

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

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
М. Волова Т.Г. Волова

« ____ » ____ 20 __ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез сополимеров с 3-гидроксивалератом бактериями *Cupriavidus necator*
B-10646 при росте на липидных субстратах

Научный руководитель

К.б.н., доцент

Жила Н.О.

Подпись, дата

Инициалы, фамилия

Выпускник

Подпись, дата

Ильмушкин В.С

Инициалы, фамилия

Красноярск 2020

Содержание

Глава 1. Обзор литературы.....	4
1.1 Введение.....	4
1.2 Классификация ПГА	7
1.3 Свойства ПГА.....	10
1.4 Биосинтез ПГА	11
1.5 Производство ПГА на растительных маслах и жирных кислотах.....	12
1.6 Использование эмульгаторов при культивировании микроорганизмов на липидных субстратах.....	18
Глава 2. Материалы и методы.....	20
2.1 Штамм <i>Cupriavidus necator</i> B-10646	20
2.2 Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования	20
2.3 Определение концентрации фруктозы	22
2.4 Определение содержания в клетках состава ПГА.....	22
2.5 Выделение полимера	23
2.6 Определение молекулярной массы полимера.....	23
2.7 Статистическая обработка данных.....	23
Глава 3. Результаты и обсуждения	24
3.1 Влияние концентрации эмульгаторов на показатели удельной скорости роста <i>C. necator</i> B-10646..... Ошибка! Закладка не определена.	
3.2 Возможность использования бактериями штамма <i>C. necator</i> B-10646 эмульгаторов коилглутамата натрия и Tween-80 в качестве углеродных субстратов	
Ошибка! Закладка не определена.	
3.3 Изучение параметров эмульгирования субстратов пальмового масла, пальмитиновой кислоты, олеиновой кислоты эмульгаторами кокоилглутамат натрия и Tween-80	
Ошибка! Закладка не определена.	
3.4 Изучение влияния эмульгаторов кокоилглутамата натрия и Tween-80 на рост культуры <i>C. necator</i> B-10646 и синтез полимера при росте на фруктозе	
Ошибка! Закладка не определена.	
3.5 Культивирование <i>C.necator</i> B-10646 на олеиновой кислоте без и с добавлением эмульгаторов кокоилглутамата натрия и Tween-80 с предшественником ЗГВ..... Ошибка! Закладка не определена.	
3.6 Культивирование <i>C.necator</i> B-10646 на пальмитиновой кислоте без и с добавлением эмульгаторов кокоилглутамата натрия и Tween-80 с предшественником ЗГВ..... Ошибка! Закладка не определена.	

3.7 Культивирование C.necator B-10646 на пальмовом масле без и с добавлением эмульгаторов кокоилглютамата натрия и Tween-80 с предшественником ЗГВ.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.8 Показатели накопления биомассы, процентного содержания полимера и валерата культуры C.necator B-10646 при росте на олеиновой кислоте, пальмитиновой кислоте и пальмовом масле с эмульгаторами кокоилглютамат натрия и Tween-80 с предшественником ЗГВ	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	25
Список литературы:	26

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Введение

Полигидроксиалканоаты – это особая группа природных полиэфиров гидроксипроизводных жирных кислот, которые обычно используются микроорганизмами в качестве запасающего вещества. В отличие от большинства природных полиэфиров, ПГА локализованы внутри клеток, тогда как остальные соединения производятся во внешнюю среду. Находятся ПГА в цитоплазме клетки, в виде шарообразных гранул имеющих размер от 0,21 до 0,55 микрометров.

Впервые обнаружил ПГА в клетках бактерий учёный Бейеринк в 1888 году. Первое документальное описание ПГА принадлежит французскому учёному Лемоину, который впервые описал ПГА в клетках *Bacillus megaterium* в виде полимера поли-3-гидроксибутират (ПГБ) в 1925 г [1]. Позже учёный Улкинсон с коллегами в 1958 году в своем докладе указал на особые свойства биосовместимости и биодеградации П(ЗГБ). Это привлекло внимание общественности и вызвало значительный научный и коммерческий интерес к П(ЗГБ) и остальным ПГА. Учёные стали активнее исследовать способы получения и использования данных биополимеров [2].

ПГА действительно уникальные биополимеры. Они обладают широким диапазоном физических свойств. Помимо термопластичности, высокой по сравнению с другими полимерами механической прочности и гибкости, они характеризуются такими важными в современном мире качествами как биоразрущаемость и биосовместимость [3].

Наиболее хорошо изученным и описанным в литературных источниках полигидроксиалканоатом является гомополимер поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)). По своим физическим свойствам он очень близок к активно используемым в промышленности на данный момент полимерам — полиэтилену и полипропилену, что делает его потенциальным кандидатом на замещение этих вредных для экологии материалов [4]. Термопластичность П(ЗГБ) и способность кристаллизоваться в исходном состоянии являются

наиболее значимыми параметрами, поскольку открывают возможность переработки полимера в коммерческие продукты и изготавливать сложные изделия на их основе.

Свойства ПГА изменчивы в широком диапазоне в зависимости от типа и соотношения мономеров в их полимерной цепи. В результате этого на основе ПГА можно иметь выбор материалов с различными физико-механическими показателями [5].

Полигидроксиалканоаты имеют огромный потенциал использования практически во всех сферах человеческой деятельности: в медицине (протезирование, хирургия, стоматология) и фармацевтике, в сельском хозяйстве, пищевой промышленности. Существует более чем 150 вариаций включений мономеров в их полимерную цепь, которые и определяют свойства ПГА [6].

Одной из главных проблем коммерческого производства ПГА является их высокая стоимость. Большая часть затрат приходится на стоимость углеродного субстрата для выращивания микроорганизмов продуцентов. Поиск подходящих субстратов крайне важен для создания экономически выгодного и успешного производства ПГА различных составов. Оптимизация технологии производства может значительно увеличить производство бактериального полимера и его сополимеров.

Ведутся исследования по использованию в качестве сырья для роста культуры микроорганизмов различных растительных масел (оливковое, кукурузное, соевое, рапсовое, пальмовое, подсолнечное и другие), а также длинноцепочечных жирных кислот (пальмитиновая, олеиновая кислота, миристиновая, лауринова и т.д.).

Использование данных субстратов позволяет получать значительно больше целевого продукта - полимера и сополимеров в результате культивирования. Также при использовании растительных масел и жирных кислот экономический коэффициент по биомассе увеличивается до значений 0.7-0.8, в то время как при использовании сахаров в качестве углеродного

субстрата составляет - 0.3-0.35, что доказывает возможную эффективность использования данных субстратов[7].

Водородокисляющие бактерии *Cupriavidus necator* являются очень перспективными кандидатами для создания полного биотехнологического производства биоразрушаемых пластиков. Но на данный момент для производства ПГА используют в основном сахара, а ростовые характеристики культуры и состав полимера при использовании в качестве субстрата жирных кислот и масел изучены плохо.

Беря во внимание всю вышеизложенную информацию, в работе была поставлена важная и актуальная задача по изучению процесса культивирования на растительных маслах и жирных кислотах.

Тема работы: Синтез сополимеров с 3-гидроксивалератом бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 при росте на липидных субстратах с эмульгаторами

Цель работы: исследовать рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез сополимера с 3-гидроксивалератом на различных липидных субстратах

Задачи:

- Исследовать влияние эмульгаторов Tween-80 и кокоилглутамат натрия на рост бактерий и синтез полимера;
- Исследовать возможность синтеза сополимеров с 3-гидроксивалератом бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 при росте на липидных субстратах с добавлением и без добавления эмульгаторов;

1.2 Классификация ПГА

На сегодняшний день науке известно более 150 разнообразных по своей структуре полимеров ПГА. Помимо естественных организмов, синтезирующих ПГА, существует и множество генетически модифицированных (рекомбинированных), однако общая структура полимера остаётся неизменной. Основные структуры полигидроксиалканоатов изображены на Рисунке 1.

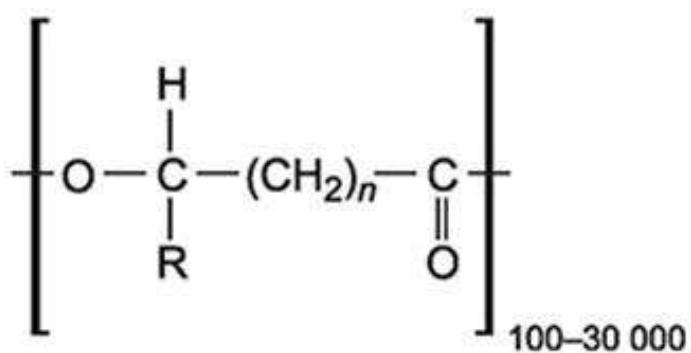
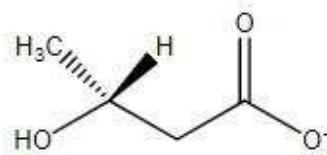


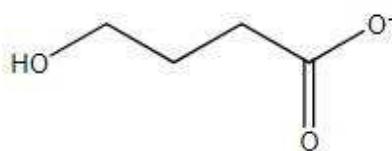
Рисунок 1 – Общая структурная формула полигидроксиалканоатов

ПГА разделяют на три основные группы:

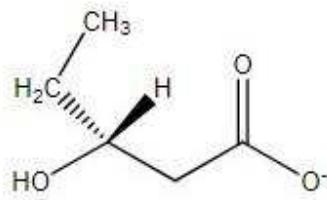
1) Короткоцепочечные ПГА, состоящие из кислот с длинной углеродной цепи от 3 до 5 углеродных атомов. К представителям этого класса относится - поли(3-гидроксибутират) (ПЗГБ), и его сополимеры с 3-гидроксивалератом. Из всех ПГА, ПЗГБ наиболее распространён в природе. Это самый простой по химической структуре ПГА, имеющей (-CH₃) группу. Состав полимера по атомам химических элементов распределён следующим образом: на углерод приходится (81%), на кислород (11,97%) и на водород (7,03%). Возможны частные случаи включение мономеров, таких как 3-гидроксивалерат и 4-гидроксибутират. Они включаются в П(ЗГБ) цепи, когда во время процесса культивирования используются различные прекурсоры (дополнительные углеродные субстраты), например, раствор валерата калия.



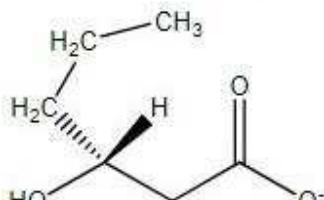
3-гидроксибутират



4-гидроксибутират



3-гидроксивалерат



3-гидроксигексаноат

Рисунок 2 – Основные короткоцепочечные мономеры ПГА

2) Среднекепочечные ПГА, содержат от 6 до 14 атомов углерода. Для синтеза среднекепочечных полимеров в качестве продуцента обычно выступают бактерии рода *Pseudomonas*, а в качестве основного источника углерода в субстрате - алифатические углеводороды.

3) Длинноцепочечные ПГА являющиеся сополимерами коротко – и среднекепочечных ПГА и включающие в мономерный состав более 14 атомов углерода [4].

Некоторые бактерии способны синтезировать сразу несколько типов ПГА. Известно, что плотность короткоцепочечных гранул полимера значительно выше, чем плотность среднекепочечных гранул, из-за наличия в структуре длинных боковых цепей [10].

Также ПГА можно систематизировать не только по длине углеродной цепи кислоты, но и по мономерному составу. ПГА, содержащие один тип мономеров, называются гомополимерами, например, такие как обозначенные ранее поли(3-гидроксибутират), поли(3-гидроксигексаноат) и поли(3-гидроксиоктаноат). ПГА, содержащие в своём составе более одного типа мономера, называют гетерополимерами, например, двухкомпонентный поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) или трехкомпонентный поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат-со-3-гидроксигексаноат).

ПГА являются макромолекулами клетки и синтезируются в специфических условиях лимитированного (ограниченного) роста, в состоянии, когда синтез белка и нуклеиновых кислот невозможен, при избытке углерода и явном недостатке азота в среде. [10].

Это крайне важно, поскольку в процессе ферментации мы можем подвергать состав питательной среды и условия культивирования разнообразным изменениям, получая ПГА различной химической структуры, которая в свою очередь и определяет механические и физико-химические свойства полимера: кристалличность, модуль Юнга, температуру плавления, эластичность, прочность, а также скорость, с которой происходят процессы биодеградации полимера.

В зависимости от концентрации основного источника углерода в качестве которого могут выступать (глюкоза, пальмовое масло, олеиновая кислота и др.), субстратов-предшественников (соли валериановой и пропионовой кислоты, γ -бутиrolактон, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол и 4-хлормаслянная кислота, 4-броммасляная кислота, раствор валерата калия), и времени в течение которого проводится культивирование бактерий, получают полимеры с различным мономерным соотношением 3-гидроксибутират (3ГБ), 3-гидроксивалерата (3ГВ), 4-гидроксибутират (4ГБ) и прочих мономеров.

Наибольшую ценность и важность для коммерческой индустрии представляют ПГА, имеющие низкий показатель кристалличности и обладающие свойствами эластомеров, к таким относятся полимеры с включениями ЗГВ. Получение ПГА с включениями сополимеров является крайне сложной биотехнологической задачей, требующей значительных ресурсов и материально технического обеспечения. Для её решения необходимо изменение условий культивирования и состава среды. Для включения в цель мономеров сополимеров необходимы дополнительные источники углерода в качестве субстратов-предшественников (прекурсоров). Это оказывает ингибирующее действие на клетки и негативно сказывается на

общей продуктивности биотехнологического процесса включая биомассу клеток и синтез сополимеров [11-12]. Поэтому постоянно ведутся поиски наиболее подходящих субстратов и предшественников для получения необходимых для биотехнологического производства полимеров, которые могли бы конкурировать с традиционными пластиками.

1.3 Свойства ПГА

Поли(3-гидроксибутират) П(ЗГБ) самый распространённый и хорошо изученный представитель полигидроксиалкоатов. Однако П(ЗГБ) имеет существенные ограничения в промышленном и коммерческом применении в качестве термопластичного материала из-за некоторых негативных свойств, таких как высокая кристалличность и низкая эластичность. Поэтому в коммерческой сфере особое внимание уделяют полимерам с включением мономера ЗГВ, который обладает наилучшими для промышленного производства физическими свойствами. Включение этого мономера значительно снижает кристалличность, твердость и температуру плавления материала, увеличивая его эластичность и делая более востребованным в промышленности [13].

Для синтеза полимера с включениями ЗГВ обычно в качестве предшественника в питательную среду добавляют соли пропионовой или валериановой кислоты. Однако эти предшественники оказывают негативное действие на клетки бактерий. Поэтому появляется проблема использования этих прекурсоров в масштабных производствах, поскольку при ферментации может произойти ингибирование роста бактериальной культуры, что приведёт к существенному увеличению себестоимости целевого продукта.

Включения 3-гидроксивалерата при использовании прекурсора приводит к синтезу сополимера поли (3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата П(ЗГБ-со-ЗГВ)) в процессе культивирования *Cupriavidus necator*. Этот полимер обладает лучшими термопластичными свойствами по сравнению с П(ЗГБ) [14].

Биосовместимые и биодеградируемые ПГА являются многообещающим материалом для применения в разнообразных сферах человеческой деятельности, включая производство лекарств и медицинских изделий. По всему миру активно ведутся исследования и разработка биодеградируемых пластиков – полигидроксиалканоатов (ПГА), отрасль становится больше с каждым годом и привлекает всё больше инвестиций [15].

1.4 Биосинтез ПГА

ПГА играет ключевую роль в приспособлении микроорганизмов к выживанию при стрессе. ПГА способствуют долгосрочному выживанию бактерий в условиях дефицита питательных веществ, выступая в качестве запасов углерода и энергии для не споровых и спорообразующих форм бактерий.

Биосинтетические пути ПГА неразрывно связаны с центральным метаболизмом бактерии. К центральному метаболизму относятся: гликолиз, цикл Кребса, β -окисление, синтез жирных кислот, аминокислотный катаболизм, цикл Кальвина и сериновый путь. Синтез ПГА тесно связан с этими процессами.

Накопление ПГА посредством метаболической регуляции позволяет микробам, накапливающим ПГА, увеличивать доступный объём питательных ресурсов при их адаптации к условиям окружающей среды.



Рисунок 4 – Гранулы ПГА в клетках бактерий

β -окисление является главным метаболическим путем для биосинтеза среднеподцепочечных ПГА молекул, при синтезе на жирных кислотах и маслах [16]. Катаболизм жирных кислот является одним из самых распространенных путей, производства гидроксиалканоатов (ГА) – базовых мономеров ПГА [17]. Промежуточные продукты метаболизма, образующиеся при внутриклеточном метаболизме жирных кислот через β -окисление, обеспечивают синтез гидроксиалканоил-КоА, основного субстрата для среднеподцепочечных ПГА.

Этот метаболический путь присущ многим бактериям, таких как *Pseudomonas oleovorans* и *Pseudomonas fragii*, которые осуществляют синтез среднеподцепочечных ПГА из алкановых и жирных кислот. У этих бактерий мономерный состав синтезированного ПГА полностью зависит от состава субстрата.

Таким образом, использование жирных кислот с четным числом атомов углерода приводит только к синтезу (R)-3-гидроксиалканоатов с четным количеством атомов углерода, тогда как в результате потребления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода синтезируются только (R)-3гидроксиалканоаты с нечетным количеством атомов углерода. Промежуточные продукты β -окисления жирных кислот включают такие соединения как, еноил-КоА, 3-кетоацил-КоА и (S)-3-гидроксиацил-КоА, которые в свою очередь могут служить предшественниками (R)-3гидроксиацил-КоА, соединения непосредственно участвующего в синтезе среднеподцепочечных ПГА [17].

1.5 Производство ПГА на растительных маслах и жирных кислотах

Несмотря на то, что масла являются возобновляемыми и недорогими сельскохозяйственными продуктами, работ, описывающих использование растительных масел для производства ПГА, всё ещё мало.

Как известно, растительные масла являются важными сельскохозяйственными продуктами, которые получают из различных

культур по всему миру, включая сою, рапс и масличную пальму. Эти масла в основном состоят из триацилглицеринов (ТАГ), в которых три жирные кислоты присоединены к основной цепи глицерина. Типы и распределение жирных кислот, присутствующих в масле, варьируются в зависимости от вида растения [18]. Растительные масла традиционно используются в пищевой промышленности, но они также могут быть химически переработаны в другие продукты, такие как топливо, химикаты и полимеры [18].

Ching-Yee Loo с коллегами проводил эксперименты по использованию в качестве источника углерода пальмового масла и пальмового олеина. В исследовании использовался мутантный штамм *Wauteria eutrophia*, несущий ген синтазы многоатомного гидроксиалканоата (ПГА) *Aeromonas caviae*[19]. Использовалась концентрация 5 г/л. Пальмовые масла показали себя отличными источниками углерода для производства клеточной биомассы и ПГА. Концентрация полимера в биомассе составляла 87%. Среднечисленная молекулярная масса сополимера ПГА, полученного из различных продуктов пальмового масла, варьировалась от 27 000 до 46 000 Да. Полидисперсность находилась в диапазоне 2,6-3,9. Исследование впервые показало, что пальмоядровое масло является отличным источником углерода для производства клеточной биомассы рекомбинантной *W. eutrophia*.

Авторы данного исследования отмечают, что крупномасштабное производство этого сополимера с использованием различных продуктов пальмового масла должно еще более снизить стоимость ПГА и сделать его более конкурентоспособным в коммерческом отношении по сравнению с синтетическими пластиками [19].

В другом исследовании Du-Kyeong Kang, изучал возможности использования отходов производства пальмового масла в целях снижения стоимости производства ПГА. Для синтеза использовалась бактерия *Pseudomonas putida* различных штаммов. Было обнаружено, что

штамм *Pseudomonas putida* S12 дает самый высокий выход (~41%) эластомерных средне-длинноцепочечных ПГА [20].

Идею использования отходов производства пальмового масла изучали и другие учёные. Ahmad Mohammed Gumel изучал биосинтез и характеристику поли-3-гидроксиалканоатов средней длины продуцируемых *Pseudomonas putida* Bet001, выделенных из сточных вод завода по производству пальмового масла. Накопление среднецепочечных ПГА в диапазоне от 49,7 до 68,9% в пересчете на сухую массу клеток наблюдалось, в случае, когда жирные кислоты в диапазоне от октановой кислоты (С (8: 0)) до олеиновой кислоты (С (18: 1)) использовались как единственные источник углерода и энергии. Было обнаружено, что молекулярная масса полимера находится в диапазоне от 55,7 до 77,7 кДа. В зависимости от типа используемой жирной кислоты [21].

Культивирование с высокой плотностью клеток при использовании пальмового масла в качестве единственного источника углерода для биосинтеза П(ЗГБ) были выполнены Riedelatal. (2012) [23]. В этих экспериментах получали до 140 г/л от сухого веса клеток с содержанием ПГА 73%. Это равно суммарной продукции ПГА > 100 г/л, и данные свидетельствуют о том, что процесс ферментации можно масштабировать. Молекулярная масса ПГА, полученная в этих экспериментах, уменьшалась с 500 000 до 300 000 Да в ходе культивирования. Индекс полидисперсности несколько увеличивался с 1,9 до 2,1.

Проводились исследования и по получению сополимерных ПГА. Wing-Hin Lee с коллегами производил биосинтез полигидроксиалкоатных сополимеров из смесей растительных масел и прекурсоров 3-гидроксивалерата. В качестве субстрата использовалась комбинация растительных масел и предшественников 3-гидроксивалерата (ЗГВ). Эксперименты проводились на бактерии *Cupriavidus necator* H16. Среди различных смесей растительных масел и предшественников ЗГВ смесь пальмоядрового масла и пропионата натрия была наиболее пригодна для биосинтеза высокой концентрации ПГА

(6,8 г/л), содержащей 7 мол. % ЗГВ. Состав мономера ЗГВ варьировался в диапазоне 0-23 моль % путем изменения параметров культивирования, таких как pH, а также источник азота и его концентрация. ПГА - сополимеры с высокой средневесовой молекулярной массой в диапазоне от 1 400 000 до 3 100 000 Да, были успешно получены из смесей растительных масел и предшественников ЗГВ. Смесь растительных масел и пропионата натрия привела к получению сополимеров ПГА с более высокой средневесовой молекулярной массой по сравнению со смесью растительных масел и валерата натрия. Анализ ПГА, содержащем мономеры ЗГВ, показал наличие двух различных температур плавления, которые указывают, что синтезированный ПГА может представлять собой смесь Р (ЗГБ) и Р (ЗГБ-со-ЗГВ). Пропионат натрия, по-видимому, является лучшим предшественником ЗГВ, чем валерат натрия [21].

Аналогичные исследования проводил *Paramasivam Murugan*. Комбинация пальмового олеина и фруктозы была использована в качестве источника углерода для биосинтеза рекомбинантным штаммом *Cupriavidus necator* Re2058 / pCB113. Культуры, выращенные с использованием 5 г/л пальмового олеина в качестве источника углерода, давали сухую массу клеток 5,13 г/л, содержание ПГА составляло 67%, а накопление сополимера 27%. Когда культуры выращивали на 5 г/л фруктозы в качестве источника углерода, они давали сухую массу клеток 2,32 г/л, 11% ПГА, а накопление сополимера не происходило. Клетки накапливали только гомополимер поли(3-гидроксибутират).

Исследование Kesevan Bhubalan содержит информацию о биосинтезе и характеристики терполимера П(ЗГБ- со- ЗГВ) полученного на субстрате из смесей пальмоядрового масла и предшественников ЗГВ с использованием рекомбинантной *Cupriavidus necator*. Валерат натрия и пропионат были оценены для продукции мономеров ЗГВ. Время подачи этих предшественников было решающим фактором, который значительно влиял на молярные фракции ЗГВ, которые варьировались в диапазоне от 2 до

60%. Валерат натрия, как правило, был лучшим предшественником для накопления мономеров ЗГВ при сохранении высокого сухого веса клеток (7,9 г/л) и хорошего накопления ПГА (79%). Известно, что сополимеры Р(ЗГБ-*ко-*ЗГВ) проявляют примерно одинаковую степень кристалличности в широком диапазоне содержания мономеров ЗГВ в составе. Интересно, что в этом исследовании термополимеры, содержащие 58% ЗГВ, 39% ЗГВ и 3% ЗГГ, показали эластомерное поведение. Это исследование демонстрирует пригодность пальмоядрового масла в качестве основного источника углерода и пропионата натрия и валерата натрия в качестве предшественников ЗГВ для синтеза новых композиций термополимеров П(ЗГБ-*ко-*ЗГВ) [22].

Использование кислот для синтеза ПГА изучено ещё хуже, чем использование масел. [24]

Исследования Lee & Choi (1999) [25] показали, что использование в качестве дополнительного источника углерода пропионовой кислоты, позволяет получить сополимер П(ЗГБ-*ко*-ЗГВ). Аналогичные исследования провели и для олеиновой кислоты и использовали её в качестве добавки в культурах, генетически модифицированных *Escherichia coli*, в результате чего накопление П(ЗГБ-*ко*-ЗГВ) увеличилось вдвое.

Cheeetal в своей работе [26] исследовали влияние различных концентраций жирных кислот на рост клеток и продукцию ПГА бактерией *Burkholderia sp.* Насыщенная стеариновая кислота (C_{18:0}) и ненасыщенная олеиновая кислота (C_{18:1}) продуцировали различные количества П(ЗГБ), в результате чего первая приводила к синтезу менее 1 мол.%, в то время как последняя производила 48 мол.% П(ЗГБ). Важно отметить, что олеиновая кислота является одной из основных жирных кислот пальмового масла, которая является возобновляемым и дешевым источником углерода.

Олеиновая кислота является перспективным субстратом для синтеза полимера благодаря своей дешевизне и распространённости. Marangoni et al. (2000) [27] показали, что использование олеиновой кислоты как дополнительного источника углерода приводило к увеличению продукции

ПГА у глюкозоутилизирующего штамма *R. eutropha* DSM 545. Добавление олеиновой кислоты в концентрациях 0.9-3.0 г/л в качестве вспомогательного субстрата приводило к увеличению концентрации биомассы в 2-7 раз по сравнению с ростом на глюкозе у этого же штамма. Более высокие выходы биомассы и полимера в 1.5 и 1.3 раза соответственно, при росте на смеси фруктозы и олеиновой кислоты по сравнению с ростом на фруктозе также наблюдали у штамма *Alcaligenes sp.* NCIM No. 508. Максимальный урожай биомассы и содержание полимера при росте *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 на олеиновой кислоте и фруктозе составляли 7.1 г/л и 59 % от биомассы и 4.3 г/л и 35 % от биомассы соответственно.

Авторы считают, что двойная связь жирных кислот значительно увеличивает скорость ферментативной реакции при накоплении ПГА. Олеиновая кислота, будучи прекурсором синтеза ацетил-КоА, оказывает значительное влияние на метаболизм клетки и увеличивает клеточную биомассу. Таким образом, благодаря добавлению олеиновой кислоты была увеличена как концентрация клеточной биомассы, так и содержание П(ЗГБ). И наоборот, уменьшение сухого веса клеток (4,6 г/л) и ЗГБ мономера (42 мол. %) наблюдалось за счет добавления пальмитиновой кислоты.

В своей работе Ramachandranetal (2011) [28] использовали различные жирные кислоты (олеиновая, пальмитиновая, миристиновая, стеариновая, лауриновая, валериановая) в процессе культивирования *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 для получения различных композиций сополимера с помощью одностадийного процесса культивации. Было также обнаружено, что олеиновая кислота способствовала росту клеток и улучшала производство мономера ЗГБ.

Успехи в этих исследованиях подтверждают факт о необходимости более тщательного изучения показателей роста микроорганизмов способных синтезировать ПГА на различных растительных маслах и жирных кислотах. Необходимо более детальное и всестороннее изучение этой проблемы.

1.6 Использование эмульгаторов при культивировании микроорганизмов на липидных субстратах

При использовании растительных масел в качестве углеродных субстратов исследователи сталкивались с проблемой искажения результатов культивирования из-за неоднородности двухфазной среды. Добавление нерастворимого растительного масла или кислоты в водную питательную среду создает гетерогенную смесь, в которой масло из-за своей гидрофобности концентрируется на поверхности сосуда. При культивировании в ферментере масло можно перемешивать, но аэрация внутри заставляет его возвращаться в верхнюю часть и собираться на стенках сосуда. Накопление масла на стенках сосуда делает этот материал недоступным для культуры микроорганизмов и ведёт к ошибкам при попытке измерить расход масла и экономический коэффициент культивирования. Также существует проблема, вызванная неоднородностью среды, и в следствии этого взятие репрезентативных проб на начальных стадиях культивирования на растительных маслах или жирных кислотах просто невозможно, поскольку невозможно определить подходящую глубину для отбора пробы. Бактерии при таких условиях культивирования будут расти в среде, в которой растительное масло является единственным источником углерода, однако скорость роста будет существенно ниже, чем при использовании полностью растворимых субстратов. Charles F. Buddeetal [29, 30] в исследовании обнаружили, что время лаг фазы в этих культурах было длительным и варьировалось в широких пределах. Поэтому для проведения количественных и воспроизводимых экспериментов они использовали метод выращивания культур *R. eutropha*, в котором растительное масло эмульгировалось с использованием специального химического вещества – эмульгатора. Благодаря этому методу культуры можно выращивать на растительных маслах и жирных кислотах как во встряхиваемых колбах, так и в ферmentерах.

В качестве эмульгирующих агентов обычно используют поверхностно-активные вещества (ПАВ): додецилсульфат натрия (SDS), Tween 80 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмоноолеат), (4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенил-полиэтиленгликоль), кокоилглутамат натрия.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Штамм *Cupriavidus necator* B-10646

Одним из наиболее исследуемых видов бактерий среди ПГА-продуцирующих микроорганизмов считают *Cupriavidusnecator* (ранее *Ralstoniaeutropha*, *Wautersiaeutropha* (еще ранее *Hydrogenomonas*, *Alcanigenes*, *Ralstonia*)). Штамм *Cupriavidus necator* B-10646 является одним из вариантов этого микроорганизма.

2.2 Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 500 мл, заполненных культурой на 40% объема на терmostатируемой качалке при температуре 30 °С при 120 об/мин. Для выращивания бактерий использовали фосфатный буфер следующего состава: Na₂HPO₄*H₂O 9:1 г/л; KН₂PO₄ - 1,5 г/л. Также в фосфатный буфер были добавлены следующие растворы: MgSO₄*H₂O-0,2 г/л; Fe₃C₆H₅O₇*H₂O - 0,025 г/л, NH₄Cl-1,0 г/л и раствор микроэлементов (H₃BO₃ - 0,288 г/л; CoCl₂*₆H₂O - 0,030 г/л; CuSO₄*₅H₂O- 0,008 г/л; MnCl₂*₄H₂O -0,008 г/л; ZnSO₄*₇H₂O - 0,176 г/л; NaMoO₄ - 0,050 г/л; NiCl₂ - 0,008 г/л).

В качестве эмульгаторов использовали кокоилглутамат натрия и Tween-80. Кокоилглутамат натрия - сверхмягкий высокоэффективный анионогенный ПАВ, полученный из L-глутаминовой кислоты, получаемой в промышленности микробиологическим синтезом. Путём ферментации с использованием глюкозы из крахмала, тростника или сахарной свеклы, и жирных кислот кокосового масла. Состоит из глутаминовой кислоты (72%), жирных насыщенных кислот C8-C18 (20%), олеиновой кислоты (7%), D – аланина (1%).

Tween-80 - является неионогенным поверхностью - активным веществом и эмульгатором, часто используемым в пищевых продуктах и

косметике. Это синтетическое соединение представляет собой вязкую водорастворимую желтую жидкость. Tween – 80 получают из полиэтиоксилированного сорбита и олеиновой кислоты. Состоит из олеиновой кислоты (98%), этиленгликоля и жирных кислот C14-C18 (2%). Используется в пищевой промышленности, медицине и лабораторной практике.

Концентрация добавляемых в культуральную среду эмульгаторов составляла 5 г/л. Процесс подготовки к культивированию на маслах и кислотах с данными эмульгаторами происходил следующим образом: в нестерильных условиях в колбы с фосфатным буфером добавляли основной углеродный субстрат (масло/кислота) в концентрации 10 г/л, а после – в каждую колбу эмульгаторы (Т-80/коноилглютамат натрия) в концентрации 5 г/л. Затем колбы устанавливали на магнитную мешалку или диспергатор при температуре плавления субстрата и выдерживали до полной гомогенизации раствора. Далее колбы автоклавировали при 1 атмосфере в течение 30 минут и далее начинали эксперимент по обычной схеме.

Для синтеза сополимеров, 3-гидроксивалерата (3ГВ), в колбы на 48 часу культивирования добавляли валерат калия в концентрации 1 г/л.

Периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на фотоколориметре КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и длине волны $\lambda=440$ нм.

Биомассу бактерий в культуре определяли весовым способом. Для этого аликовты бактериальной суспензии объемом 20-25 мл центрифугировали 8 мин при 6000g. Затем дважды отмывали клетки дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105 °C в сушильном шкафу в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса в пересчете на литр культуры.

2.3 Определение концентрации фруктозы

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого культуральную среду, отделенную от клеток бактерий при центрифугировании, разводили дистилированной водой в 25 раз. 1 мл пробы наливали в пробирку, куда добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 1000 мл 95%-ного этилового спирта); 3 мл раствора соляная кислота: дистиллированная вода в соотношении 5:1. В качестве контроля вместо культуральной среды использовали дистиллированную воду. Пробирки с контролем и пробой помещали на водянную баню на 20 мин, при $t=80^{\circ}\text{C}$. По истечении этого времени пробирки охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность на фотоколориметре Unico при $\lambda=540$ нм). Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику.

2.4 Определение содержания в клетках состава ПГА

Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Условия хроматографии: газ-носитель – гелий, скорость 1,2 мл/мин. Капиллярная колонка DB-35MS, длина – 30 м, диаметр – 0.25 мм. Температура ввода пробы – 220 °C; начальная температура хроматографирования – 55 °C; подъем температуры до 310 °C со скоростью 10°C/мин, изотермальный режим – 5 мин; температура детектора – 150 °C; температура источника ионов - 230°C; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными массами от 30 до 550 amu при 0,5 сек/скан. Идентификацию мономеров, образующих ПГА, проводили по масс-спектрам и временам удерживания.

Метанолиз проб полимера проводили следующим образом: к навеске сухой биомассы (3,9-4,5 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0,5 мг бензойной кислоты / 1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты и кипятили с обратными

холодильниками в течение 2 часов 40 минут. По окончании метанолиза в колбу добавляли 1мл дистиллированной воды.

Также было проанализировано остаточное содержание субстрата в среде в конце культивирования, и на основании этого рассчитан экономический коэффициент.

2.5 Выделение полимера

Для выделения полимера в пробу с культуральной жидкостью добавили 2 мл гексана и центрифугировали при 6000 оборотах в течении 8 минут. Далее осадок пробы помещали в колбы на 100 мл и добавляли 10 мл метилового спирта и 25 мл хлороформа, оставляли на 24 часа при комнатной температуре. Далее биомассу отделяли от растворителей пропусканием раствора через фильтр. Растворитель удаляли на роторном испарителе Rotavapor R-100 (США). Далее в колбы добавляли хлороформ для перерастворения полимера, и затем полимер осаждали добавлением двойного объема гексана.

2.6 Определение молекулярной массы полимера

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, полидисперсность ($\overline{P}D=M_w/M_n$).

2.7 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета MicrosoftExcel 2013 для Windows 10. Для полученных данных рассчитывались среднее, среднее квадратическое отклонение и доверительный интервал. Все расчеты проводились с учетом уровня значимости $\alpha=0,05$.

Результаты и обсуждения

[изъято 16 стр.]

Заключение

- Установлено, что Tween-80 и кокоилглутамат натрия в концентрациях выше 7 г/л и 10 г/л соответственно ингибируют рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646
- Доказано, что бактерии *Cupriavidus necator* B-10646 не используют Tween-80 и кокоилглутамат натрия в качестве углеродного субстрата
- Исследована возможность синтеза сополимеров с 3-гидроксивалератом бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 при росте на липидных субстратах с добавлением и без добавления эмульгаторов. Наибольшее накопление биомассы (8.2-9.1 г/л) и содержание полимера (71-72%) из представленных субстратов происходило при культивировании на среде, содержащей олеиновую кислоту и эмульгаторы. Содержание ЗГВ составило 21-22 мол. %
- Максимальное содержание ЗГВ (32 мол. %), 1,39 г/л получено при выращивании бактерий на среде, содержащей пальмитиновую кислоту и эмульгатор кокоилглутамат натрия

Список литературы:

1. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск: СО РАН, 2003. – 330 с.
2. Volova, T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates - plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications) / T.G. Volova // Nova Science Pub. Inc., 2004. – P.283.
3. Anderson, A.J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A.J. Anderson, E.A. Dawes // Microbiol. Rev., 1990. – V. 54. – P. 450-472.
4. Fernandez-Urrusuno, R. Development of controlled release formulations of alachlor in ethylcellulose / R. Fernandez-Urrusuno, J. M. Gines, E. Morillo // Journal of Microencapsulation – 2000. – V.17. – P.331-342.
5. Chen G. Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates/ Chen G. Q, Wu Q. // ApplMicrobiolBiotechnol., 2005. – V. 67. – P. 592–9.
6. Akiyama M., Tsuge T., Doi Y. (2003) Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. Polym.Degrad. Stab.,80:183–194
7. Loo C.Y., Sudesh K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbialplastics and their properties. Mal. Polym. J., 3:31–57
8. Steinbuchel A, Lu "tke-Eversloh T (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganism. BiochemEng J 16:81–96
9. Chee J.-Y., Tan Y., Samian M.-R., Sudesh K. (2010) Isolation and characterization of a Burkholderiasp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols. J. Polym. Environ.,18:584–592
10. Bhubalan, K., Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Yamamoto, T., Tsuge, T., Doi, Y., e al. (2008). Polymer Degradation and Stability, 93, 17–23.
11. Bhubalan K, Lee WH, Loo CY, Yamamoto T, Tsuge T, Doi Y and Sudesh K, Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-

- hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *PolymDegradStab* 93:17–23 (2008).
12. Loo C.Y., Sudesh K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbialplastics and their properties. *Mal. Polym. J.*, 3:31–57
13. Sudesh K, Doi Y (2000) Molecular design and biosynthesis of biodegradable polyester. *PolymAdvTechnol* 11:865–872
14. Sudesh K, Abe H, Doi Y (2005) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *ProgPolymSci* 25:1503–1555
15. Kessler, B., Witholt, B. Factors involved in the regulatory network ofpolyhydroxyalkanoatemetabolism // *Biotechnol.*, 2001. – V. 86. – P. 97–104.
16. Timm, A., Steinbüchel, A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990. – V. 56. – P. 3360–3367.
17. Srivastava S.K., Tripathi A.D. (2013) Effect of saturated and unsaturated fatty acid supplementation on bio-plastic production under submerged fermentation.3Biotech. 3:389-397.
18. Bhubalan K, Lee WH, Loo CY, Yamamoto T, Tsuge T, Doi Y and Sudesh K, Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *PolymDegradStab* 93:17–23 (2008).
19. Ahmad Mohammed Gumel,
BiosynthesisandCharacterizationofPolyhydroxyalkanoatesCopolymersProducedbyP seudomonasputida Bet001 IsolatedfromPalmOilMillEffluent.
ApplMicrobiolBiotechnol., 2012. – V. 67. – P. 592–9.
20. Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha C, Sinskey AJ (2011b) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstoniaeutropha* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:2847–2854
21. Bhubalan, K., Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Yamamoto, T., Tsuge, T., Doi, Y., e al. (2008). Polymer Degradation and Stability, 93, 17–23.

22. Bhubalan K, Lee WH, Loo CY, Yamamoto T, Tsuge T, Doi Y and Sudesh K, Controlled biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) from mixtures of palm kernel oil and 3HV-precursors. *PolymDegradStab* 93:17–23 (2008).
23. Riedel SL, Bader J, Brigham CJ, Budde CF, Yusof ZA, Rha C, Sinskey AJ (2012) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstoniaeutropha* in high cell density palm oil fermentations. *BiotechnolBioeng* 109:74–83
24. Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K. Production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligeneseutrophus* from butyric and pentanoic acids / *Appl. Microbiol. Biotechnol.* /1998. V. 28. P. 330-334.
25. Lee S.Y., Choi L., Han K. and Song J.Y. Removal of endotoxin during purification of poly(3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria /*Appl. Environ. Microbiol.*- 1999. V.65. P. 2762-2764.
26. Chee J.-Y., Tan Y., Samian M.-R., Sudesh K. (2010) Isolation and characterization of a *Burkholderiasp. USM* (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols. *J. Polym. Environ.*, 18:584–592
27. Marangoni C., Furigo A., de Aragdo G.M.F.(2000) Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstoniaeutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnol.Lett.*, 22:1635–1638
28. Ramachandran H, Iqbal NM, Sipaut CS and Abdullah AAA, Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp.USMAA2-4.*Appl BiochemBiotechnol* 164:867 (2011).
29. Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha C, Sinskey AJ (2011b) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstoniaeutropha* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:2847–2854
30. Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha C, Sinskey AJ (2011b) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstoniaeutropha* strains. *Appl Environ Microbiol* 77:2847–2854

31. Fukui T, Doi Y (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *ApplMicrobiolBiotechnol* 49:333–336

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

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
М. Волова Т.Г. Волова

« ____ » ____ 20 __ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез сополимеров с 3-гидроксивалератом бактериями *Cupriavidus necator*
B-10646 при росте на липидных субстратах

Научный руководитель

К.б.н., доцент

Жила Н.О.

Подпись, дата

Инициалы, фамилия

Выпускник

Подпись, дата

Ильмушкин В.С

Инициалы, фамилия

Красноярск 2020