

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



Т.Г. Волова

« ____ » _____ 20 __ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Использование твердых липидных субстратов для синтеза
полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.

Научный руководитель к.б.н Жила Н.О

Подпись,
дата



Должность,
ученая

Инициалы,
фамилия

Студент ББ16-34Б Сабирова Д.Ю

Номер группы, зачетной
книжки

Подпись,
дата



Инициалы,
фамилия

Красноярск 2020

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	3
Введение	4
1 Обзор литературы.....	6
1.1 Полигидроксиалканоаты.....	6
1.2 Роль ПГА в жизнедеятельности микробной клетки и синтез ПГА	7
1.3 Многообразие ПГА	8
1.4 Поли(3-гидроксибутират)	10
1.5 Физико-химические свойства ПГА	12
1.6 Микроорганизмы, синтезирующие ПГА	14
1.7 Экстракция полимера из микробной клетки.....	Error! Bookmark not defined.
1.8 Синтез ПГА из жирных кислот	21
1.9 Синтез ПГА из растительных масел	23
2 Материалы и методы исследования	28
2.1 Объект исследования	28
2.2 Процесс культивирования	28
2.3 Аналитические методы	29
3 Результаты и обсуждение	31
3.1 Культивирование бактерий <i>C. necator</i> В-10646 на насыщенных жирных кислотах С12-С18	31
3.2 Культивирование бактерий <i>C. necator</i> В-10646 на твердых липидных субстратах.....	Error! Bookmark not defined.
Заключение	39
Список литературных источников	33

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа на тему «Использование твердых липидных субстратов для синтеза полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* В-10646» содержит 43 страницы текстового документа, 38 использованных источников, 15 рисунков.

CUPRIAVIDUS NECATOR, ПОЛИМЕР, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, БИОМАССА, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Стоимость углеродного субстрата составляет около 40-60% стоимости полигидроксиалканоатов. Снижение себестоимости продукции полимеров возможно при использовании более дешевых источников углерода, например жирные кислоты, масла.

Целью работы было исследование роста бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез полимера на различных липидных субстратах. В задачи входило: 1) Исследовать возможность использования бактериями насыщенных жирных кислот С12-С18 в качестве единственного субстрата для роста и синтез полимера. 2) Изучить рост бактерий и синтез полимера при использовании в качестве источников углерода твердые липидные субстраты с различным жирнокислотным составом.

ВВЕДЕНИЕ

Пластики занимают значительную роль в нашей жизни и используются для множества различных целей. Современный мир сложно представить без пластиков, из них производят все спектры потребительских и промышленных товаров. Каждый год в мире производится приблизительно 140 миллионов тонн различных пластмасс. Это не удивительно, так как нефтяные пластики крайне дешевы в производстве, долговечны и обладают необходимыми для промышленных задач физико-химическими свойствами. Их используют и в медицинских целях, и в телекоммуникации, и при производстве промышленного оборудования, и как упаковочные материалы для продовольственных товаров. Сложно найти сферу человеческой деятельности, где бы сегодня не применялись пластики. Однако существует две проблемы, которые связаны с их использованием.

1) пластики, синтезируемые из нефти, не обладают биоразлагаемостью. В связи с этим происходит их накопление в окружающей среде, являющееся причиной загрязнения почвы и воды, что приводит к ряду экологических проблем вплоть до сокращения жизни человека из-за потребления частиц микропластиков с продуктами питания.

2) истощение не возобновляемого сырья (нефти), из которого и производят пластики, вследствие чего возникает необходимость разрабатывать альтернативные методы производства пластмасс.

Одним из кандидатов на роль замены обычных нефтяных пластиков могут стать полигидроксилканоаты (ПГА) - биоразлагаемые полимеры, производимые микроорганизмами, поскольку они имеют сходные физико-механические свойства и обладают свойствами биodeградации и полной биосовместимостью в сравнении с обычными синтетическими полимерами. ПГА являются природными биополимерами бактерий, которые накапливаются внутри клеток микроорганизмов в виде гранул.

Одним из перспективных направлений в этой отрасли являются исследования по поиску более эффективных с экономической точки зрения субстратов.

На данный момент при промышленном производстве ПГА используют субстраты на основе сахаров различной природы. Получаемый таким образом продукт обладает значительной стоимостью из-за высокой стоимости сахаров. В попытках сократить затраты на производство множество компаний ведут исследования по поиску более оптимальных с экономической точки зрения субстратов. На роль дешевого альтернативного источника углерода на данный момент претендуют различные масла (пальмовое, олеиновое, кукурузное и тд.) и длинноцепочечные кислоты (лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая).

В мире коммерческим биосинтезом ПГА занимается множество компаний («Bioscience Ltd.», «Metabolix Inc.», «Merck», «Tepha», «Berlin Packaging Corp.», «BioVentures Alberta Inc.» и др.), они ведут разработки технологии биосинтеза ПГА, используя разные субстраты, в том числе отходы промышленного и сельскохозяйственного производства[1].

Цель работы – исследовать рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полимера на различных липидных субстратах.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1 Исследовать возможность использования бактериями насыщенных жирных кислот C12-C18 в качестве единственного субстрата для роста и синтеза полимера.
- 2 Изучить рост бактерий и синтез полимера при использовании в качестве источников углерода твердые липидные субстраты с различным жирнокислотным составом.

1 Обзор литературы

1.1 Полигидроксиалканоаты

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот. ПГА могут свободно заменять химически синтезированные полимеры такие, как полипропилен, так как имеют аналогичные механические свойства. Их преимущество в том, что для ПГА характерны такие свойства как биодegradация и биосовместимость. Бактериальные ПГА подразделяются на 3 группы: ПГА с короткой цепью (3-5 атомов углерода), со средней длиной цепи (6-14 атомов углерода) и длинноцепочечные ПГА (более 14 атомов углерода) [3].

ПГА в природе – это биополимеры, синтезируемые бактериями как липидные включения для накопления энергии в внутри клеток в виде гранул [4].

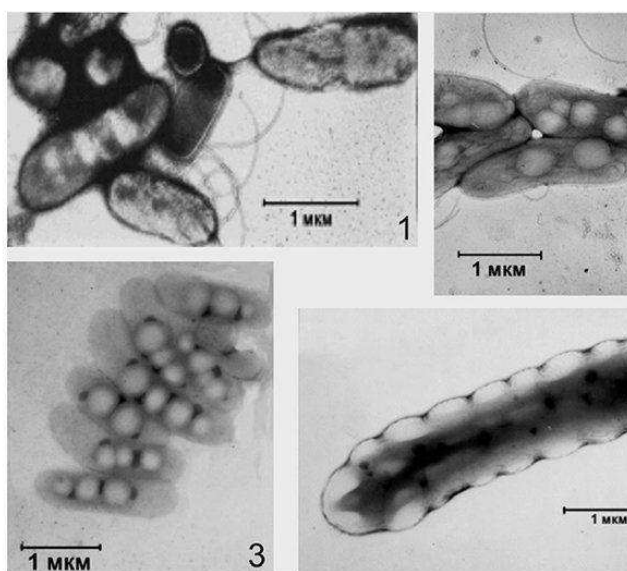


Рисунок 1.1 - Гранулы ПГА в клетках бактерий (трансмиссионный электронный микроскоп)

1.2 Роль ПГА в жизнедеятельности микробной клетки и синтез ПГА

ПГА играет ключевую роль в приспособлении микроорганизмов к выживанию при стрессе. ПГА способствует долгосрочному выживанию бактерий в условиях дефицита питательных веществ, выступая в качестве запасов углерода и энергии для не споровых и спорообразующих форм бактерий. Кроме того, бактерии, которые содержат ПГА, показали усиление устойчивости к стрессу при кратковременных воздействиях окружающей среды, таких как ультрафиолетовое (УФ) излучение, нагревание и осмотический шок.

Биосинтетические пути ПГА неразрывно связаны с центральной частью бактерий. Метаболические пути, включая гликолиз, цикл Кребса, β -окисление, синтез жирных кислот *de novo*, аминокислотный катаболизм, цикл Кальвина и сериновый путь. Многие общие промежуточные звенья также разделяются между ПГА и этими метаболическими путями, в частности, ацетил-КоА.

В условиях, богатых питательными веществами, большое количество кофермента А, производимого в цикла Кребса, блокирует синтез ПГА путем ингибирования 3-кетотиолазы (PhaA) таким образом, что ацетил-КоА направляется в Цикл Кребса для производства энергии и роста клеток [19]. И, наоборот, при несбалансированных условиях питательных веществ (то есть, таких важных питательных веществ, как азот и фосфор ограничены), уровни коэнзима А не являются ингибирующими, что позволяет направлять ацетил-КоА к синтетическим путям для накопления ПГА [19,20]. Эта стратегия метаболической регуляции позволяет микробам, накапливающим ПГА, максимизировать питательные ресурсы при их адаптации к условиям окружающей среды.

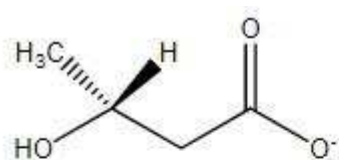
1.3 Многообразие ПГА

В целом, исходя из длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры той или иной структуры, ПГА подразделяют на три основные группы [3]:

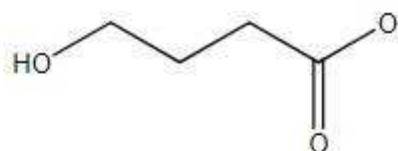
1 Короткоцепочечные – ПГА_{кц} (short-chain-length, SCL), состоящие из кислот с длинной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;

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

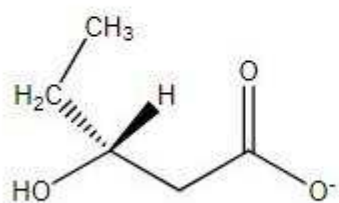
3 Длинноцепочечные – ПГА_{дц} (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот длиннее C14.[5]



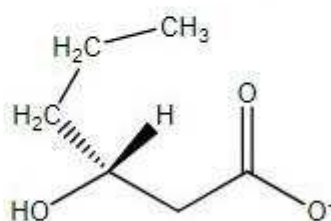
3-гидроксибутират



4-гидроксибутират



3-гидроксивалерат



3-гидрогексаноат

Рисунок 1.2 – Основные короткоцепочечные мономеры ПГА

Наиболее изученными являются короткоцепочечные ПГА – поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) и сополимеры 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом [4]

Биополимеры также могут быть разделены на различные классы [13] на основе их производства.

Полимеры, извлеченные / удаленные непосредственно из биомассы, такие как полисахариды (крахмал, целлюлоза и белки).

Полимеры, полученные микроорганизмами или генетически модифицированными бактериями. На сегодняшний день эта группа биополимеров состоит в основном из полигидроксиалканоатов, но разработки с бактериальной целлюлозой продолжаются.

Полимеры, полученные классическим химическим синтезом с использованием возобновляемых биомономеров., например, полимолочная кислота (полилактид), биополиэфир, полимеризованный из мономеров молочной кислоты.

Полимеры, полученные обычным синтезом из синтетических мономеров. Примерами являются алифатические и ароматические сложные полиэферы.

Поликапролактон, полилактид и поли(3-гидроксibuтират) и поли(3-гидроксibuтират-со-валерат) – это первые полностью биоразлагаемые синтетические полимеры, которые стали доступны на рынке с 1990 года. Как правило, эти синтетические полимеры, сырьем для которых служили натуральные ресурсы, дороже, чем полимеры получаемые на основе нефти [19].

Различные типы рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* способны синтезировать ПГА до высоких внутриклеточных уровней, а некоторые подходят для генетически опосредованных систем лизиса, чтобы облегчить высвобождение гранул ПГА. Хотя микробные пластмассы имеют явное преимущество перед обычными пластмассами на основе нефти, основным недостатком является высокая стоимость связанная с ферментативным производством.

Основные факторы, влияющие на себестоимость продукции, включают в себя источник углерода, текущие затраты на ферментацию, производительность процесса, урожайность биомассы и последующую обработку [8]. Несмотря на прекрасные свойства ПГА, они все еще не сопоставимы с пластмассами на нефтяной основе, так как затраты на их производство в 5–10 раз выше, чем у обычного пластика на основе нефтехимии, такого как полиэтилен. Стоимость углеродного субстрата является основным фактором, составляющим 50% от общего объема производства полимеров. Поэтому мировой исследовательский

интерес сосредоточен на снижение себестоимости продукции полимеров с использованием различных отходов, таких как источник углерода [7].

1.4 Поли(3-гидроксибутират)

Многие прокариоты способны накапливать резервные материалы, такие как цианофицин (резерв азота и углерода), ПГА (резерв углерода), и полифосфат (резерв фосфора) в виде инертных осмотических включений.

П(ЗГБ) является наиболее распространенным типом ПГА среди бактерий. Содержание П(ЗГБ) в клетках микроорганизмов может составлять до 90% от сухой массы клеток [12].

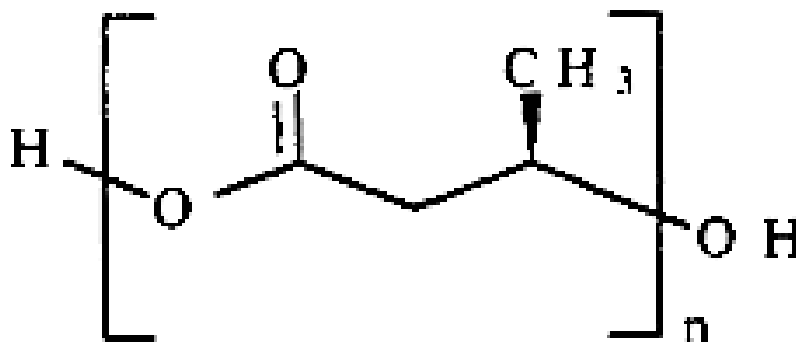


Рисунок 1.3 – Общая формула молекулы поли(3-гидроксибутирата)

П(ЗГБ) накапливается в цитоплазме бактерий в виде включений в различном количестве и размерах в зависимости от условий культивирования [35]. В процессе роста и накопления ПГА, бактериальные клетки увеличивают свою длину, но ширина остается постоянной. Таким образом, бактерии точно контролируют свои размеры и форму для того, чтобы наиболее эффективно импортировать питательные вещества.

Ralstonia eutropha, как правило, содержит 8-12 гранул/клетку, их диаметр составляет от 0,2 до 0,5 мкм.

П(ЗГБ) является наиболее распространенным типом ПГА. Биосинтез и биodeградация П(ЗГБ), а также других типов ПГА изучались в нескольких лабораториях в течение последних 25 лет [12].

Гранулы поли(3-гидроксибутирата) -это важные соединения для хранения углерода и энергии у многих прокариот, место локализации гранул - цитоплазма. В условиях ограниченного доступа питательных веществ гранулы П(ЗГБ) позволяют выживать клеткам [23]. Когда наступают более благоприятные условия для репликации, биополимеры деградируют, и освобожденная энергия и мономеры клетка использует на рост и деление [19].

Гранулы в клетке окружены мембраной, толщиной около 2 нм [4]. Они состоят из аморфного полимерного ядра, окруженного плотным белковым поверхностным слоем. Полимер и поверхностный слой представляет собой многофункциональный комплекс, для которого был предложен термин «carbonosome».

Поверхностный слой гранул П(ЗГБ) представляет собой сложноорганизованную систему, которая включает много разных компонентов. По крайней мере описано 17 белков, которые имеют важное значение для биосинтеза, хранения и внутриклеточного использования П(ЗГБ): пять белков-фазинов - PhaP1 - PhaP5, они располагаются на поверхности гранул П(ЗГБ); семь П(ЗГБ)-деполимераз (PhaZs), две ПЗГБ-гидролазы (PhaZb, PhaZc или PhaYs), регулятор белка ФАР и три главных П(ЗГБ) - биосинтетических фермента [β -кетотиолаза (PhaA), ацетоацетил-СоАредуктаза (PhaB1) и П(ЗГБ)-синтаза (PhaC1)] из phaCAB оперона [37].

Фазины - маленькие амфифильные белки, которые определяют количество и размер накопленного П(ЗГБ) [12]. Основная функция фазинов - контролирование свойств поверхности гранул ПГА. Эти белки прочно прикрепляются к гидрофобной поверхности, растущей ПГА гранулы, чтобы заблокировать связывание других белков [30].

П(ЗГБ)-синтаза (PhaC1) является ключевым ферментом синтеза П(ЗГБ) и катализирует процесс полимеризации 3-гидроксибутирил-СоА. Функция второй - каталитически неактивной - П(ЗГБ)-синтазы - PhaC2 неизвестна, но она обладает способностью связываться с П(ЗГБ) гранулами в естественных условиях. Фазины (PhaPs), в частности PhaP1, охватывают большую часть

поверхности гранул и предотвращают слипание гранул между собой. П(ЗГБ) деполимеразы (PhaZs) имеют важное значение для реутилизации (мобилизации) полимера во время голодания. Олигомеры гидролазы (PhaZb, PhaZc) участвуют в расщеплении промежуточно олигомера 3-гидроксипропионата (ЗГБ), образуемого во время мобилизации полимера. Регуляторные белки (PhaRs) регулируют экспрессию выбранных генов фазинов.

Известно много различных PhaPs, но мало известно об организации этих PhaPs на поверхности гранул ПГА. В частности, не известно, организованы они случайным образом на поверхности П(ЗГБ) или существуют конкретные белок-белковые взаимодействия между некоторыми PhaPs, которые приводят к упорядоченной структуре на поверхности [37].

1.5 Физико-химические свойства ПГА

Строение ПГА определяют их свойства, и прежде всего они зависят от строения в полимерной цепи боковых групп, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле. В ходе изучения ПГА стало ясно, что свойства этих полимеров меняются очень значительно в зависимости от типа и соотношения мономеров в полимерной цепи [5].

Таблица 1.1 – Свойства полигидроксиалканоатов различного состава

Полимер	Температура плавления °С	Температура кристаллизации, °С	Модуль Юнга, ГПа	Кристалличность, %	Прочность на растяжение, МПа
3ПГБ	179	2	3,5	70	40
3ПГБ/ПГВ:					
мол. % ГВ	170	-1	2,9	69	38
9 мол. % ГВ	162	-	1,9	62	37
14 мол. % ГВ	150	-	1,5	56	35
25 мол. % ГВ	137	-	0,7	-	30
3ПГБ/4ПГБ:					
3 мол. % 4ГБ	166	-7	-	45	28
10 мол. % 4ГБ	159	-	-	-	24
64 мол. % 4ГБ	50	-	30	-	17
90 мол. % 4ГБ	50	-	100	-	65
4-ПГБ	53	-36	149	-	104
3ПГГ/3ПГО	61		-	30	10

Молекулярная масса, одно из наиболее важных макроскопических параметров, характеризующих свойства определенных полимеров. Она же определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. На величину молекулярной массы влияют условия культивирования, метод экстракции полимера и непосредственно, тип микроорганизма-продуцента. Молекулярная масса полигидроксиалканоатов очень неустойчивый показатель. Например, у поли(3-гидроксибутирата) молекулярная масса может меняться от нескольких сотен до миллионов кДа с полидисперсией от 2,3 до 3,2 [5].

Термомеханические свойства полимера определяют его способность кристаллизироваться в нативном состоянии. Величина данного параметра заметно различается для каждого отдельного типа полимера в зависимости от состава сополимеров. Некоторые ПГА, в том числе и поли(3-гидроксибутират), не могут находиться в газовом состоянии. Это связано с тем, что небольшое увеличение температурного воздействия приводит к сильной деформации материала. Поэтому был определен основной тип агрегатного состояния полимеров - конденсированное состояние (кристаллическое, стеклообразное,

жидкое и вязко-текучее) [5]. Температура плавления полимеров отличается в зависимости от фракции определенного компонента в полимере [3].

1.6 Организмы, синтезирующие ПГА

Признак биоаккумуляции ПГА широко распространен среди бактериальных и архейных доменов, встречающиеся более чем в 70 бактериальных и архейных родах [4]. Биоаккумуляированные ПГА хранятся в виде внутриклеточных липидных гранул в этих микробных клетках [4].

До настоящего времени известно более 300 микроорганизмов, синтезирующих полигидроксиалканоаты. Но для промышленного использования используются и изучаются, следующие штаммы: *Cupriavidus necator*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, несколько штаммов метилотрофов и трансгенные штаммы *Escherichia coli*, *Cupriavidus necator*, *Klebsiella aerogenes*. Именно эти виды обладают свойствами, необходимыми для промышленного производства биопластиков [2].

Бактерии, способные продуцировать и накапливать ПГА в клетке могут быть разделены на две группы. К первой группе относятся бактерии, которым для накопления ПГА нужны условия ограничения питательных веществ, таких как фосфор, азот, кислород или магний; они не накапливают ПГА во время фазы роста. Ко второй группе относятся бактерии, накапливающие ПГА во время фазы роста, и не требующие ограничения питательных веществ. Например, бактерии *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* относятся к первой группе, в то время как рекомбинантная кишечная палочка относится ко второму.

Различные бактерии производят разные типы ПГА. Например, хорошо известно, что флуоресцентные штаммы *Pseudomonas* накапливают mcl-ПГА, они имеют mcl-ПГА-синтазы для синтеза ПГА, содержащих 6–14 атомов углерода.

Pseudomonas putida имеет тенденцию синтезировать ПГА путем включения различных функциональных групп, таких как фенил, фенокси, олефин, галогены, алкилы и сложные эфиры при выращивании на субстратах, содержащих соответствующие химические структуры [9].

Cupriavidus necator – типичный модельный организм, синтезирующий ПГА. Этот организм является наиболее изученным. Микроорганизмы этого вида могут накапливать до 80-90% поли(3-гидроксибутирата) (ПЗГБ) на простом углеродном субстрате при лимитировании фосфором, азотом или кислородом [3, 30]. *Cupriavidus necator* – это перспективный продуцент, так как он аккумулирует ПГА даже на отходах промышленных и сельскохозяйственных производств [19].

Существуют бактерии синтезирующие и накапливающие одновременно несколько типов ПГА. К таким видам относятся *Pseudomonas* sp. 61-3. Этот микроорганизм синтезирует два типа ПГА: поли(3-гидроксибутират) – ПГА1, и поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксиалконат) (ПГА2). ПГА1 является гомополимером, а ПГА2 – гетерополимером, состоящим из 3 гидроксиалконоатных единиц, содержащих 4-12 атомов углерода. При помощи электронной микроскопии было обнаружено, что в *Pseudomonas* sp. 61-3, ПГА1 и ПГА2 накапливаются в виде различных гранул в одной и той же клетке [30].

Кроме *Cupriavidus necator* и *Pseudomonas* sp., ПГА накапливают *Caryophanon latum* [22], *Rhodococcus rubber*, *Acinetobacter* sp., *Chromatium vinosum*, *Bacillus megaterium*, *Paracoccus denitrificans* [30], *Rhizobium metli* [15] и многие другие.

Накопление ПГА наблюдается и у грамотрицательных экстремофильных бактерий. Эти бактерии накапливают ПГА в уникальных условиях культивирования с высокой соленостью или при повышенной температуре. Галофильный *Halomonas boliviensis* LC1 (DSM 15516) может расти и производить 56% scl-ПГА из гидролизата крахмала в умеренно солевых условиях (0,77 М NaCl) [6], в то время как термофильный *Thermusthermophilus* HB8 (ATCC 27634) синтезировал до 35,6% сополимера scl-mcl-ПГА из

сыворотки при высокой температуре культивирования 70 °С [16]. По сравнению с другими грамотрицательными бактериями экстремофилы выгодны с точки зрения их более низкого спроса на стерильность, а также их высокого потенциала для непосредственного применения при росте на отходах производства.

Однако основной проблемой грамотрицательных бактерий является наличие липополисахарида (ЛПС), эндотоксинов в наружной клеточной мембране бактерий, которые могут совместно очищаться с неочищенным полимером ПГА в процессе экстракции [7]. Эндотоксин ЛПС является пирогеном, который может вызывать сильный воспалительный процесс [10], что делает полимер ПГА неподходящим для биомедицинского применения. Удаление ЛПС, эндотоксина может быть достигнуто обработкой полимера ФГА окислителями (то есть натрием гипохлорита и NaOH, озоном, пероксидом водорода и бензоилпероксидом), с многократной экстракцией растворителем с последующей очисткой активированным углем [7,3,10]. Однако эти методы увеличивают общую стоимость производства ПГА и приводят к изменениям в самих молекулах ПГА и свойствах полимера (то есть снижение молекулярной массы и увеличение полидисперсности).

Производство ПГА в грамположительных бактериях было зарегистрировано в родах *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* [4]. По сравнению с грамотрицательными бактериями грамположительные бактерии в основном синтезируют scl-ПГА с более низкими выходами ПГА, примерно от 2 до 50%, поэтому грамположительные бактерии еще не приняты для коммерческого производства ПГА. Ранее сообщалось о высоком содержании scl-ПГА, составляющем 82%, для *Streptomyces* sp. (ATCC 1238). Некоторые штаммы микроорганизмов способны синтезировать сополимеры mcl-ПГА или scl-mcl-ПГА. В той же бактерии, образование исключительно mcl-ПГА (48%) наблюдали при культивировании на октановой кислоте в отсутствие источника азота.

Несмотря на то, что в целом в грамположительных клетках накапливается меньшее количество ПГА, они полезнее грамотрицательных бактерий из-за отсутствия у них ЛПС, что может сделать их лучшим источником ПГА как сырья для биомедицинских применений.

ПГА также обнаружен у архей, но до настоящего времени его открытие было ограничено галоархеальными видами, а именно родами *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* и *Natronorubrum*.

Сообщалось, что *Haloarchaea* синтезирует ПГА из глюкозы, летучих жирных кислот и других веществ, сложных источников углерода, такие как крахмал, сывороточный гидролизат, сырой глицерин. [9].

В настоящее время лучшим производителем ПГА является *Haloferax mediterranei* (DSM 1411). Для его роста требуется NaCl и он может накапливать высокие уровни ПГА между 50 и 76% [9]. *H. mediterranei* (DSM 1411) может быть привлекательным кандидатом для производства ПГА.

Однако когда по сравнению с умеренно галофильными бактериями, такими как *H. boliviensis* LC1 (DSM 15516), экстремальная соленость, требуемая галоархеям, может стать препятствием для производства ПГА, поскольку высокая концентрация соли требует более высокую химическую стоимость и ускоряет коррозию ферментеров из нержавеющей стали, тем не менее, галоархеи имеют преимущество перед галофильными бактериями в легкости экстракции ПГА. Экстракция ПГА из галофильных бактерий обычно требует использование химического, ферментативного или механического метода для разрушения клеточной стенки и высвобождения внутриклеточных гранул ПГА, и эти методы могут составлять до 50% или более от общей себестоимости производства ПГА. Растворители для экстракции, такие как хлороформ и ацетон, также представляет потенциальную опасность для окружающей среды в случае неправильного использования и утилизации. Тогда

как галоархеи подвергаются лизису клеток в дистиллированной воде и выделяют гранулы ПГА, которые могут быть выделены с помощью низкоскоростного центрифугирования [17]. Это делает процесс выделения ПГА из галоархей относительно легким, менее химически и энергоемким процессом, который приводит к снижению затрат на добычу ископаемых и снижает вредное воздействие на окружающую среду.

1.7 Экстракция полимера из микробной клетки

Поскольку ПГА хранятся в клетках, способы извлечения биополимера являются сложными и дорогостоящими. Существуют различные методы, описанные в литературе по выделению и последующей переработке ПГА, каждый метод связан с некоторыми преимуществами и недостатками. Широко используемые методы восстановления упомянуты ниже.

Извлечение растворителем является наиболее часто используемым методом для извлечения ПГА из-за его простоты и удобства эксплуатации. Он включает в себя следующие шаги; предварительная обработка, чтобы разорвать клетки так, чтобы гранулы ПГА стали доступными, а затем, делая эти гранулы растворимыми в подходящем растворителе с последующим осаждением нерастворителем. Хлорированные растворители часто используются для солюбилизации ПГА из разорванной клеточной биомассы, включая хлороформ, 1,2-дихлорэтан, ацетон, 1,2-пропиленкарбонат и этиленкарбонат. Ацетон обычно предпочтительнее для *mc1*-ПГА. Метанол или этанол в охлажденном виде используется в качестве нерастворителя для осадков. Используется экстракция растворителем, когда требуется высокая чистота, поскольку она не разлагает полимер и также удаляет эндотоксины из клеток. Кроме того, 1,2-пропиленкарбонат является предпочтительным растворителем из-за его более низкой токсической природы по сравнению с другими. В исследовании, в основном включающем экстракцию полигидроксиоктаноатов с использованием

различных растворителей, таких как тетрагидрофуран (ТГФ), 2-пропанол, гексан, этилацетат, ацетон и метиленхлорид; наиболее эффективным растворителем был метиленхлорид - при комнатной температуре дающий около 86% (вес / вес) извлечения полимера. Ацетон и этилацетат показал примеси менее 10% и последующее осаждение с метанолом привело к высокой чистоте полимера (почти 100%).

За исключением 2-пропанола, все используемые растворители обеспечивали эффективное выделение mcl-ПГА из бактериальной биомассы с практически 100%-ной чистотой. При температуре около 50 °С н-гексан показал хорошую экстракцию, но при понижении температуры до 40 °С выделение уменьшилось, но продукт содержал меньше эндотоксина.

Микробный ПГА хранится в виде нерастворимых внутриклеточных гранул. Методы экстракции ПГА обычно включают лизис клеточной стенки / клеточной мембраны, солубилизацию и очистку компонента ПГА, и осаждение полимера ПГА.

Из всех методов извлечения полимера из клетки экстракция растворителем является наиболее устоявшейся и широко используемой для получения полимера ПГА из биомассы благодаря своей высокой чистоте. Растворители хлороформ, метиленхлорид или 1,2-дихлорэтан оценивали на извлечение ПЗГБ при различных условиях (хлороформ: 61 °С, 1 час; метиленхлорид: 40 °С, 24 часа; и 1,2-дихлорэтан: 83 °С, 0,5 ч). После экстракции растворителем клеточный дебрис удаляли фильтрованием и раствор концентрировали с помощью роторного испарителя до осаждения полимера ПЗГБ путем добавления по каплям ледяного этанола. Наблюдалось, что хлороформ и 1,2-дихлорэтан достигают высокого уровня извлечения ПЗГБ (68%) с высокой чистотой (от 96 до 98%) по сравнению с метиленхлоридом (степень извлечения: 25%, чистота: 98%)

Был разработан новый метод экстракции scl-ПГА ацетоном «scl-ПГА anti-растворитель» при повышении температуры и давления в замкнутой системе, объединяющей компоненты для экстракции, фильтрации, и получении

продукта. Качество экстрагированных ацетоном сложных полиэфиров не показало существенных различий с полимером, экстрагированным хлороформом, обеспечивая многообещающую замену с точки зрения отсутствия негативного влияния на структурные особенности биополиэфира [14]. Преимущество экстракции растворителем заключается в его высокой чистоте восстановления ПЗГБ, однако есть много опасения по поводу высокой стоимости эксплуатации, а также негативного воздействия на окружающую среду, вызванного образованием опасных отходов. Одним из способов минимизации этой проблемы является использование отработанных растворителей для извлечения ПЗГБ. Это было продемонстрировано в Бразилии, где пилотное производство ПЗГБ на сахаре из сахарного тростника было интегрировано с экстракцией полимера, таким образом, выполнимо решение для достижения высокой чистоты ПЗГБ при меньших затратах на окружающую среду.

Метод расщепления является хорошо зарекомендовавшей себя альтернативой экстракции растворителем для извлечения ПГА. При химическом расщеплении гипохлорит натрия используется для солюбилизации не-ПЗГБ биомассы, таким образом, достигая разделение содержания ПЗГБ, которое можно извлечь центрифугированием.

По сравнению с экстракцией растворителем и химическим расщеплением ферментативное расщепление требует более мягких условий эксплуатации при достижении незначительной деградации продукта [14]. Рост биомассы был приостановлен в специализированном буфере и инкубировали при определенной температуре, которая была оптимизирована для ферментативной деятельности. После ферментативного гидролиза полимер ПЗГБ выделяли центрифугированием. С помощью этого метода можно достичь чистоты до 90% [14]. Методы восстановления ПГА на основе ферментов являются более безопасными с точки зрения эксплуатации, представляют меньший риск для здоровья и имеют более низкое воздействие на окружающую среду. Тем не

менее, высокая стоимость ферментов может привести к увеличению общей стоимости.

1.8 Производство ПГА из жирных кислот

Известно, что уровень токсичности жирной кислоты связан с концентрацией этой жирной кислоты и размером ее углеродной цепи [30]. Действительно, жирные кислоты с более короткими n-алкильными цепями проявляют более высокую токсичность, чем более длинные цепи [36]. С другой стороны, длинноцепочечные жирные кислоты преимущественно действуют как субстраты для реакций ацилирования фосфолипидов [32] при высокой скорости метаболизма β -окисления на стадии экспоненциального роста.

Исследования Lee & Choi (1999) [21] показали, что при использовании пропионовой кислоты в качестве индуктора, синтезируется П(ЗГБ-со-ЗГВ). Олеиновую кислоту использовали в качестве добавок в культурах генетически модифицированных *Escherichia coli*, в результате чего накопление П(ЗГБ-со-ЗГВ) увеличивалось.

Chee et al в своей работе [27] исследовали влияние различных концентраций жирных кислот на рост клеток и продукцию ПГА выделенного изолята *Burkholderia sp.* USM (JCM15050), которые определяли путем подачи индивидуальной жирной кислоты в качестве единственного источника углерода. Насыщенная стеариновая кислота ($C_{18:0}$) и ненасыщенная олеиновая кислота ($C_{18:1}$) продуцировали различные количества П(ЗГБ), в результате чего первая приводила к получению 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, которое является возобновляемым и дешевым источником углерода.

К тому же известно, что олеиновая кислота является перспективным субстратом для синтеза полимера. Marangoni et al. (2000) [18] 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 пределах 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 ПГА 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 предполагают, что двойная связь жирных кислот увеличивает скорость ферментативной реакции при накоплении ПГА. Олеиновая кислота, будучи прекурсором синтеза ацетил-КоА, оказывает значительное влияние на ЦТК, который 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) [11] 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.

1.9 Производство ПГА из растительных масел

Несмотря на то, что жиры и масла являются возобновляемыми и недорогими сельскохозяйственными продуктами, работ, описывающих использование жиров и масел для производства ПГА, достаточно мало.

Эффективное накопление П(ЗГБ-со-ЗГГх) с использованием рекомбинантных штаммов *R. eutropha* от 72 до 87% от сухого веса клеток на различных растительных маслах (соевое, оливковое, кукурузное, пальмовое и пальмоядровое) было показано несколькими исследовательскими группами [31, 24, 34, 25,]. ПГА-синтазы, используемые в этих исследованиях, представляют собой ферменты с широкой субстратной специфичностью, которые могут включать как sc1, так и mc1 мономеры в конечный полимер. Однако концентрация ЗГГх в полимере была низкой, всего лишь 2-5 мол. %.

Еще в 1998 году Fukui and Doi [31] в своей работе исследовали рост и накопление ПГА бактерией *Alcaligenes eutrophus* H16 на растительных маслах, таких как оливковое, кукурузное и пальмовое в качестве углеродных субстратов. Природный штамм H16 хорошо рос на этих возобновляемых углеродных ресурсах (3,6-4,3 г/л от веса сухой биомассы клеток) и эффективно накапливал гомополимер П(ЗГБ) с высоким содержанием 79-82 % от сухого веса биомассы. Кроме того, был получен сополимер П(ЗГБ-со-ЗГГ) рекомбинантным штаммом *Alcaligenes eutrophus* 4/pJR-DEE32d13 с высоким содержанием ПГА 76-81%. Результаты показали, что растительные масла являются хорошими источниками углерода для получения сополимера П(ЗГБ-со-ЗГГ), содержащего небольшое количество фракций ЗГГх-единиц (4-5 мол. %) в клетках рекомбинантного штамма *A. eutrophus*. К тому же бактерия *A. eutrophus* секретировала липазу в культуральную среду, когда оливковое масло было подано в качестве единственного источника углерода. Предполагалось, что внеклеточная липаза гидролизует триглицерины в среде, а полученные жирные кислоты поступают в клетки и метаболизируются в ацетил-КоА в путь β-окисления жирных кислот. Среди различных типов ПГА сополимер П(ЗГБ-

со-3ГГх) был идентифицирован как коммерчески привлекательный биополимер. Авторы сообщают, что способность эффективно производить этот сополимер из дешевых и возобновляемых источников углерода станет определяющим фактором его успешной коммерциализации.

В своем исследовании Loo et al (2005) [24] использовали продукты пальмового масла (пальмоядровое, сырое пальмовое и пальмовый олеин). Пальмовое масло по-прежнему считается относительно новым источником углерода, но лишь несколько работ отметили его потенциальную роль в производстве ПГА. Loo et al [24] обнаружили, что пальмоядровое масло является отличным источником углерода для синтеза больших количеств П(3ГБ-со-3ГГх) рекомбинантной *W. eutropha*, содержащей ген ПГА-синтазы *A. caviae*. Нужно отметить, что пальмоядровое и пальмовое масла сильно различаются по составу жирных кислот и характеристикам. Пальмоядровое масло богато насыщенными жирными кислотами, такими как C_{12:0} и C_{14:0}, в то время как пальмовое масло богато ненасыщенными жирными кислотами, такими как C_{18:1}, C_{18:2} и следовыми количествами C_{18:3}. Было сообщено, что клетки *W. eutropha* усваивали C_{18:3} хуже по сравнению с C_{16:0}, C_{18:1} и C_{18:2}[48]. Исследование Looetal [24] впервые показало, что пальмоядровое масло является отличным источником углерода для производства клеточной биомассы и П(3ГБ-со-3ГГх) рекомбинантной *W. eutropha*. Другие продукты пальмового масла также поддерживали синтез П(3ГБ-со-3ГГх) с постоянным составом молярной фракции 3ГГх. 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.

Mifune et al. (2010 г.) [34] смогли получить мутантным штаммом *Wautersia eutropha*, в котором находился ген синтазы ПГА *Aeromonas caviae*, этот сополимер, содержащий более высокий уровень 3ГГх (до 9,9 мол.%) вместе с высоким содержанием ПГА 79% от сухого веса биомассы клеток из

соевого масла. Исследователи отмечают, что более высокие концентрации ЗГГх могут быть достигнуты только путем добавления среднецепочечных жирных кислот, хотя это было бы нежелательным из-за стоимости этих углеродных субстратов. Эти авторы также смогли получить сополимеры с высоким содержанием ЗГГх до 26 мол.% из соевого масла с использованием штамма, содержащего делецию *phaB1*. Данные штаммы продуцировали ПГА с более высоким содержанием ЗГГх при выращивании на соевом масле по сравнению с октаноатом, но накапливали намного меньше ПГА [34]. В другом исследовании штамм Re2160/pCB113 продуцировал П(ГБ-со-ГГх), содержащий чрезвычайно высокие уровни ЗГГх (до 62 мол.%) в полученном сополимере, когда клетки выращивали на упомянутых выше растительных маслах дополнительно с кокосовым маслом и пальмовым олеином в качестве единственного источника углерода [26, 25].

Помимо эффективного накопления ПГА от сухого веса биомассы клеток, как описано выше, для экономичного процесса производства этих биопластиков требуется высокая общая производительность ПГА. Kahar et al. (2004) [33] произвел 95,5 г/л П(ГБ-со-ГГх) из соевого масла. Ферментацию инициировали соевым маслом 20 г/л и 0,4% хлорида аммония. Соевое масло и хлорид аммония подавали периодически в культуру после достижения ими начальных концентраций. Культуральная среда включала антибиотик-канамицин для стабильной поддержки плазмиды, содержащей ген, кодирующий ПГА-синтазу (*phaC Ac*) с широкой субстратной специфичностью от *A. caviae*.

Культивирование с высокой плотностью клеток при использовании пальмового масла в качестве единственного источника углерода для биосинтеза П(ГБ-со-ГГх) были выполнены Riedel et al. (2012) [28]. В этих экспериментах получали до 140 г/л от сухого веса клеток с содержанием ПГА 73%, содержащим 19 мол.% ЗГГх. 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. Снижение молекулярной массы ПГА могло быть результатом метаболизма глицерина, который высвобождается при использовании триацилглицеринов (ТАГ) в культуре, содержащей масло [25]. Глицерин функционирует в качестве агента переноса цепи во время полимеризации ПГА, что приводит к получению полимера с более низкой молекулярной массой, когда глицерин присутствует в культуральной среде.

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 [29]. Растительные масла традиционно используются в пищевой промышленности, но они также могут быть химически переработаны в другие продукты, такие как топливо, химикаты и полимеры [38, 29].

Используя метод экстракции липидов, Budde et al. (2011a) [20], Riedel et al. (2012) [28] показали профиль потребления липидов и распределение жирных кислот остаточных липидов в процессе ферментации пальмового масла с высокой концентрацией клеток. Данные показали, что сначала расщепляются ТАГ, затем ДАГ (диацилглицерины) и МАГ (моноацилглицерины). Соотношения остаточных жирных кислот оставались постоянными в процессе культивирования, что указывало на то, что различные свободные жирные кислоты (СЖК), расщепленные от ТАГ, потребляются почти с равной скоростью. Однако после прекращения подачи пальмового масла пропорции некоторых жирных кислот в остаточных липидах изменялись. Эти данные свидетельствуют о том, что *R. eutropha* предпочитала ненасыщенные жирные кислоты, так как в среде наблюдалось накопление возрастающей доли стеариновой кислоты ($C_{18:0}$, в 5 раз), а также соответствующие уменьшающиеся

концентрации олеиновой кислоты ($C_{18:1}$, в 1,3 раза) и линолевых кислот ($C_{18:2}$, в 4 раза).

В некоторых исследованиях также была изучена возможность использования бактерий для биологического превращения растительных масел и жирных кислот в топливо (Kalscheuer et al. 2006), поверхностно-активные вещества (Rahman et al. 2002; Kim et al. 2006), полигидроксиалканоаты [15] и другие. Чтобы использовать растительные масла, бактерии выделяют липазы, которые катализируют высвобождение жирных кислот из ТАГ (Jaeger et al. 1999). Затем жирные кислоты транспортируются в клетку, где они катаболизируются через цикл β -окисления (DiRusso et al. 1999). Некоторые бактерии также синтезируют поверхностно-активные вещества, которые могут увеличивать площадь поверхности и биодоступность гидрофобных источников углерода, обеспечивая более эффективный рост этих соединений (Rosenberg and Ron 1999).

2 Материалы и методы исследования

2.1 Объект исследования

Штамм *Cupriavidus necator* В-10646.

Штамм *Cupriavidus necator* В-10646 является одним из вариантов, выделенных из культуры глюкозоусваивающего штамма *Ralstonia eutropha* В-8562 (штамм получен в результате длительной селекции штамма В5786 на средах с единственным источником углерода – глюкозой, депонирован в ВКПМ) в процессе длительной многоступенчатой селекции по эффективности синтеза многокомпонентных ПГА, образованных мономерами с различной длиной углеродной С-цепи, на ростовой среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу или смеси органических кислот. Штамм в отличие от прототипа устойчив к воздействию более высоких концентраций токсичных субстратов.

2.2 Процесс культивирования

Выращивание бактерий проводили на солевой среде Шлегеля: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, NH_4Cl – 1, 0 (г/л). Микроэлементы вносили в среду из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 0,228, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, NiCl – 0,008 (г/л).

Инокулят получали в строго стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) в стеклянных колбах объемом 0,5 л с коэффициентом заполнения 1/2 при 30 °С и 200 об/мин. (Рис.3). Для выращивания бактерий за основу принята солевая среда Шлегеля.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025; NH_4Cl – 1 (г/л).

В качестве углеродных субстратов использовали лауриновую, миристиновую кислоты (концентрация 15-20 г/л), пальмитиновую и стеариновую кислоты (10-15 г/л), а также свиной жир (10-15 г/л), маргарин, а также спред (10-15 г/л).

Микроэлементы добавляли по прописи Хоаглана из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 литр среды [3]. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 0,228; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NiCl_2 – 0,008 (г/л). Концентрации MgSO_4 составляла 3г/ 200мл, концентрация NH_4Cl 10г/100мл

2.3 Аналитические методы

Изменение биомассы клеток в процессе роста культуры регистрировали оптическими показателями культуры. Для измерения оптической плотности периодически отбирали пробы культуры, использовали фотоколориметр 1 мл пробы + 5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешать (пипетировать). Разбавленную пробу налить в кювету на 1 мм и измерить в фотометре «UNICO 2100». В качестве контроля использовать дистиллированную воду. Измерения проводить при длине волны 440 нм. Если оптическая плотность больше 1, то необходимо измерять в разведении 1:20. 0,5 мл пробы + 10 мл дистиллированной воды, пипетировать. Контроль - дистиллированная вода, кювета – 1мм и длинна волны – 440 нм.

Концентрацию клеток X, г/л, регистрировали весовым способом. Для этого необходимо взять бактериальную суспензию, объемом 10-25 мл, центрифугировать 10 мин при 6000 об/мин; дважды отмыть клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировать. Отмытые клетки переносили в бюксы, заранее доведенные до постоянного веса. Пробы

высушить при температуре 105 оС в течение суток, охладить в эксикаторе и взвесить. Биомассу бактерий в культуре определить как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

Приготовили смесь из метанола и концентрированной серной кислоты (19:1 мл соответственно) и добавили по 1 мл в колбы к экстрагированным липидам. Затем добавили в каждую колбу по одной капле бензола и поставили на водяную баню при температуре 900С с обратным холодильником с целью получения метиловых эфиров жирных кислот. Длительность метанолиза составила 2 ч. В течение этого времени необходимо наблюдать за температурой в бане, целостью колб. По окончании процесса сняли колбы, добавили 1 мл дистиллированной воды и 2 мл гексана. Затем перелили смесь в делительную воронку, добавили 10 мл дистиллированной воды, слили из воронки нижний водный слой, повторно добавили и слили 10 мл дистиллированной воды. Верхний слой, состоящий из гексана с растворенными метиловыми эфирами ЖК, пропустили через слой Na_2SO_4 в грушевидную колбу, затем испарили гексан на роторном испарителе. Готовые метиловые эфиры ЖК хранили в морозильной камере непосредственно до проведения газовой хроматографии.

[изъято 8 страниц]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была исследована способность бактерий штамма *Cupriavidus necator* В-10646 расти и синтезировать полимер на различных липидных субстратах.

- 1 Исследовано накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 при использовании в качестве единственного источника углерода насыщенных жирных кислот, содержащих 12, 14, 16 и 18 атомов углерода. Показано, что наилучшими углеродными субстратами были лауриновая (С12) и миристиновая (С14) жирные кислоты. Концентрация биомассы и содержание полимера составили соответственно $6,7 \pm 0,47$ г/л $75 \pm 7,5$ % для лауриновой к-ты и $6,5 \pm 0,78$ г/л $74 \pm 3,7$ % для миристиновой к-ты.
- 2 Исследован рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез полимера на твердых липидных субстратах (маргарин, спред, свиной жир), различающихся жирнокислотным составом. Показано, что бактерии росли и синтезировали полимер на всех субстратах. Максимальная концентрация биомассы $6,1 \pm 0,43$ г/л и содержание полимера $62 \pm 2,48\%$ получены при росте на маргарине.
- 3 Исследован жирнокислотный состав липидных субстратов и потребление жирных кислот бактериями в ходе культивирования. Показано, что в первую очередь бактерии использовали полиеновые кислоты, а также насыщенные жирные кислоты, содержащие 12 и 14 атомов углерода, содержание которых к концу культивирования снизилось в несколько раз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Андреев Л.В., Склифас А.Н. О хемотаксономических аспектах липидного обмена бактерий. /В сб. Биохимия и биофизика микроорганизмов. /Межвузовский сб., серия биол., / - Горький - 1977, №5. - С. 3-9
- 2 Алимов Е.К. Аствацатурьян А. Т. Биосинтез и окисление жирных кислот нормального строения с нечетным числом атомов С, разветвленных и циклопропановых./Успехи современной биологии/1973, в т. 76, № I (4). – С.34-53
- 3 Васюренко З.П. Циклопропановые жирные кислоты микроорганизмов/Успехи современной биологии/1980, в т. 90, №2. - С. 179-192
- 4 Воронова Е.А. Паничев А.В. Сопоставление спектров жирных кислот бактерий семейства *Vibrionaceae* с помощью метода численного анализа./Биохимия и биофизика микроорганизмов./ - Горький – 1983, №II – С.62-68, 107
- 5 Заварзин Г. А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии./ М.: Наука/ 1978, С. 204
- 6 Заварзин Г. А., Жилина Т.Н. Миксобактерии в культурах водородных бактерий /Микробиология/ 1971, том 40 – С. 407-412
- 7 Калачева Г.С., Трубачев И.Н. Липиды водородных бактерий // В сб.: Хемосинтез в непрерывной культуре. /- Новосибирск/- Наука, 1978. С. 89-96
- 8 Кеслер Т.Г., Вебер М.И., Войтович Я. В. Потребности водородных бактерий на различных источниках азота.//В кн. :Непрерывная культура водородокисляющих бактерий как средство биосинтеза белка. //-Красноярск//- 1974, С. 28-45
- 9 О'Лири. Липиды микроорганизмов./Молекулярная микробиология./ Мир/- 1977, С.201-239
- 10 Пинчук Л.М., Соколова К.Я. О значении профилей жирных кислот в таксономии энтеробактерий. /Биохимия и биофизика микроорганизмов/ - Горький/-1983, №II, С.53-58

- 11 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 Biochem Biotechnol* 164:867 (2011).
- 12 Hassan MA, Nawata O, Shirai Y, Rahman NAA, Yee PL, Bin Ariff A, Ismail M, Karim A (2002) A proposal for zero emission from palm oil industry incorporating the production of polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent. *J Chem Eng Jpn* 35:9–14
- 13 Anderson AJ, Dawes EA (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Mol Biol Rev* 54:450–472
- 14 Ahn W.S., Park S.J., Lee S.Y. (2001) Production of poly(3 hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol.Lett.*,23:235–240
- 15 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
- 16 Thiele O.W., Thiele C. Lipid patterns of various hydrogen oxidizing bacterial species /*Biochem. Sys. Ecol*/ -1977. V.5. P. 1-6.
- 17 Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and their industrial applications. An overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2004, 118,155-170.
- 18 Marangoni C., Furigo A., de Aragdo G.M.F.(2000) Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. *Biotechnol.Lett.*, 22:1635–1638
- 19 Brigham CJ, Speth DR, Rha C, Sinskey AJ (2012) Whole genome microarray and gene deletion studies reveal regulation of the 1480 *Appl Microbiol Biotechnol* (2014) 98:1469–1483 polyhydroxyalkanoate production cycle by the stringent response in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 78:8033–8044

- 20 Budde CF, Riedel SL, Hübner F, Risch S, Popovic MK, Rha C, Sinskey AJ (2011a) Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1611–1619
- 21 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
- 22 Bhubalan, K., Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Yamamoto, T., Tsuge, T., Doi, Y., e al. (2008). *Polymer Degradation and Stability*, 93, 17–23.
- 23 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).
- 24 Loo C.Y., Lee W.H., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K. (2005) Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnol.Lett.*, 27:1405–1410
- 25 Tsuge T, Saito Y, Kikkawa Y, Hiraishi T, Doi Y (2013) Biosynthesis and compositional regulation of poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3- hydroxyhexanoate)] in recombinant *Ralstonia eutropha* expressing mutated polyhydroxyalkanoate synthase genes. *Macromol Biosci* 4:238–24
- 26 Steinbuchel A, Lu tke-Eversloh T (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganism. *Biochem Eng J* 16:81–96
- 27 Chee J.-Y., Tan Y., Samian M.-R., Sudesh K. (2010) Isolation and characterization of a *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) capable of producing polyhydroxyalkanoate (PHA) from triglycerides, fatty acids and glycerols. *J. Polym. Environ.*, 18:584–592
- 28 Riedel SL, Bader J, Brigham CJ, Budde CF, Yusof ZA, Rha C, Sinskey AJ (2012) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnol Bioeng* 109:74–83

- 29 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.
- 30 Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids / *Appl. Microbiol. Biotechnol.* /1998. V. 28. P. 330-334.
- 31 Fukui T, Doi Y (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:333–336
- 32 Fujita Y, Matsuoka H, Hirooka K (2007) Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol Microbiol* 66:829–839
- 33 Kahar P, Tsuge T, Taguchi K, Doi Y (2004) High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polym Degrad Stab* 83:79–86
- 34 Mifune J, Nakamura S, Fukui T (2010) Engineering of pha operon on *Cupriavidus necator* chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. *Polym Degrad Stab* 95:1305–1312
- 35 Galbraith L., Jonsson M.H., Rudhe L. C., Wilkinson S.G. Lipids and fatty acids of *Burkholderia* and *Ralstonia* species / *FEMS Microbiol. Lett.*/- 1999. V. 173. P. 359-364.
- 36 Green PR, Kemper J, Schechtman L, Guo L, Satkowski M, Fiedler S, Steinbüchel A, Rehm BH (2002) Formation of short chain length/ medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid beta-oxidation inhibited *Ralstonia eutropha* .*Biomacromolecules* 3:208–213
- 37 Guncheva, M.; Zhiryakova, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 68, 1-21.
- 38 Hill, A.; Jonzo, M.D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, 26, 421–430.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой



Т.Г. Волова

« ____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Использование твердых липидных субстратов для синтеза
полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.

Научный руководитель к.б.н Жила Н.О

Подпись,
дата



Должность,
ученая

Инициалы,
фамилия

Студент ББ16-34Б Сабирова Д.Ю

Номер группы, зачетной
книжки

Подпись,
дата



Инициалы,
фамилия

Красноярск 2020