристика продукта – П(3ГБ)

Перечень показателей	Характеристика
1. Фазовое состояние	Сухое вещество
2. Внешний вид	Хлопья белого цвета
3. Внешний вид раствора полимера в хлороформе	Бесцветный
4. Содержание остаточных мономеров 3ГБ, %	отсутствие
5. Содержание влаги, %	0,7
6. Плотность, кг/м^3	от 1150 до 1200
7. Температура плавления, °С	от 150 до 180
8. Температура термической деградации, °С	от 250 до 300
9. Степень кристалличности, %	от 50 до 55
10. Средневесовая молекулярная масса, кДа	от 306 до 416
11. Полидисперсность	от 3,42 до 3,63

12. Устойчивость к физико-химическим факторам многократным методам стерилизации (автоклавирование 1.0-1.5 атм, 100-110 °С, гамма-	наличие
13. Инертность к агрессивным и жидким средам пирты, кислоты, щелочи, гексан	наличие
14. Гидролиз и набухание в водных средах	отсутствие
15. Общее количество аэробных бактерий, %	3,7
16. Представители кишечной группы, %	отсутствие
17. Плесневые грибы, %	отсутствие

5.5 Предварительная экономическая оценка процесса синтеза ПГА с использованием в качестве основного С-субстрата глицерина

Не смотря на значительный прогресс в оптимизации технологий биосинтеза ПГА, эти перспективные полимеры всё ещё имеют высокую стоимость, что в значительной степени сдерживает их использование. По данным компаний Metabolix и P&G минимальная производительность производства, которая обеспечит рентабельность и приемлемую стоимость готового полимера составляет 30 000 тонн полимера в год, а наиболее эффективная производительность составляет 50 000 тонн в год [O. E. Wolf et al., 2005].

На основе полученных экспериментальных данных в условиях опытного производства определена структура затрат на получение ПГА (рисунок 5.9 а, б, таблица 5.7).

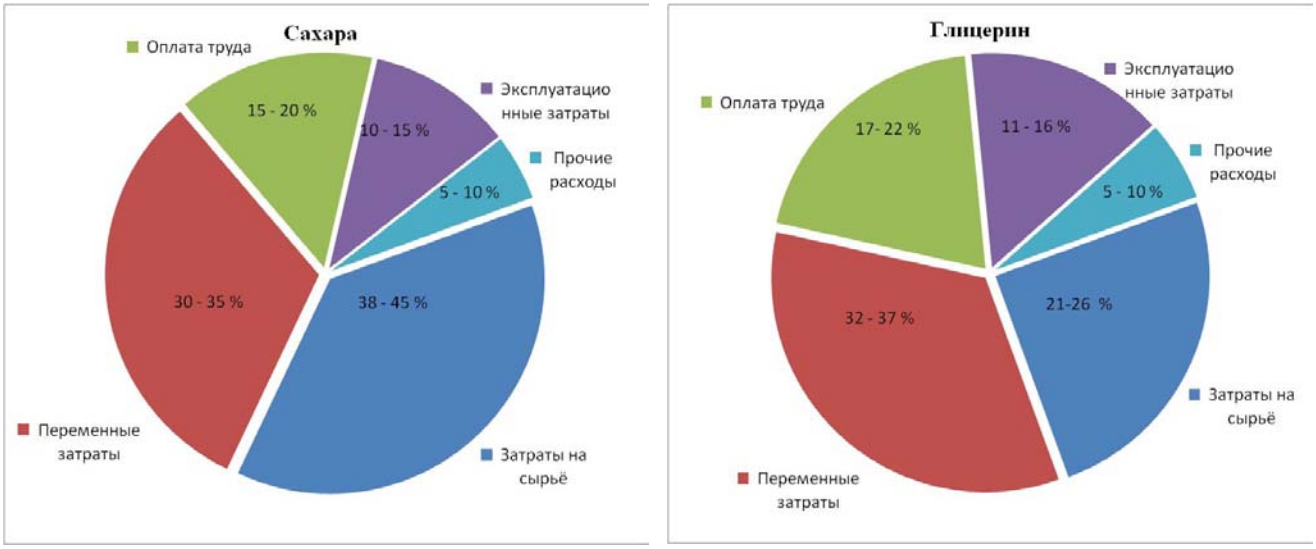


Рисунок 5.9. Структура затрат при производстве ПГА: а - структура затрат на сырьё и материалы с использованием глюкозы; б - структура затрат на сырьё и материалы с использованием глицерина

Таблица 5.7 - 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

Выполненная предварительная экономическая оценка показала, что наибольшие затраты приходятся на основные средства, материалы и углеродный субстрат. 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 будет определяться стоимостью субстратов используемых для их производства. Основные затраты приходятся на стадию ферментации, в том числе - затраты на компоненты питательной среды и реагенты, используемые для выделения полимера из биомассы. Высокие цены на реагенты, используемые для экстракции полимера, нивелируются разработанной и реализованной технологией их возврата в процесс и многократным использованием. Затраты на С-сырьё при использовании глюкозы в структуре себестоимости биосинтеза ПГА составляют до 45%, на растворители для выделения и очистки ПГА до 47%. Показано, что при замене глюкозы глицерином затраты на сырье в общей структуре затрат на производство ПГА снижаются на 17 - 19%.

В таблице 5.7 представлено сравнение удельных затрат и стоимость различных углеродных субстратов на производство ПГА. 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.

РЕЗЮМЕ:

В результате проведенных исследований на основе разработанных исходных данных в соответствии со стандартом GMP реализовано опытное производство и выполнено масштабирование технологии синтеза ПГА на

глицерине в качестве основного углеродного субстрата. Разработанная технология синтеза ПГА на глицерине масштабирована в условиях ОП в ферментере объемом 150 литров. Исследованы продукционные и кинетические характеристики культуры, синтезирующей ПГА на глицерине. Определены материальные затраты на синтез ПГА на глицерине и показано, что экономические коэффициенты по общей биомассе и полимеру составляют 0,43±0,02 и 0,32±0,02 г/г глицерина. Достигнуты высокие показатели процесса по урожаю общей биомассы бактерий 110±5,5 г/л и выходу полимера 76,1±5,3 % при продуктивности процесса по биомассе 2,29±0,1 г/л·ч и полимеру 1,83±0,06 г/л·ч превосходят известные зарубежные данные. Принятый комплекс санитарно-гигиенических мероприятий обеспечил микробиологический статус опытного производства ПГА в соответствии с действующими требованиями международных и российских нормативных документов. Выполненная предварительная оценка экономического эффекта от использования глицерина в качестве основного углеродного субстрата показала, что замена сахаров глицерином позволит снизить затраты на углеродный субстрат на 29,4% относительно глюкозы и 55 % относительно фруктозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненная работа посвящена исследованию синтеза ПГА хемолитоорганотрофными водородокисляющими бактериями *Cupriavidus eutrophus* B-10646 при их культивировании на глицерине в лабораторных условиях и в масштабированном опытном варианте. Актуальность разработки и масштабирования технологий биосинтеза разрушаемых ПГА как альтернативы не разрушаемым синтетическим пластикам очевидна, так как масштабы производства последних превысили 350 млн тонн в год, и это создает глобальную экологическую проблему. Вместе с тем, расширение масштабов и областей применения ПГА сдерживаются их все еще высокой стоимостью, поэтому поиск и привлечение доступных, дешёвых субстратов - одно из ключевых направлений биотехнологии этих ценных макромолекул.

Исследуемые в работе представители рода *Cupriavidus (*ранее *Ralstonia)* характеризуются наиболее высокими выходами ПГА при выращивании на различных субстратах. Многолетние исследования коллектива Института биофизики СО РАН и Сибирского федерального университета обеспечили разработку и реализацию процессов синтеза ПГА различного химического состава в автотрофных и гетеротрофных условиях на газовых смесях водорода и CO_2, синтез-газе, сахарах и других органических субстратах [Volova et al., 2008; 2013 a,b; 2014; 2015 a,b; 2016 a,b; 2017]. Принципиальная возможность синтеза поли-3-гидркоисбутирата при выращивании на глицерине была показана в культуре *Alcaligenes eutrophus* Z-1 (позднее переименованной в *Ralstonia eutropha*) [Волова, Калачева, 1990] и *Cupriavidus eutrophus* B-10646 [Zhila et al, 2015].

Глицерин рассматривается в настоящее время в качестве перспективного субстрата для микробиологического синтеза различных целевых продуктов, включая ПГА. Мировые масштабы производства глицерина возрастают в связи с

бурно развивающейся индустрией биодизеля, производство которого за последнее 10 лет возросло на порядок. Согласно оценке аналитиков Oil World по итогам 2017 г., мировое производство биодизеля достигло рекордных 35,8 млн. тонн, 10% от этих объемов составил глицерин как побочный продукт.

Анализ научных публикаций показал перспективность глицерина в биотехнологии и способность представителей различных таксонов утилизировать его как субстрат для синтеза ПГА. Однако продукционные показатели освоенных лабораторных процессов биосинтеза пока дают не очень высокие показатели по выходу общей биомассы клеток и полимера. В представленной работе показано, что из трех исследованных и адаптированных к глицерину штаммов (*Ralstonia eutropha* B-5786, *R.eutropha* B-8562 и *Cupriavidus eutrophus* B-10646) наиболее продуктивным оказался природный штамм *C.eutrophus* B-10646, который был отобран для последующих исследований. Исследование влияния глицерина в широком диапазоне концентраций на удельную скорость роста бактерий позволило найти границы его физиологического действия (0,004 – 0,673 Моль/л) и кинетические константы по глицерину, которые составили для K_s и K_i, соответственно, 0,36±0,02 и 62,0±3,1 г/л; μ_{max} – 0,085 $ч^{-1}$. Было показано, что в периодической культуре на колбах за 60 ч культивирования урожай общей биомассы клеток *C. eutrophus* B-10646 составил до 7,0 г/л, выход полимера 70-75%. Эти значения выше показателей, полученных в аналогичных условиях в культурах многих природных штаммов: *C. necator* IPT 026, *Ps. oleovorans* NRRLB-14682, *Ps. corrugate* 388, *Paracoccus* sp. LL1 [Campos, 2014; Ashby, 2005; Kumar et al., 2017].

Особо ценным для ПГА является возможность синтеза полимеров различного состава, различающихся базовыми свойствами. В представленной работе показано, что при добавлении в среду дополнительно к глицерину пропионата калия или валерата калия и в зависимости от режима дозирования бактерии *C. eutrophus* B-10646 способны синтезировать сополимеры П(3ГБ/3ГВ), в которых содержание мономеров 3-гидрокисвалерата составляло от 21,0 до 35,7 мол.%. Было выявлено, что при использовании в качестве субстрата

предшественника ε-капролактона при выращивании на глицерине бактерии синтезировали сополимер П(3ГБ/4ГБ) с содержанием мономеров 4-гидроксибутирата от 5,0 до 9,7 мол.%.

Особое внимание в работе уделено исследованию процессов биосинтеза ПГА при культивировании на глицерине различной очистки. Содержание основного вещества (глицерина) в очищенном глицерине составляет свыше 98%. В составе неочищенного «сырого» глицерина, в зависимости от используемого исходного растительного сырья и применяемой технологии, содержание собственно глицерина составляет 80-85%, остальное - примеси, включая свободные жирные кислоты (СЖК) и метиловые эфиры СЖК, спирты, а также воду и соли; pH от 4,1 до 6,8. В зарубежных публикациях сообщалось, что применение неочищенного глицерина, как правило, сопровождается ингибированием роста бактерий и синтеза полимера. Сопоставление результатов получения ПГА на сыром и очищенном глицерине, получаемого при производстве биодизеля из растительного сырья, показал предпочтительным для эффективного синтеза полимера использование очищенного глицерина, несмотря на затраты, связанные с его очисткой. При использовании очищенного глицерина затраты углеродного субстрата на синтез полимера могут существенно снизиться, вплоть до 8%, относительно 40-45% на сахарах и других субстратах [Posada et al., 2011;2012 Du et al., 2012; Koller et al., 2013].

В представленной работе процесс биосинтеза полимера исследован в масштабированном варианте в ферментере объемом 30 л. Процесс биосинтеза осуществлялся при выращивании культуры на трех типах глицерина, полученных при производстве биодизеля: двух очищенных - с содержанием основного вещества 99,3 и 99,7%, и на сыром 82,07%. Как показали эксперименты, значения продукционных показателей культуры *C. eutrophus* B-10646 при культивировании на всех типах глицерина, независимо от содержания основного вещества и примесей были близкими: за 60 ч при низкой стартовой концентрации клеток в инокуляте (2,0-2,5 г/л) урожаи общей биомассы бактерий достигли 70 г/л, содержание полимера в клетках 72-75%.

Одним из важных показателей микробиологических процессов является экономический коэффициент, то есть затраты субстрата на образование целевого продукта. Затраты различных субстратов на биосинтез ПГА значительно варьируют, составляя, например для глюкозы 2,8 г/г, водорода 1,0 г/г [Volova, 2004]. Затраты глицерина на синтез гомополимера П(3ГБ) составили 3,0 г/г, экономический коэффициент по этому субстрату $Y_{P(3HB)}$ составил 0,32±0,02 г/г.

Большое внимание в работе уделено исследованию свойств ПГА, синтезированных при культивировании на глицерине. Связано это с тем, что свойства получаемых ПГА могут значительно варьировать в зависимости от их химического состава, что во многом зависит от условий ферментации, прежде всего, свойств углеродного питания. В работе была синтезирована серия образцов ПГА в культуре *C. eutrophus* B-10646 при выращивании на глицерине различной очистки в качестве единственного источника углерода. Как показали исследования, во всех случаях синтезированный полимер представлял собой гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты - П(3ГБ). Полимер, синтезируемый культурой *C. eutrophus* B-10646 на двух типах очищенного глицерина, имел близкие значения $M_ч$ - 104 и 115 кДа, $M_в$ - 355 и 416 кДа, а также полидисперсность (D), соответственно, 3,42 и 3,63. При использовании неочищенного глицерина значения $M_ч$ и $M_в$ были несколько ниже - 87 и 304 кДа, соответственно. При этом все полученные значения, в целом, были ниже, чем получаемые ранее на образцах П(3ГБ), синтезированных *C. eutrophus* B-10646 на других С-субстратах. Это может объясняться с тем, что глицерин действует как агент переноса цепи в полимеризации ПГА, что связано с этерификацией глицерина на концевых группах мономеров и блокирования дальнейшей полимеризации мономеров, происходит блокирование (закупорка) С-цепи. Это сопровождается, как правило, снижением степени полимеризуемости С-цепи и падением молекулярной массы ПГА. Исследование физико-химических свойств образцов ПГА, синтезированных на глицерине различной очистки, выявило важный факт - снижение степени кристалличности П(3ГБ) до 50-55%, то есть выравнивание аморфной и кристаллической фаз. При этом не было выявлено

изменений температурных характеристик, а также драматического снижения молекулярно-массовых характеристик по сравнению с полимерами, синтезированными бактериями на сахарах. Исследование физико-механических свойств полимерных изделий в виде наливных плёнок из П(3ГБ), синтезированного на глицерине, показало, что прочностные характеристики изделий ниже, по сравнению с изделиями полученными из П(3ГБ) синтезированных на глюкозе. Самыми низкими прочностными характеристиками обладают плёнки из полимера, синтезированного при культивировании на «сыром» глицерине.

В результате проведенных исследований получены исходные данные для реализации опытного производства биосинтеза ПГА с использованием культуры *Cupriavidus eutrophus* B-10646 на глицерине. Анализ полученных результатов исследования процессов биосинтеза ПГА на глицерине различной степени очистки показал его пригодность для не ингибированного роста бактерий и эффективного синтеза полимеров в культуре бактерий *C.eutrophus* B-10646, независимо от содержания примесей в данном субстрате. Для масштабирования технологии биосинтеза ПГА выбран вариант процесса, реализуемый на глицерине-II («Duth glycerol refinery», Нидерланды).

Опытное производство ПГА спроектировано, укомплектовано необходимым оборудованием и введено в эксплуатацию, что позволило масштабировать разработанную технологию биосинтеза ПГА на глицерине в качестве основного углеродного субстрата. Принятый комплекс санитарно-гигиенических мероприятий обеспечил микробиологический статус опытного производства ПГА в соответствии с действующими требованиями международных и российских нормативных документов. Определены продукционные и кинетические характеристики культуры, синтезирующей ПГА при её культивировании на глицерине. В рамках ОП достигнуты высокие выходы биомассы бактерий (110±5,5 г/л) и полимера (76,1±5,3 %), при уровнях продуктивности по общей биомассе и полимеру 2,29±0,1 г/л·ч и 1,83±0,06 г/л·ч соответственно, существенно превосходят известные зарубежные данные.

В результате выполненного цикла ферментации в условиях опытного производства определены материальные затраты С-субстрата - глицерина на синтез ПГА и определено, что экономические коэффициенты по общей биомассе и полимеру составляют 0,43±0,02 и 0,32±0,02 г/г глицерина. Предварительная оценка экономического эффекта от использования глицерина в качестве основного углеродного субстрата показала, что замена сахаров глицерином позволит снизить затраты на углеродный субстрат на 29,4% относительно глюкозы и на 55% относительно фруктозы.

Таким образом, результаты проведённых исследований свидетельствуют о перспективности использования глицерина в качестве нового субстрата для эффективного синтеза широко востребованных разрушаемых биополимеров (ПГА) и являются основой для масштабирования разработанной биотехнологии.

ВЫВОДЫ

1. Проведено сравнительное исследование способности природных штаммов водородокисляющих бактерий *Ralstonia eutropha* B-8562, *Ralstonia eutropha* B-5786 и *Cupriavidus eutrophus* B-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* B-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 СОКРАЩЕНИЙ

3ГБ – 3-гидроксибутират

3ГВ – 3-гидроксивалерат

4ГБ – 4-гидроксибутират

ДСК – дифференциально сканирующая калориметрия

$М_В$ – средне весовая молекулярная масса, кДа

$М_ч$ – средне числовая молекулярная масса, кДа

П3ГБ – поли3-гидроксибутират

П(3ГБ/4ГБ) – поли(3-гидроксибутират/4-гидроксибутират)

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПД – полидисперсность

$С_Х$ – степень кристалличности, %

СЭМ – сканирующий электронный микроскоп

$Т_{ДЕГР.}$ – температура деградации, °С

$Т_{ПЛ.}$ – температура плавления, °С

$Т_{СТЕКЛ.}$ – температура стеклования, °С

$Т_{КРИСТ.}$ – температура кристаллизации, °С

Х, г/л – биомасса, г/л

θ – контактные краевые углы смачивания, °

t – температура, °С

КоА – коэнзима А

ЖК – жирные кислоты

ОП – опытное производство

С-субстрат – углеродный субстрат

С-цепь – углеродная цепь

АСБ – абсолютно сухая биомасса

ФАО – продовольственная и сельскохозяйственная организация объединённых наций

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abou-El-Enein, M. Good Manufacturing Practices (GMP) manufacturing of advanced therapy medicinal products: a novel tailored model for optimizing performance and estimating costs / M. Abou-El-Enein // Cytotherapy. 2013 . - p. 362-383.
2. Aeschelmann, F. Bio-based Building Blocks and Polymers in theWorld – Capacities, Production and Applications: Status Quo and Trends Towards 2020 [Электронный ресурс]/F. Aeschelmann. - Режим доступа: http://bio-based.eu/market_study/media/files/15-05-13_Bio-based_Polymers_and_Building_Blocks_in_the_World-nova_Booklet.pdf
3. Albuquerque, M. G. E. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHAproductivity, composition and properties/ M. G. E. Albuquerque, V. Martino, E. Pollet, L. Av´erous, and M. A. M. Reis //Journal of Biotechnology. - 2011.-vol. 151.- №. 1, p. 66–76.
4. Anderson, A.J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A.J. Anderson, E.A. Dawes // Microbiol. Rev. – 1990. – Vol. 54. – p. 450-472.
5. Anterrieu, S. Integration of biopolymer production with process water treatment at a sugar factory/ L. Quadri, B. Geurkink, I. Dinkla, S. Bengtsson, M. Arcos-Hernandez, T. Alexandersson, F. Morgan-Sagastume, A. Karlsson, M. Hjort // New Biotechnol. - 2014. - p. 308–323.
6. Antonio, R. V. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from Ralstonia eutropha: formation of novel copolyesters in recombinant Escherichia coli / R. V. Antonio, A. Steinbüchel, B.H.A. Rehm// FEMS Microbiol. Lett. . -2000. - p.111–117.

7. Ashby, R.D. Synthesis of short-medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol/ R.D. Ashby, D.K.Y. Solaiman, T.A. Foglia, // Biomacromolecules. - 2005.- p. 2106–2112.
8. Ashby, R.D. Efficient utilization of crude glycerol as fermentation substrate in the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) biopolymers/ R.D. Ashby, D.K.Y. Solaiman, G.D. Strahan // J. Am. Oil Chem. Soc .. - 2011. – p. 949–959.
9. Audic, J.L., Chaufer B., Daufin G. Non-food applications of milk components and dairy co-products: a review / J.L. Audic, B. Chaufer, G. Daufin . - Lait. - 2003. - p. 417–438.
10. Beccari, L. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process/ L. Beccari, D. Bertin, Dionisi et al. //Journal of Chemical Technology and Biotechnology. -2009.- vol. 84, no. 6, -p. 901–908.
11. Bengtsson, S. A process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from municipal wastewater treatment with biological carbon and nitrogen removal demonstrated at pilot-scale/S. Bengtsson, A. Karlsson, T. Alexandersson, L. Quadri, M. Hjort, P. Johansson, F.Morgan-Sagastume, S. Anterrieu, M. Arcos-Hernandez, L. Karabegovic, et al. // New Biotechnol. - 2017. - p. 42–53.
12. Bengtsson, S. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater/ S. Bengtsson, A. Werker, M. Christensson, T. Welander // Bioresource Technology. - 2008.-vol. 99.- №. 3.- p. 509–516.
13. Boynton, G. M. Neuronal basis of contrast discrimination/ G. M. Boynton, J. B. Demb, G. H. Glover, D. J Heeger // Vision Res. - 1999.- p. 257–269.
14. Byron, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics/ D. Byron // Trends Biotechnol.-1987.-V. 5.-p. 246-250.
15. Byron, D. Biomaterials: novel materials from biological sources/ D. Byron// Stockton, New York. - 1989.- p. 333-359.

16. 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. – p. 791–808.
17. Campos, M.I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by Cupriavidus necator using a response surface methodology and its characterizations/ M.I. Campos, T.V.B. Figueiredo, L.S. Sousa, J.I. Druzian, // Ind. Crops Prod. - 2014.- p. 338–346.
18. Chakravarty, P. Study on poly-hydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system/P. Chakravarty, V. Mhaisalkar, T. Chakrabarti // Bioresour. Technol. - 2010.- p. 2896–2899.
19. Chanprateep, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates./ S Chanprateep // J. Biosci. Bioeng. - 2010.-, p. 621–632.
20. Chen, G.Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- andmaterials industry / G.Q. Chen //Chem. Soc. Rev. - 2009.- p. 2434–2446.
21. Chen, G.Q. Plastics completely synthesized by bacteria:polyhydroxyalkanoates/G.Q. Chen // Plastics from Bacteria. Springer, Berlin, Heidelberg. - 2010.- p. 17–37.
22. Chee, J-Y Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (pha): converting renewable resources into bioplastics/ J-Y Chee, S-S Yoga, N Lau, S Ling, RMM Abed, K. Sudesh // Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Micro Biotechnol. - 2010.- p.395–404.
23. Chen, Y-J Critical residues of class II PHA synthase for expanding the substrate specificity and enhancing the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate / Y-J Chen, P-C Tsai, C-H Hsu, C-Y Lee // Enzyme and Microbial Technology.- March 2014.- Vol. 56, p. 60-66.
24. Chen, G.-Q. New challenges and opportunities for industrial biotechnology / G.-Q. Chen // Microb. Cell Fact. - 2012, - p. 111.
25. Clesceri, L.S. Standard methods for the examination of water and wastewater / L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, R.R. Trussell, editors. – 17th ed. – Washington: Amer. Publ. Health Assoc. - 1989. – 541 p.

26. Chen, S.N. The hippo pathway is activated and is a causal mechanism for adipogenesis in arrhythmogenic cardiomyopathy / S.N. Chen, P. Gurha, R. Lombardi, A. Ruggiero, J.T. Willerson, A.J. Marian //Circ Res.- 2014– p. 454–468.
27. Chen, G.G.-Q. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications/ G.G.-Q. Chen, A. Steinbuchel. - New York: Heidelberg Dordrecht. Spriger, 2010. – p.453 .
28. G.-Q. Chen, X.-R.Jiang, Y. Guo. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA) //Synthetic and Systems Biotechnology.- 2016-V.1 p. 236-242
29. Choi, J. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoateproduction by bacterial fermentation / J. Choi, S.Y. Lee // Appl. Microbiol. Biotechnol. -1999.- p. 13–21.
30. Ciesielski, S. Cultivation-dependent and -independentcharacterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoatesfrom raw glycerol / S.Ciesielski, T. Pokój, E.Klimiuk, // J. Microb. Biot. - 2010.-p. 853–861.
31. Collins, A.E.M., Evaluation of a controlled release compact containing tetracycline hydrochloride bonded to tooth for the treatment of periodontal disease/ A.E.M. Collins, P.H. Deasy, D. Mac Carthay, D.H. Shanley // Int J.Pharm. - 1989, p.103–114.
32. Da Silva, G.P., Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology/ G.P. Da Silva, M. Mack, J Contiero // Biotechnol. Adv. - 2009. – p. 30–39.
33. Dionisi, D. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers/ D. Dionisi, G. Carucci, M. Petrangeli Papini, C. Riccardi, M. Majone, F. Carrasco // Water Res. - 2005. – p.2076–2084
34. Doi, Y. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) / Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe // Macromol. – 1995. – Vol. 28. – P. 4822-4828.

35. Du, C. Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials/ C. Du, J. Sabirova, W. Soetaert, S.K.C. Lin, // Curr. Chem. Biol. - 2012. – p. 14–25.

36. Sabbagha Farzaneh Production of poly-hydroxyalkanoate as secondary metabolite with main focus on sustainable energy/ Farzaneh Sabbagha, Ida Idayu Muhamada. //Renewable and Sustainable Energy Reviews .- 2017. – p. 95–104.
37. Fernández-Dacosta, C. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. / C. Fernández-Dacosta, J.A. Posada, R. Kleerebezem, M.C. Cuellar, A Ramirez //Bioresour. Technol. - 2015. – p.368–377.
38. Fu, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat // Biotechnology. - 2014. – p.279.
39. García, A. Highproduction of poly--hydroxybutyrate (PHB) by an Azotobacter vinelandiimutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process/A. García, D.Segura, G.Espín, E. Galindo, T. Castillo, C. Pena, //Biochem. Eng. J.- p. 117–123.
40. Gumel, AM Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by Pseudomonas putida Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent// AM Gumel, MSM Annuar, T. Heidelberg // PLoS One. - 2012. – p. 210-214.
41. Guzman, D. Halomonas andesensis sp. nov., a moderate halophile isolated from the saline lake Laguna Colorada in Bolivia/ D Guzman, J Quillaguaman, M Munoz, R Hatti-Kaul // Int J Syst Evol Microbiol . - 2010. – p. 49–53.
42. Hippe, H. Hydrolyse von PHBS durch intrazellul¨are depolymerase von Hydrogenomonas H16 / H. Hippe, H.G Schlegel // Arch. Mikrobiol. - 1967. – p. 278–299.
43. Huschner, F. Development of a feeding strategy for high cell and PHAdensity fed-batch fermentation of Ralstonia eutropha H16 from organic acidsand their salts /F.Huschner, E. Grousseau, C.J. Brigham, J. Plassmeier, M. Popovic, C. Rha, A.J. Sinskey // Process Biochem. - 2015. – p. 165–172.

44. Jiang, X.-R. Morphology engineering of bacteria for bio-production / X.-R. Jiang, G.-Q. Chen, //Biotechnol. Adv. - 2016. – p. 435–440.
45. Jia, Q. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by bacterial consortium from excess sludge fermentation liquid at laboratory and pilot scales / Q. Jia, H. Xiong, H. Wang, H. Shi, X. Sheng, R. Sun, G. Chen // Bioresour. Technol. -2014. - p. 159–167.
46. Johnson, K. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity/ K. Johnson, Y. Jiang, R. Kleerebezem, G. Muyzer, M.C.M. Van Loosdrecht // Biomacromolecules. - 2009. - p. 670–676.
47. Justyna Mozejko-Ciesielska Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? /Justyna Mozejko-Ciesielska, Robert Kiewisz. //Microbiological Research. - 2016. – p. 271–282.
48. Kamilah, H. Waste cooking oil as substratefor biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) andpoly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): turning waste into avalue-added product / H. Kamilah, T. Tsuge, T.A. Yang, K. Sudesh, // Malaysian J. Microbiol. - 2012. – p. 51–59.
49. Kessler, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism / B. Kessler, B. Witholt, // Biotechnol. - 2001. – V. 86. – P. 97–104.
50. Khanna, S. Microbiol conversion of glycerol: present status and future prospects S. Khanna, A. Goyal, V.S. Moholkar, // Crit. Rev. Biotechnol.. - 2012. – p. 235–262.
51. Kijchavengkul T. Polymer International/ T. Kijchavengkul, R. Auras. - 2008. – p. 793–804.
52. Kim, Y.B. Polyesters from microorganisms/ Y.B. Kim, R.W. Lenz //Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. - 2001. – p. 51–79.
53. Kleerebezem, R. Mixed culture biotechnology for bioenergy production / R. Kleerebezem, M.C. van Loosdrecht // Curr. Opin. Biotechnol. - 2007. – p. 207–212.
54. Klinke, H.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw/ H.B. Klinke, B.K. Ahring, et al. // Bioresource Technology. - 2002. – p.15-26.

55. Koller, M Microbial PHA Production from waste raw materials. Chen GQ (eds) Plastics from bacteria: Natural functions and applications/ M Koller, A Atlic, M Dias, A Reiterer, G Braunegg.// Microbial Microbiology monographs. Springer Verlag Berlin Heidelberg. -2010. - p. 85-119
56. Koller, M. Biopolymer from industrial residues: Life cycle assessment of poly(hydroxyalkanoates) from whey/ M. Koller, D. Sandholzer, A. Salerno, G. Braunegg, M. Narodoslawsky // Resour. Conserv. Recycl. - 2013. – p. 64–71.
57. Kourmentza, C. Investigation of PHAs production from acidified olive oil mill wastewater (OOMW) by pure cultures of Pseudomonas spp. Strains /C. Kourmentza, E. Mitova, N. Stoyanova, I. Ntaikou, M. Kornaros, // New Biotechnol. - 2009. - p. 269.
58. Kourmentza, C. Polyhydroxyalkanoates from Pseudomonas sp. Using synthetic and olive mill wastewater under limiting conditions/ C. Kourmentza, I.Ntaikou, G. Lyberatos, M. Kornaros // Int. J. Biol. Macromol. - 2015. – p. 202–210.
59. Kourmentza, C Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production/ C. Kourmentza, J. Plácido, N. Venetsaneas, A. Burniol-Figols, C. Varrone, H.N. Gavala, M.A.M. Reis // Bioengineering. – 2017. – p.55.
60. Kumar R., Singh S., Singh O.V. Bioconversion of lignocellu-losic biomass: Biochemical and molecular perspectives/ R. Kumar, S. Singh, O.V. Singh //J. Ind. Microbiol. Biotechnol, - 2008. – p. 377–391.
61. Kumar, P. Co-production of polyhydroxyalkanoates and carotenoids through bioconversion of glycerol by Paracoccus sp. Strain/ P. Kumar, H.-B., Jun, B.S. Kim // Int. J. Biol. Macromol. - 2018. – p. 2552–2558.
62. Laycock, B. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Laycock, H. Peter, S. Pratt, A. Werker, P. Lant // Prog. Polym. Sci.. - 2013. – p.536–583.
63. Lee S.Y., Kim M.K., Kim G.J.. Biotechnol. Lett. . -1995, p.571–574.
64. Lee S. Y., Chang H.N.. J. Environ Polymer Degrad. - 1994, p. 169–176.

65. Lee, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates / S.Y. Lee // Biotechnol. Bioeng. 1996. - Vol. 49. - P. 1-14.

66. Lee Y., Kim G. J., Choi D. K. Yeon B.K., Hong W.K., Vhoi E.S., Rhee S.K., Park Y.H., Sung D.H., Baek W.H. J. Ferment. Bioeng. – 1996. - p. 255–258.

67. Lemoigne M. Études sur l'autolyse microbienne origine de l'acide b-oxybutyrique formé par autolyze / M . Lemoingne - Ann Inst Pasteur. - 1927. – p.148-165.

68. Liu, á S.-J. Exploitation of butyrate kinase and phosphotransbutyrylase from Clostridium acetobutylicum for the in vitro biosynthesis of poly(hydroxyalkanoic acid) /S.-J. Liu á, A. SteinbuÈchel //Springer Verlag Berlin Heidelberg . Appl Microbiol Biotechnol . - 2000. - vol. 545-552.

69. Loo, C.Y. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a Wautersia eutropha mutant/ C.Y. Loo, W.H. Lee, T. Tsuge, Y. Doi, K. Sudesh //Biotechnol. Lett. - 2005.- p. 1405–1410.

70. Maarten, Kootstra PHA’s (Polyhydroxyalkanoates): General information on structure and raw materials for their production / Kootstra Maarten, Elissen Hellen, Huurman Sander // ACRRES - Wageningen UR. - February 2017. - p. 31

71. Macrae, R.M. The influence of cultural conditions on poly-P-hydroxybutyrate synthesis in Bacillus megaterium / R.M. Macrae, J.F. Wilkinson //Proc. R. Phys. Edin. - 1958. – p. 73–78.

72. Madison L.L. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic/ L.L. Madison, G.W. Huisman // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1999. – p. 21–53.

73. Madison, L.L. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic / L.L. Madison, G.W. Huisman // Microbiol. Mol. Biol. Rev.- 1999.-V.63.- p.21-53.

74. Manna, A. Accumulation of poly (3-hydroxybutyric acid) by some soil Streptomyces/ A. Manna, R. Banerjee, and A. K. Paul, //Current Microbiology. - 1999. - vol. 39, no. 3. - p. 153–158.

75. Marang, L. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production /L. Marang, Y. Jiang, M.C.M. van Loosdrecht, R. Kleerebezem // Bioresour. - Technol, 2013. – p.232–239.

76. Markets and Markets Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market by Type (Monomers, Co-Polymers, Terpolymers), Manufacturing Technology (Bacterial Fermentation, Biosynthesis, Enzymatic Catalysis), Application (Packaging, Bio Medical, Food Services, Agriculture)-Global Forecast to 202. Режим доступа: http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html (accessed on 26 May 2017).

77. Martin, Koller Formal - and high-structured kinetic process modelling and footprint area analysis of binary imaged cells: Tools to understand and optimize multistage-continuous PHA biosynthesis / Koller Martin, Vadlja Denis, Braunegg Gerhart, Aid Atlić4 and Predrag Horvat // European Biotechnology Thematic Network Association. -2017.

78. Mendonca, T.T. Exploring the potential of Burkholderia sacchari toproduce polyhydroxyalkanoates/ T.T. Mendonca, J.G. Gomez, E. Buffoni, Sánchez, R.J. Rodriguez, J Schripsema, M.S. Lopes, L.F. Silva, // J. Appl. Microbiol. - 2014. – p. 815–829.

79. Morgan-Sagastume, F. HIntegrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale / Morgan-Sagastume, F.; Hjort, M.; Cirne, D.; Gérardin, F.; Lacroix, S.; Gaval, G.; Karabegovic, L.; Alexandersson, T.; Johansson, P.; Karlsson, A.; et al. // Bioresour. Technol. - 2015. – p.78–89.

80. Mothes, G. Production of PHB from crude glycerol / G. Mothes, C. Schnorpfeil, J.-U. Ackermann //Eng. Life Sci. - 2007. – p. 475–479.

81. Mozejko-Ciesielska, J., Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? /J. Mozejko-Ciesielska, R. Kiewisz, //Microbiol. Res. - 2016. – p. 271–282.

82. Natano, R.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol/ R.V. Natano, P.E. Mantelatto, C.E. Rossell // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2001. - Vol. 57. - p. 1-5.

83. Nishioka, M. Production of poly-β-hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, Synechococcus sp.MA19, under phosphate-limited conditions/ M. Nishioka, K. Nakai, M. Miyake, Y. Asada, and M. Taya, // Biotechnology Letters. - 2001. - vol. 23, no. 14. -p. 1095–1099.
84. Ng, L.M., Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA)producer Aquitalea sp. USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHAsynthase/ L.M. Ng, K. Sudesh [Электронный ресурс]//J. Biosci. Bioeng. - 2016. Режим доступа: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.024.
85. Ntaikou, I. Microbial bio-based plastics from olive-mill wastewater: Generation and properties of polyhydroxyalkanoates from mixed cultures in a two-stage pilot scale system / I. Ntaikou, C. Valencia Peroni, C. Kourmentza, V.I. Ilieva, A. Morelli, E. Chiellini, G. Lyberatos// J. Biotechnol. - 2014. – p. 138–147.
86. Obruca, S. Controlled Production and Degradation of Selected Biomaterials / S. Obruca //Doctoral Thesis Brno University of Technology. - 2010.
87. Oeding, V. P-Ketothiolase from Hydrogenomonas eutropba H16 and its significance in the regulation of poly-P-hydroxybutyrate metabolism/ V. Oeding, H. G. Schlegel // Biochem J. - 1973. – p.239-248.
88. Oeding, V. Ketothiolase from Hydrogenomonas eutropha H 16 and its significance in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism / V. Oeding, H.G. Schlegel // Biochem. J. -1973.-V.134.-p. 239-248.
89. Oliveira, C.S.S. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities / C.S.S. Oliveira, C.E. Silva, G. Carvalho, M.A.Reis, // New Biotechnol. - 2016. – p. 69–79.
90. Page, W.J. Growth of Azotobacter vinelandii UWD in fish peptone medium and simplified extraction of polyhydroxybutyrate/ W.J. Page, A. Comnish // Appl Environ Microbiol.-1993.-V. 59.-P. 4236-4244.
91. Panda, B. Poly-β-hydroxybutyrate accumulation in Nostocmuscorumand Spirulina platensis under phosphate limitation/ B. Panda, L. Sharma, N. Mallick // Journal of Plant Physiology. - 2005. - vol. 162, no. 12. - p. 1376–1379.

92. Papanikolaou, S. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil/ Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., // Biomass and Bioenergy. - 2008. – p.60–71.

93. Park, D.H. Production of poly(3-hydroxybutyrate) andpoly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Ralstonia eutropha fromsoybean oil/ D.H. Park, B.S. Kim //N. Biotechnol. - 2011. – p.719–724.

94. Park, S.J. Metabolic engineering of Ralstonia eutropha for thebiosynthesis of 2-hydroxyacid-containing polyhydroxyalkanoates / Park, S.J., Jang, Y.A., Lee, H., Park, A.R., Yang, J.E., Shin, J., Oh, Y.H., Song, B.K., Jegal, J.,Lee, S.H., Lee, S.Y. // Metab. Eng.. - 2013. –p. 20–28.

95. Passanha, P. Increasingpolyhydroxyalkanoate (PHA) yields from Cupriavidus necator by using filtereddigestate liquors/ P. Passanha, S.R. Esteves, G. Kedia, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy//Bioresour. Technol. - 2013. – p.345–352.

96. Philippis, R. de, Factors affecting poly-β-hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria 108./ R. de Philippis, A. Ena, M. Guastini, C. Sili, and M. Vincenzini, //FEMS Microbiology Reviews. - 1992.- vol. 103, no. 2–4. - p. 187–194.

97. Pfeiffer, D. Localization of poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, phap6 and phap7, in Ralstonia eutropha H16 / D. Pfeiffer, D.Jendrossek // J. Bacteriol. - 2012. - p. 5909–5921.

98. Poirier, MC DNA adduct formation and tumorigenesis in miceduring the chronic administration of 4-aminobiphenyl at multiple dose levels/ MC Poirier, NF Fullerton, BA Smith, FA Beland //Carcinogenesis. - 1995. – p.2917–2921.

99. Poliakoff, M. Green Chem/ M. Poliakoff, I. Noda. - 2004, - p.37–38.

100. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market by Type, Manufacturing Technology & Application - Global Forecast to 2021 - Research and Markets[электронный ресурс]// Research and Markets.- Jul 26, 2017. – Режим

доступа: https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html

101. Plastics Technology. Available online. Режим доступа: http://www.ptonline.com/articles/prices-bottom-out-forpolyolefins-pet-ps-pvc-move-up (accessed on 26 May 2017).
102. Posada, J.A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol / J.A. Posada, J.M. Naranjo, J.A. Lypez, J.C. Higuita, C.A. Cardona //Process Biochem . - 2011. – p. 310–317.
103. Posada, J.A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem/ J.A. Posada, L.E. Rincón, C.A. Cardona, //Bioresour. Technol. - 2012. – p. 282–293.
104. Qiu, Y. Macromol. Bioscience/ Y. Qiu, S. Ouyng, Z.Shen. – 2004. - p. 255–261.
105. Qiu Y., Han J., Chen G. Appl. Genetics Mol. Biotechnol . - 2006.- p. 537–542.
106. Ra,i R Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a medium chain length polyhydroxyalkanoate homopolymer from pseudomonas mendocina/ R Rai, DM Yunos, AR Boccaccini, JC Knowles, I a Barker, SM Howdle, et al. //Biomacromolecules. - 2011.- p. 26–36.
107. Ravindra Naik, P Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil/ P. Naik Ravindra, G. Raman, K. Badri Narayanan, N. Sakthivel //BMC Microbiol. - 2008. – p.230.
108. Rebouillat, S. Recent strategies for the development of biosourced-monomers, oligomers and polymers-based materials: A review with an innovationand a bigger data focus/ S. Rebouillat, F. Pla // J. Biomater. Nanobiotechnol.,2016. – p. 167–213.
109. Riedel, SL Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by Ralstonia eutropha in high cell density palm oil fermentations/ SL Riedel, J Bader, CJ Brigham, CF Budde, ZA Yusof, C Rha, AJ Sinskey// Biotechnol Bioeng. - 2012. – p.74–83.
110. Rodríguez-Contreras, A. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator and Burkholderias acchari. / A. Rodríguez-

Contreras, M. Koller, M.M. de Sousa Dias, M.Calafell-Monfort, G.Braunegg, M.S. Marqués-Calvo //Biochem. Eng. J. - 2015.- p. 50–57.

111. Romanelli, A. M. A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification/ A. Romanelli, M. J. Fu, M. Herrera, B. Wickes // Mycoses . - 2014. - p.612–622.

112. Saharan, B. S. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments/B. S. Saharan, A. Grewal, P. Kumar //Chinese Journal of Biology. -2014.- 18 p.

113. Sato, S. Regulation of3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinantCupriavidus necator H16 from plant oil by using butyrate as a co-substrate/ S. Sato, H. Maruyama, T. Fujiki, K. Matsumoto// J.Biosci. Bioeng, 2015. – p. 246–251.

114. Sawant, S.S Enhanced agarose and xylan degradation for production of polyhydroxyalkanoates by co-culture of marine bacterium, Saccharophagus degradans and its contaminant / S.S. Sawant, B.K. Salunke, L.E. Taylor, B.S. Kim// Bacillus cereus. Appl. Sci. . - 2017.- p. 225.

115. Schlegel, H.G. A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies / H.G. Schlegel, H. Kaltwasser, G. Gottschalk // Arch. Microbiol. –1961. – Vol. 38. – p. 209-222.

116. Senior, P.G.. In Continuous culture. Eds A. Dean, D. Ellwood, C.Evans, Polyhydroxybutyrate, a speciality polymer of microbial origin. In: Dean ACR, Ellwood DC, Evans CGT (eds)//Continuous culture: biotechnology, medicine and the environment. - Chichester, Ellis Horwood. - 1984.- p. 266–271.

117. Senior, P.J. The regulation of poly-Phydroxybutyrate metabolism in Axotobacter beijerinckii / P.J. Senior, E.A. Dawes // Biochem. J. - 1973.- p. 225–238.

118. Serafim, L.S. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials / L.S. Serafim, P.C. Lemos, M.G.E. Albuquerque, M.A.M. Reis // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2008.- p. 615–628.

119. Serafim, L. S. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials /L. S. Serafim, P. C. Lemos, M. G. E. Albuquerque, and M. A. M.

Reis //Applied Microbiology and Biotechnology. - 2008. - vol. 81, no. 4, p. 615–628.

120. Shankar, Aditi Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from novel sources/ Aditi Shankar, Shalet D'Souza, Manish Narvekar, Pranesh Rao, Katyayini Tembadmani //International Journal of Research in Biosciences. -October 2015.- Vol. 4 Issue 4.- p. 16-28.

121. Shantini K. Influence of Feeding and ControlledDissolved Oxygen Level on the Production ofPoly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) copolymer by Cupriavidus sp.USMAA2-4 and its characterization / K. Shantini, A.R. Yahya, A.A . Amirul// Appl. Biochem. Biotechnol. - 2015. - p. 1315–1334.

122. Shozui, F Biosynthesis of novel terpolymers poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s in lactateoverproducing mutant Escherichia coli JW0885 by feeding propionate as a precursor of 3-hydroxyvalerate/ F Shozui, K Matsumoto, T Nakai, M Yamada, S Taguchi //Appl Microbiol Biotechnol. - 2010.- p.49–54

123. Solaiman, DKY Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates) / DKY Solaiman, RD Ashby, TA Foglia, WN. Marmer //Appl Microbiol Biotechnol. - 2006.- p.83–90.

124. Steinbüchel, A. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acids inclusions/ A. Steinbüchel, K. Aerts, W. Babel, C. Föllner, M. Liebergesell, M.H. Madkour, F. Mayer, V. //Pieper-Fürst, A. - 1992.

125. Steinbüchel, A. Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic acids/ A. Steinbüchel, H.E. Valentin // FEMS Microbiol. Lett.. - 1995.- p. 219–228.

126. Steinbüchel, A. Bacterial and other biological systems for polyester production / A. Steinbüchel, B. Füchstenbusch // Trends Biotechnol. – 1998. – Vol. 16. – p. 419-427.

127. Sudesh, K. Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters/ K.Sudesh, H. Abe, Y. Doi // Progress in Polymer Science. - 2000.- p.1503-1555.

128. Su, L Enzymatic polymerization of (R)-3-hydroxyalkanoates by a bacterial polymerase / L Su , RW Lenz, Y Takagi , S Zhang , S Goodwin , L Zhong , DP Martin // Macromolecules. - 2000.- p. 229–31.

129. Tan, G.-Y.A. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA) G.-Y.A. Tan, C.-L. Chen, L. Li , L. Ge, L.Wang, I.M.N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo , J.-Y. Wang // A review. Polymers. - 2014.- p. 706–754.

130. Tsuge, T. Effect of glycerol and its analogs on polyhydroxyalkanoate biosynthesis by recombinant Ralstonia eutropha: A quantitative structure-activity relationship study of chain transfer agents/ T. Tsuge, , T.Ko, , M.Tago, , H. Abe, // Polym. Degrad. Stab. - 2013.– p.1586–1590.

131. Volova T.G.. In Polyhydroxyalkanoates - Plastic Materials of the 21st Century: production, properties, application / T. G. Volova/ - NY.: Nova Science Pub. Inc. - 2004.

132. Volova, T.G. Degradable Polymers: Production, Properties and Applications / T.G. Volova, , E.I. Shishatskaya, A.J. Sinskey -NY.: Nova Sci. Publ. Inc., 2013.

133. Volova, T.G. Natural-based polymers for biomedical applications/ T.G. Volova, Yu.S. Vinnik, E.I. Shishatskaya, Markelova N.M. , G.E. Zaikov // Natural-based polymers for biomedical applications, Canada. - 2017.- p.1-9.

134. Volova, T. G. Biosynthesis of multi-component polyhydroxyalkanoates by the bacterium Wautersia eutropha / T. G. Volova, G.S. Kalacheva, A. Steinbuchel //Macromol. Symposia. - 2008.- p.1–7.

135. Volova, T.G. The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures/ T.G. Volova, N.O. Zhila, E.I. Shishatskay, P.V. Mironov, A.D. Vasil’ev, A.G. Sukovatyi, A. Sinskey //J.. Polymer Science, Ser. A. -2013. – p.427–437.

136. Volova, T. Cell growth and PHA accumulation from CO_2 and H_2 of a hydrogen-oxidizing bacterium, Cupriavidus eutrophus B-10646/ T.Volova, , E. Kiselev, , E. Shishatskaya, , Zhila, N. Boyandin, A. Syrvacheva, D., O. Vinogradova, G. Kalacheva, A. Vasiliev, I.Peterson, //Bioresour. Technol. - 2013. – p. 215–222.

137. Volova, T.G. A glucose-utilizing strain, Cupriavidus eutrophus B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs / T.G. Volova, E.G. Kiselev, O.N. Vinogradova, E.D. Nikolaeva, A.A. Chistyakov, A.G. Sukovatyi, E.I. Shishatskaya // Plos One. – 2014. - Vol. 9. – №2. – p. 1-15

138. Volova, T.G. Synthesis of P(3HB-co-3HHx) copolymers containing high molar fraction of 3-hydroxyhexanoate monomer by Cupriavidus eutrophus B10646/ T.G. Volova, D.A. Syrvacheva, N.O. Zhila, A.G. Sukovatiy //J.Chem. Technology and biotechnology. - 2016, - p.416–425.

139. Volova, T.G. A study of synthesis and properties of poly-3-hydroxybutyrate/diethylene glycol copolymers/ T.G. Volova, N.O. Zhila, E.G. Kiselev, E.I. Shishatskaya // Biotechnology Progress. - 2016, - p. 1017-1028.

140. Volova, T.G. Properties of a novel quaterpolymer P(3HB/4HB/3HV/3HHx)/ T.G. Volova, O.N. Vinogradova, N.O. Zhila, I.V. Peterson, E.G. Kiselev, A.D. Vasil'ev, A.G. Sukovatiy, E.I. Shishatskaya //Polymer. -2016.- p. 67–74.

141. Wang, Y. Engineering Escherichia coli for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space / Y. Wang, H. Wu, X. Jiang, G.-Q. Chen // Metab. Eng. - 2014. - p. 183–193.

142. Wolf, O. E., Crank, M., Patel, Martin Kumar, Marscheider-Weidemann, F., Joachim Schleich, B., Hüsing, G. ,Angerer Tehno-Economic Feasibility of Large-Scale Production of Bio-Based Polymers in Europe. European Communities. -2005.

143. Wong, Y.M., Biosynthesis andcharacterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil byrecombinant Cupriavidus necator / Y.M. Wong, C.J. Brigham, C. Rha, A.J. Sinskey, K. Sudesh, // Bioresour. Technol. - 2012.- p. 320–327.

144. Wu, G Sodium acetate stimulates PHB biosynthesis in Synechocystis sp. PCC, 6803/ G. Wu, T. Boa, Z. Shen, and Q.Wu, //Tsinghua Science and Technology. - 2002.- vol. 7. - №. 4. - p. 435–438,.

145. Yew, S. P. Morphological studies of Synechocystis sp. UNIWG under polyhrdroxyalkanoate accumulating conditions/S. P. Yew, M. H. Sau, K. H. Yong,

R.M.M. Abed, and K. Sudesh //Malaysian Journal of Microbiology. - 2005. - vol. 1, № 1, - p. 48–52.

146. Yue, H. A. Seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant Halomonas campaniensis LS21 grown in mixed substrates/ H. A. Yue, C. Ling, T. Yang, X. Chen, Y. Chen, H. Deng // Biotechnol Biofuels. - 2014. – p.108.
147. Zhila, N.O., Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by Cupriavidus eutrophus B-10646 cells grown on different carbon sources/N. O. Zhila, G.S/ Kalacheva, T.G. Volova // Process Biochemistry. – 2015. – Vol. 50. – p. 69–78
148. Виноградова, О.Н. Синтез биодеградируемых биополимеров с улучшенными эксплуатационными свойствами/ О.Н. Виноградова, Д.А. Сырвачева //Химия в интересах устойчивого развития. - 2014, - с. 505–508.
149. Волова, Т.Г. Полиоксибутират-термопластичный биодеградируемый полимер / Т.Г. Волова, Г.С. Калачева - Красноярск: Институт биофизики СО АН СССР, 1990. - С. 23
150. Волова, Т.Г. Влияние условий роста на накопление полиоксибутирата водородными бактериями / Т.Г. Волова, Г.С. Калачева, В.М. Константинова, А.П. Пузырь // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28. – С. 221-230.
151. Волова, Т.Г., Опытное производство биоразрушаемых полимеров/ Т.Г. Волова, Н.А. Войнов, В.С. Муратов, Н.В. Бубнов, К.В. Гурулев, Г.С. Калачева, Н.В. Горбунова, В.Ф. Плотников, Н.О. Жила, Е.И. Шишацкая, О.Г. Беляева// Биотехнология. - 2006.-с. 28–34.
152. Волова, Т.Г., Синтез сополимеров 3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата водородокисляющими бактериями/ Т.Г. Волова, Н.О. Жила, Г.С. Калачева, В.А. Соколенко, Э.Дж. Синski// Прикладная биохимия и микробиология. - 2011. – p. 544-550.
153. Волова, Т.Г., Физико-химические свойства многокомпонентных полигидроксиалканоатов: новые аспекты/Т.Г. Волова, О.Н. Виноградова, Н.О.

Жила, Е.Г. Киселев, И.В. Петерсон, А.Д. Васильев, А.Г. Суковатый, Е.И. Шишацкая// Высокомолекулярные соединения. Серия А. - 2017. – с. 76–85.

154. ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств». - Введ. 20.05.2009. - Москва: Стандартинформ, 2009. - 146 с.
155. ГОСТ ИСО 14644-1-2002 Чистые помещения и связанные с ними контролирующие среды. Часть 1. Классификация чистоты воздуха. – Введ. 01.04.2004. - Москва: Федеральное агентство по техническому регулированию и метрологии, 2004. - 38 с.
156. ГН 2.2.6.1080-01 «Предельно допустимые концентрации микроорганизмов-продуцентов, бактериальных препаратов и их компонентов в воздухе рабочей зоны»., М: Минздрав России, 2002-3с.
157. Киселев, Е.Г. Технико-технологические основы биосинтеза резервных полигидроксиалканоатов водородными бактериями: дис… канд. техн. наук : 03.01.06 Биотехнология/ Киселев Евгений Геннадьевич. – Красноярск, 2012. – 162 с.
158. Мальцева, П.М. Основы научных исследований/ П.М. Мальцев, Н.А. Емельянова .- Киев: Вища школа, 1982.- 190 с.
159. МУ-45-116 «Определение класса чистоты производственных помещений и рабочих мест. Приборы и методы», – Москва: Минздрав России,1997. - 6 с.
160. МУК 4.2.734-99 Микробиологический мониторинг производственной среды. - Введ. 10.05.1999. – Москва: Минздрав России, 1999. - 12 с.
161. Национальный стандарт РФ правила производства и контроля качества лекарственных средств Good Manufacturing Practice for medicinal products EC (GMP) ГОСТ Р 52249-2004., перевод АСИНКОМ, 2003.- 159 с.
162. Практикум по микробиологии /Под ред. Н.С. Егорова // МГУ. – М., 1976. – 245с.
163. Романов, В.И. Успехи биол. Химии/ В.И. Романов.- М.: Москва, 1977.- с. 211–230.

164. Фомин, В.А. Пластические массы/ В.А. Фомин, В.В. Гузеев. – М, 2001. - с. 42–46.

165. Штильман, М.И. Полимеры медико-биологического назначения/ М.И. Штильман.- М,: ИКС. Академкнига, 2006.- 400 с.