

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  
«9» июля 2020г.

### МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Синтез и свойства полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-  
гидроксивалерата  
06.04.01 - Биология  
06.04.01.01 – Микробиология и Биотехнология

Научный руководитель Иван 09.07.2020 к.б.н. Н. О. Жила

Выпускник Анна 09.07.2020 М. Д. Гришкина

Рецензент Андрей 09.07.2020 к.б.н. А. Н. Бояндин

Красноярск 2020

## **РЕФЕРАТ**

Магистерская работа на тему: «Синтез и свойства полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-гидроксивалерата» содержит и включает 40рис., 2табл., 1формула, 57источников.

**СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-4-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ),  $\gamma$ -ВАЛЕРОЛАКТОН, CUPRIAVIDUSNECATOR, 4-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ.**

Цель:исследовать синтез полимера, содержащего 4-гидроксивалерат, бактериями *Cupriavidusnecator* B-10646.

Актуальностьданнойработызаключаетсявисследовании синтеза 4-гидроксивалератсодержащих сополимеров.

В результате проведённых экспериментов исследованадинамика накопления биомассы клеток и полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidusnecator*B-10646в гетеротрофном режиме выращивания. Максимальное содержание 4ГВ было получено на среде с фруктозой в качестве основного ростового субстрата и  $\gamma$ -валеролактоном в качестве прекурсора. Исследовано влияние содержания мономеров 4-гидроксивалерата в сополимере на физико-химические свойства и установлено, что приувеличениисодержания 4ГВ уменьшается температура плавления и молекулярная масса полимера.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	5
1. Обзор литературы .....	7
1.1. Микроорганизмы, синтезирующие полигидроксиалканоаты.....	7
1.2.Основные виды полигидроксиалканоатов .....	7
1.3.Метаболические пути биосинтеза полигидроксиалканоатов .....	9
1.4.Синтез ПГА, содержащих мономеры 4ГВ .....	11
1.5. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-гидроксивалерата.....	14
2. Материалы и методы.....	17
2.1.Бактериальный штамм, среда и условия роста .....	18
2.2. Измерение параметров культивирования .....	18
2.3.Измерение содержания полимера .....	20
2.4.Измерение молекулярной массы .....	21
2.5.Измерение свойств поверхности полимерных пленок.....	21
2.6.Измерение температуры плавления .....	22
2.7.Измерение степени кристалличности .....	22
3. Результаты и обсуждения .....	23
3.1. Определение ингибирующей концентрации $\gamma$ -валеролактона для микроорганизмов <i>Cupriavidus necator</i> B-10646 <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
3.2. Синтез сополимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) на фруктозе в качестве основного субстрата и $\gamma$ -валеролактоне в качестве косубстрата, добавленного на 24 час культивирования .... <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
3.3. Синтез сополимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) на фруктозе в качестве основного субстрата и $\gamma$ -валеролактоне в качестве косубстрата, поступающего по частям с 24 часа выращивания. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
3.4. Определение ингибирующей концентрации акрилата натрия в концентрациях 0,1-1 г/л для микроорганизмов <i>Cupriavidus necator</i> B-10646 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5. Синтез сополимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) на фруктозе в качестве основного субстрата, $\gamma$ -валеролактоне в качестве косубстрата и акрилате натрия, поступающих с начала культивирования <b>Error! Bookmark not defined.</b>	
3.6. Синтез сополимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) на фруктозе в качестве основного субстрата, $\gamma$ -валеролактоне в качестве косубстрата и акрилате	

натрия, поступающих по частям с 24 часа выращивания**Error! Bookmark not defined.**

3.7. Определение ингибирующей концентрации масляной кислоты для микроорганизмов *Cupriavidus necator*B-10646**Error! Bookmark not defined.**

3.8. Динамика накопления биомассы микроорганизмов *Cupriavidus necator*B-10646 при культивировании на масляной кислоте и акрилате натрия .....**Error! Bookmark not defined.**

3.9. Синтез сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) в присутствии  $\gamma$ -валеролактона, поступающего по частям с начала культивирования**Error! Bookmark not defined.**

3.10. Синтез сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) в присутствии  $\gamma$ -валеролактона, поступающего по частям с 24 часа выращивания.....**Error! Bookmark not defined.**

3.11. Синтез сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) в присутствии  $\gamma$ -валеролактона, поступающего по частям с 48 часа выращивания.....**Error! Bookmark not defined.**

3.12. Синтез сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) в присутствии  $\gamma$ -валеролактона и акрилата натрия, поступающего по частям с начала культивирования .....**Error! Bookmark not defined.**

3.13. Свойства сополимеров, содержащих 4-гидроксивалерат .....**Error! Bookmark not defined.**

ВЫВОДЫ.....	24
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	26

## **ВВЕДЕНИЕ**

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – группа биополимеров, которые содержат различные мономеры гидроксикислот. Микроорганизмы преобразуют источники углерода, доступные в окружающей среде, в ПГА, которые выполняют функцию запасного вещества клетки. Химические свойства ПГА аналогичны свойствам пластиков, произведенных нефтехимическим путем, например полипропилен. Однако по сравнению с обычными пластиками ПГА разрушаются в аэробных/анаэробных условиях и являются биосовместимыми материалами, поэтому интерес исследователей (Muzaiyanah, Sheu, Kumar, и т. д.) к ним увеличивается. В последние годы изучению ПГА уделяется огромное внимание благодаря их потенциальному применению в различных областях промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Полигидроксиалканоаты уже постепенно внедряются на рынок в качестве полностью бiorазлагаемого биопластика. Они потенциально могут заменить синтетические пластики в традиционных и новых отраслях промышленности. [1], [2], [3].

Сополимерные ПГА различного химического состава более перспективны, чем гомополимерполи(3-гидроксибутират) или П(ЗГБ), однако их получение – весьма сложная технологическая задача. В питательную среду можно добавлять предшественники различных мономеров, таких как 3-гидроксивалерат(3ГВ), 4-гидроксибутират(4ГБ) и 4-гидроксивалерат (4ГВ). В качестве таких предшественников используются различные органические вещества. К примеру, для синтеза ЗГВ в среду добавляют валериановую или пропионовую кислоты [4], для синтеза 4ГБ –  $\gamma$ -бутиrolактон [5], [6], для синтеза 4ГВ –  $\gamma$ -валеролактонили левулиновую кислоту [7], [8]. 4-гидроксивалерат содержащие полимеры принадлежат к классу термопластичных эластомеров. Эти полимеры являются очень перспективными для многих областей промышленности и регенеративной медицины. Из них можно производить различные упаковочные материалы, мультирующие пленки, 3D печатные изделия, текстиль, медицинские имплантаты, носители для доставки лекарств основу для удобрений, а также новый вид биотоплива [9]. Производство, применение и деградация ПГА не оказывают негативного воздействия на экологию. Использование таких биопластиков является перспективной технологией для создания чистого мира вокруг нас [10], [11], [12], [13], [14].

Цель: исследовать синтез полимера, содержащего 4-гидроксивалерат, бактериями *Cupriavidus necator* B-10646

**Задачи:**

1. Исследовать синтез сополимеров с 4ГВ бактериями *Cupriavidusnecator*B-10646, выращиваемых на фруктозе (основной субстрат) и  $\gamma$ -валеролактоне (предшественник синтеза мономеров 4ГВ).
2. Изучить возможность синтеза бактериями *Cupriavidusnecator*B-10646, выращиваемых на масляной кислоте (основной субстрат) и  $\gamma$ -валеролактоне (предшественник синтеза мономеров 4ГВ).
3. Изучить физико-химические свойства синтезированных полимеров с различным включением мономеров 4ГВ.

Исследование выполнено в рамках проекта "Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация" (Соглашение № 074-02-2018-328) в соответствии с Постановлением №220 Правительства Российской Федерации от 9 апреля, 2010, "О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные организации высшего образования".

## **1. Обзор литературы**

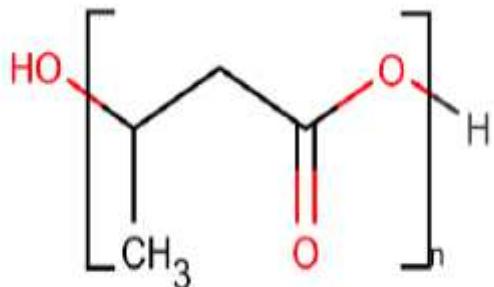
### **1.1. Микроорганизмы, синтезирующие полигидроксиалканоаты**

ПГА - это полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот различной химической структуры. Сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смесь  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, и т. д. Биотехнологический процесс получения полимеров этого класса заключается в культивировании штамма-продуцента в жидкой питательной среде при постоянной аэрации стерильным воздухом и перемешивании. Для синтеза ПГА необходимы следующие условия: избыток углеродного субстрата; ограничение синтеза основных (азотсодержащих) соединений, связанного с недостатком содержания каких-либо компонентов питательной среды [15]. В качестве продуцента используются штаммы бактерий различных таксономических групп, характеризующиеся способностью синтезировать полимеры различной химической структуры и использующие разнообразные субстраты. К таким бактериям относятся *Azohydromonas lata* [16], *Azotobacter vinelandii* [17], *Pseudomonas oleovorans* [18], *Methylomonas* [19], *Methylobacterium organophilum* [20], но наиболее перспективным продуцентом является *Cupriavidus necator*, ранее *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* [21].

### **1.2. Основные виды полигидроксиалканоатов**

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). Данное разделение полимеров на группы базируется на существующем представлении о субстратной специфичности ПГА-синтаз, акцептирующих определенные гидроксикислоты при строительстве полимерной цепи в процессе полимеризации [22]. Чистый поли(3-гидроксибутират) весьма хрупок и мало устойчив к растяжению. Недостаточные эластичность и термостабильность П(ЗГБ) затрудняют процессы его переработки, что ограничивает возможные области применения [23]. Поэтому ведутся исследования по созданию полигидроксиалканоатов с различным качественным и количественным составом мономеров [24]. К таким мономерам относятся 4-гидроксимаслянная кислота [25], 3-гидроксивалериановая кислота [26], 4-гидроксивалериановая кислота, а также 3-гидроксиоктановая и 3-гидроксигексановая кислоты [27]. Изменение соотношения мономеров в ПГА сопровождается существенными изменениями термических, механических свойств материала [28].

Первым среди выделенных и наиболее полно к настоящему времени охарактеризованным полигидроксиалканоатом является поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) (Рис. 1). Поли-3-гидроксибутират ( $C_4H_6O_2$ ) – гомополимер D(-)-3-β-гидроксимасляной кислоты, представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, повторяющими единицами. Поли(3-гидроксибутират) – это стереорегулярный оптически активный полимер, обладающий высокой степенью кристаллизации. В живых клетках П(ЗГБ) находится в плотных гранулах, расположенных хаотически (Cho et al., 2020) [29]. Это высококристаллизованный и жесткий материал, также он хрупкий. Физические свойства П(ЗГБ) сильно зависят от молекулярной массы. Улучшение свойств П(ЗГБ) может быть осуществлено созданием полимера с ультравысокой молекулярной массой ( $M_w=3*10^6$ ) [30].

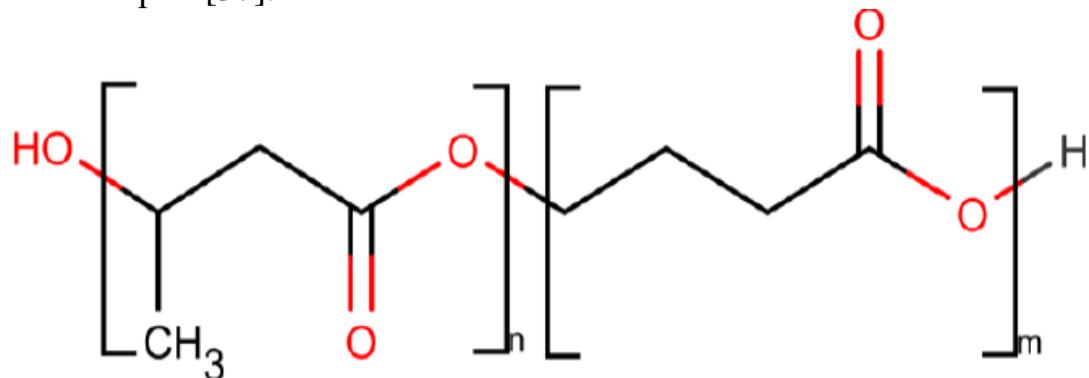


ПЗГБ

Рисунок 1 - Изображение структурной формулы поли(3-гидроксибутирата).

Одним из перспективных, но трудно синтезируемых ПГА, является сополимер 3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата П(ЗГБ-со-4ГБ) (Рис. 2). Для этого типа ПГА характерны высокие скорости биодеградации *in vivo* и в окружающей среде. Установлено, что включение 4ГБ резко влияет на соотношение кристаллической и аморфной фаз в сополимере, значительно снижая кристалличность последнего [31]. С другой стороны, A. NorFaiezah и соавторы установили, что в процессе биодеградации пленок из П(ЗГБ-со-4ГБ) происходит снижение среднечисловой молекулярной массы, но при этом значения полидисперсности практически не изменяются [32]. В последние годы изучение этого представителя ПГА активизировалось. В качестве новых производителей сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ) описаны рекомбинантные (*Burkholderiasp. USM*) и природные штаммы (*Delftia acidovorans*) [33], [35]. П(ЗГБ-со-4ГБ) в настоящее время разрабатывается в качестве нового биоматериала для медицинских и фармацевтических применений. Наличие 4ГБ в сополимере снижает кристалличность и, как правило, обеспечивает гибкие и эластичные свойства. Химическая структура П(4ГБ) похожа на современные биосовместимые полиэфиры, используемые в имплантируемых медицинских изделиях. В настоящее время ведутся исследования, в которых изучается возможность преодоления или минимизации главных недостатков П(ЗГБ-со-4ГБ), а именно отсутствия гидрофильности и биоактивности. П(ЗГБ-со-4ГБ) можно

использовать в различных областях медицины, таких как сердечно-сосудистая хирургия, урология, ортопедия, доставка лекарственных средств и тканевая инженерия [37].



ПЗГБ-4ГБ

Рисунок 2 – Изображение структурной формулы сополимера П(3ГБ-со-4ГБ).

Еще одним полимером, который также является достаточно перспективным для многих областей промышленности и регенеративной медицины, является П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) (Рис 3). Исследования показали, что данный трехкомпонентный полимер более эластичный, чем описанные выше полиэфиры, за счёт присутствия мономера 4ГВ. Низкая температура плавления и степень кристаллизации этого полиэфира являются причиной липкости и затрудненной переработки, хотя они обеспечивают очень высокую термическую стабильность по сравнению с полиэфирами, содержащими 3ГГ и 3ГО [47]. Поэтому данный полимер имеет свойства схожие со свойствами латекса и может в дальнейшем использоваться на химических, медицинских производствах.

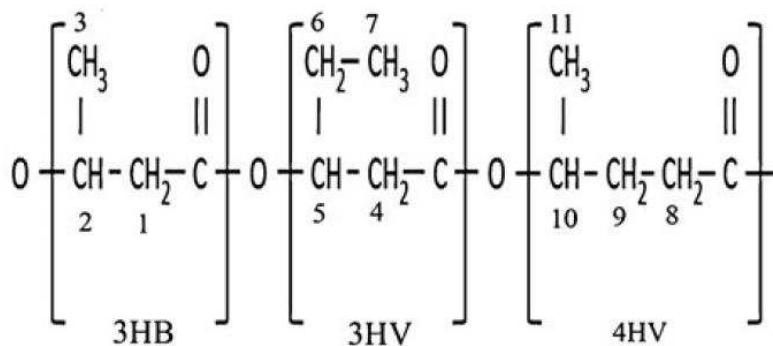


Рисунок 3 - Изображение структурной формулы сополимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ).

### 1.3.Метаболические пути биосинтеза полигидроксиалканоатов

В биосинтезе полигидроксиалканоатов ключевыми являются три фермента: кетотиолаза, ацетоацетил-КоА-редуктаза и ПГА-синтаза, которые кодируются соответственно генами *phbA*, *phbB*, *phbC*. Регуляция процесса синтеза ПГА может осуществляться на нескольких уровнях: на уровне экспрессии генов специфическими факторами среды (например, недостаток питательных элементов) или на уровне регуляции активности ферментов специфическими клеточными компонентами, являющимися их субстратами или ингибиторами. Возможен смешанный тип регуляции активности ферментов, участвующих в метаболизме ПГА. Установлено, что синтез ПГА стимулируется высокой внутриклеточной концентрацией НАДФН и высоким соотношением НАДФН/НАДФ [38].

Последовательность реакций биосинтеза ПГА при культивировании бактерий на сахараах следующая: 2 молекулы ацетил-СоА взаимодействуют между собой с помощью фермента кетотиолазы, в результате чего образуется ацетоацетил-СоА и HS-СоА. Затем ацетоацетил-СоА восстанавливается NADPH+H<sup>+</sup>, взаимодействуя с ферментом ацетоацетил-СоА-редуктазой. Образуется окисленная форма NADP<sup>+</sup> и (R)-3-гидроксибутирил-СоА, из которого, благодаря ферменту ПГА-синтазе, получается П(ЗГБ) [24], [39], [45]. Таким образом, в синтезе полигидроксиалканоатов участвуют три фермента. Первые два отвечают за синтез субстратов, причем кетотиолаза включает синтез полимера. ПГА-синтаза – ключевой фермент биосинтеза ПГА – использует тиоэфиры как субстраты и катализирует образование эфирных связей между ними при участии КоА, что также определяет количество синтезированного полимера.

Метabolicкий путь синтеза трехкомпонентного полимера поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат-ко-4-гидроксивалерат) или П(ЗГБ-ко-ЗГВ-ко-4ГВ) с использованием  $\gamma$ -валеролактона в качестве прекурсора для синтеза мономеров 4ГВ представлен на рисунке 4. Биосинтез П(ЗГБ-ко-ЗГВ-ко-4ГВ) подразделяется на 2 пути. В первом, 4-гидроксивалерил-СоА преобразуется непосредственно в мономер 4ГВ под действием фермента ПГА-синтазы. В данной реакции эфир СоА отщепляется от 4-гидроксивалерил-СоА и является субстратом для ПГА-синтазы [50]. Благодаря данному механизму синтезируется трехкомпонентный полимер П(ЗГБ-ко-ЗГВ-ко-4ГВ) с высоким содержанием мономера 4ГВ.

Синтез мономера ЗГВ происходит по механизму образования кетоновой или гидроксильной группы на 3 атоме углерода молекулы кислоты. Этот механизм обычно наблюдается в  $\beta$ -окислении, 3-гидроксивалерил-СоА расщепляется на пропионил-СоА и ацетил-СоА [20]. Однако,  $\gamma$ -валеролактон гидролизуется в 4-гидроксивалериановую кислоту, которая далее преобразуется в 4-гидроксивалерил-СоА, который имеет гидроксильную группу на четвертом атоме углерода, а не на третьем. Исходя из вышесказанного, второй путь синтеза П(ЗГБ-ко-ЗГВ-ко-4ГВ) заключается в реакции превращения 4-гидроксивалерил-СоА в 3-гидроксивалерил-СоА, что ведет к значительному накоплению мономера ЗГВ [50]. По данным

Amirul и соавторов (2013) реакция превращения 4-гидроксивалерил-СоА в 3-гидроксивалерил-СоА является реакцией изомеризации.

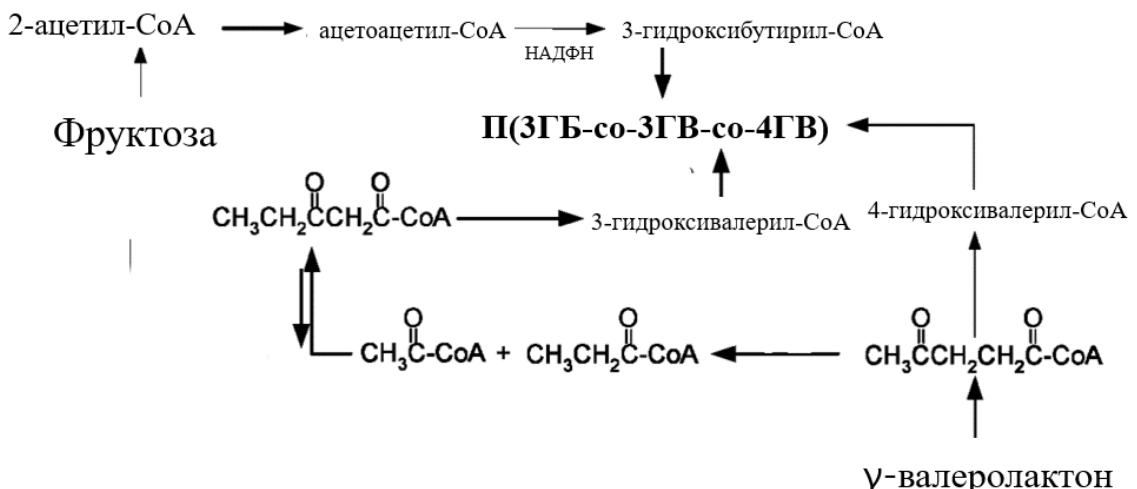


Рисунок 4—Возможный метаболический путь биосинтеза  $\text{P}(\text{3GB-со-3GV-со-4GB})$  при культивировании на фруктозе и  $\gamma$ -валеролактоне.

#### 1.4. Синтез ПГА, содержащих мономеры 4ГВ

В доступной литературе, посвященной синтезу сополимеров с 4ГВ, крайне мало работ. Самой ранней из них является статья Valentin и Steinbuchel(1995). Авторы сравнивали накопление трехкомпонентного полимера, содержащего 3ГБ, 3ГВ и 4ГВ, у штаммов *Alcaligenes eutrophus* HF39 и *Alcaligenes eutrophus* H16. Отдельные колонии культивировали на разных источниках углерода, в качестве которых выступали валерат, 4-гидроксивалерат и ацетат. 4-гидроксивалериановую кислоту получали путем щелочного омыления  $\gamma$ -валеролактона. Молярная доля 4ГВ в полимере составляла 5 мол.%, 3ГВ – 70 мол.%. При использовании рекомбинантного штамма *Alcaligenes eutrophus* H16 SK4508 молярная доля 4ГВ выросла до 22,7 мол.%. Доля 3ГБ и 3ГВ были равны и составляли 38,65 мол.% [50].

Позднее была опубликована статья Schemacet. al. (1998). В ней синтезировали полиефиры в присутствии левулиновой кислоты в качестве прекурсора для синтеза мономеров 4ГВ и октановой кислоты в качестве источника углеродапри использовании бактерии *P. Putida*GpP104. Полимер имел в своем составе 18 мол.% 3ГБ, 52,9 мол.% 3ГВ, 23,9 мол.% 4ГВ, 4,7 мол.% 3ГГ и 0,5 мол.% 3ГО. Содержание полимера составляло 50%, а биомассы - 20 г/л [49].

Команда Gorenflo(2001) двустадийно культивировала штаммы *Pseudomonas putida*GpP104 и *Ralstonia eutropha*H16 РНВ<sup>-4</sup>. В первом эксперименте содержание ПГА при использовании левулиновой кислоты в качестве единственного источника углерода составляло 48% и 59%, соответственно. Содержание 4ГВ составляло для *Ralstonia eutropha* H16 РНВ-4 2,7 мол.%, для *Pseudomonas putida*GpP104 – 24,5 мол.%. Установлено, что содержание мономеров 4ГВ выше у ПГА, синтезированного

штаммом *Pseudomonas putida* GPp104, в связи с этим в последующих экспериментах авторы исследовали только данный штамм. Во втором эксперименте в качестве субстрата для роста культуры *P. Putida* GPp104 (рHP1014::B28RV) была использована глюконовая кислота, в качестве прекурсора для синтеза 4ГВ – левулиновая кислота. Содержание полимера составляло 31,6%, мономера 4ГВ – 32 мол.%. В третьем эксперименте в качестве источника углерода использовали глюкозу, в качестве прекурсора для синтеза мономеров 4ГВ – левулиновую кислоту. Содержание ПГА составляло 50,8%, мономера 4ГВ – 27,8 мол.%. В четвертом эксперименте в качестве источника углерода использовали октановую кислоту, в качестве прекурсора для синтеза 4ГВ – левулиновую кислоту. Помимо 4ГВ (16 мол.%) полимер имел в своем составе 3ГБ – 20 мол.%, 3ГВ – 47 мол.%, 3ГГ – 15 мол.% и 3ГО – 2 мол.%. Таким образом, содержание 4ГВ было выше, чем в клетках, культивированных на глюконовой кислоте [47].

Nartinet. al. (2009) установили, что *Pseudomonas putida* KT2440 запасает сополимеры ПГА, содержащие 4-гидроксивалерат и 3-гидроксивалерат при культивировании на глюкозе в качестве источника углерода и энергии и левулиновой кислоте в качестве прекурсора для синтеза мономера 4ГВ. Авторы модифицировали данный штамм, встроив в часть колоний плазмид *utesB*, оставшиеся колонии плазмиды *ptb* и *buk*, и сравнили молярный выход мономеров 3-гидроксивалерата и 4-гидроксивалерата при различных температурах культивирования. Наибольший молярный выход 4-гидроксивалерата наблюдался у штамма *Pseudomonas putida* KT2440 с встроенной плазмидой *tesB* и составлял 15,3 мол.% на 72 час при температуре 32°C. Наибольший молярный выход 3-гидроксивалерата наблюдался у штамма *Pseudomonas putida* KT2440 с встроенной плазмидой *tesB* при температуре культивирования 30 °C и составлял 4,2 мол.%. У штамма *Pseudomonas putida* KT2440 с встроенными плазмидами *ptb* и *buk* молярный выход 4-гидроксивалерата и 3-гидроксивалерата составляли 2,1 мол.% и 2,2 мол.% при температуре 30 °C, соответственно [48].

Muzaiyanah и Amirul (2013) изучили способность штамма *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 синтезировать полигидроксиалканоаты, содержащие мономеры 4-гидроксивалерата с использованием γ-валеролактона в качестве прекурсора для синтеза 4ГВ. Показано, что накопление ПГА составляло от 15 до 55 мол.% при повышении концентрации γ-валеролактона. Значения клеточной биомассы составляли от 1,1 до 1,7 г/л. 3ГВ оказался основной мономерной единицей, значения которой варьировались от 91 до 94 мол.% по сравнению с 3ГБ (4-5 мол.%) и 4ГВ (2-4 мол.%). Самые высокие концентрации ПГА и биомассы наблюдались при культивировании на γ-валеролактоне в качестве единственного источника углерода в течение 48 часов и составляли 1,0 г/л и 1,7 г/л, соответственно. Также Muzaiyanah и Amirul (2013) исследовали эффект γ-валеролактона в комбинации с различными жирными кислотами в качестве основных источников углерода на бактериальный рост и накопление ПГА, содержащих 4ГВ. Они показали, что количество ПГА

значительно увеличилось при использовании  $\gamma$ -валеролактона вместе с жирными кислотами. Loetal. (2005) установил, что добавление жирных кислот в качестве пищевых добавок в питательную среду помогает улучшить клеточный рост и накопление ПГА. Получена клеточная биомасса, равная 3-5,7 г/л в комбинации олеиновой кислоты и  $\gamma$ -валеролактона. Наблюдались небольшие различия в содержании ПГА при использовании различных комбинаций жирных кислот и  $\gamma$ -валеролактона. Комбинация олеиновой кислоты и  $\gamma$ -валеролактона дала самую высокую клеточную биомассу (5,7 г/л), за ней следует миристиновая кислота, стеариновая кислота и пальмитиновая кислота. Кроме того, сочетание  $\gamma$ -валеролактона и олеиновой кислоты показало большие значения биомассы (3,3 г/л) и концентрации ПГА (2,5 г/л). Наиболее существенные изменения можно увидеть в содержании ЗГБ и ЗГВ в полимере. Увеличение ЗГБ в составе трехкомпонентного полимера, соответственно, привело к снижению ЗГВ. При использовании  $\gamma$ -валеролактона в качестве единственного источника углерода, в составе полимера наблюдалось около 4-5 мол.% ЗГБ с высоким содержанием ЗГВ около 94 и 91 мол.%. Затем, когда жирные кислоты были добавлены совместно с  $\gamma$ -валеролактоном, содержание ЗГБ возросло от 11 до 57 мол.%, поэтому содержание ЗГВ уменьшилось до 41-68 мол.%. Однако, здесь не было значительных различий в содержании 4ГВ, его значения колебались от 2 до 4 мол.%, когда  $\gamma$ -валеролактон был использован как единственный источник углерода. При сочетании жирных кислот в качестве источников углерода и  $\gamma$ -валеролактона содержание 4ГВ было около 1-2 мол.%.

Кроме того, исследовано влияние различных концентраций олеиновой кислоты на бактериальный рост и накопление П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ). Клеточная биомасса была равна 4,1 г/л, и содержание ПГА составляло 30% при максимальной концентрации олеиновой кислоты. В составе ПГА произошло увеличение содержания ЗГБ от 15 до 70 мол.%, поэтому содержание ЗГВ снизилось с 83 до 27 мол.%. С другой стороны, содержание 4ГВ оставалось на уровне 1-2 мол.%. При концентрации  $\gamma$ -валеролактона 0,14 wt% С и концентрации олеиновой кислоты 0,42 wt% С, клеточная биомасса составляла 7,2 г /л. Содержание ПГА составляло 63% [7].

В 2018 году вышла статья Der-ShyanSheu и коллег, в которой было исследовано влияние температуры культивирования на состав полимеров и их свойства. В качестве источника углерода использовалась 0,8% левулиновая кислота. Синтез ПГА осуществлялся новым изолированным диким штаммом, выделенным из почвы, *Cupriavidussp.* L7L. ЯМР-спектр показал, что синтезированные полимеры в своем составе содержали ЗГБ, ЗГВ и незначительное количество 4ГВ (2,1-4,8 мол.%). Также было установлено, что синтез мономера 4ГВ осуществляется только при наличии левулиновой кислоты в качестве единственного источника углерода. Наилучший синтез трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-33.7 мол.% ЗГВ-со-2.1мол.% 4ГВ) наблюдался при культивировании при 30°C и без контроля pH в культиваторе объемом 5 л, с рабочим объемом 2,5 л. Содержание биомассы составляло

15,8 г/л<sup>-1</sup>, а содержание полимера 81%. Также было установлено, что при увеличении температуры культивирования (35°C) увеличивается содержание ЗГБ и уменьшается содержание ЗГВ. При температуре культивирования 20°C отмечается наибольшее соотношение ЗГВ и 4ГВ в полимере – 50,1 мол.% и 4,8 мол.%, соответственно.

### **1.5. Физико-химические свойства полигидроксиалcanoатов, содержащих мономеры 4-гидроксивалерата**

Переход полимеров в кристаллическое состояние – кристаллизация – происходит при охлаждении расплавов полимеров или в процессе осаждения их из растворов, а также при одноосном растяжении эластомеров. Кристаллизация – фазовый переход первого рода с присущими каждому полимеру значениями температуры и теплоты перехода; эти характеристики определяют калориметрическими методами. Кристаллизация из расплавов осуществляется в широком диапазоне температур – от температуры стеклования до равновесной температуры плавления; зависимость скорости кристаллизации из расплава от температуры выражается кривой с максимумом. При кристаллизации полимеров всегда сохраняются области с неупорядоченной (аморфной) структурой, поэтому для характеристики полимеров используют понятие степени кристалличности. Степень кристалличности показывает объёмное отношение неразделяемых аморфной и кристаллической фаз, зависит от природы полимера и строения его цепи, условий кристаллизации и внешних воздействий [52]. Значения кристалличности для трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-9 мол.% ЗГВ-со-1 мол.% 4ГВ) составляли всего лишь 20,8%, для П(ЗГБ-со-10 мол.% ЗГВ) – 35,45%. В данном исследовании самой высокой кристалличностью обладает гомополимер П(ЗГБ) – 78%, а самой низкой - П(ЗГБ-со-9 мол.% ЗГВ-со-1 мол.% 4ГВ). Температура кристаллизации – важный параметр, характеризующий физико-химические свойства полимера. Muaiyanah Amirul (2013) сравнивали температуру кристаллизации П(ЗГВ-со-10%ЗГБ) и П(ЗГБ-со-9%ЗГВ-со-1%4ГВ), а также П(ЗГБ-со-27 %ЗГВ) и П(ЗГБ-со-27%ЗГВ-со-2%4ГВ) [7]. Для первой пары температура кристаллизации снизилась с 2,4 до -12,8°C и степень кристалличности снизилась с 29 до 20,8%. Для второй пары значения температуры кристаллизации снизились с -2,8 до -13,2°C. В данном исследовании при увеличении в составе полимера содержания мономеров ЗГВ и 4ГВ, значения температуры кристаллизации снижаются. В статье Schemacet. al. 1998 года исследовали физико-химические свойства пятикомпонентного полимера, содержащего мономеры ЗГБ, ЗГВ, 4ГВ, 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) и 3-гидроксиоктаноата (ЗГО).П(ЗГБ-со-52,3 мол.% ЗГВ-со-17,8 мол.% 4ГВ-со-5,9 мол.% ЗГГ-со-1,1 мол.% ЗГО) имеет низкую температуру кристаллизации [49].Согласно данным Sheu (2018),при максимальном содержании 4ГВ в полимере (4,8 мол.%) наблюдается наименьшая температура стеклования - -7,87.Gorenflo и

коллеги (2001) установили, что температура кристаллизации трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-64,7 мол.% ЗГВ-со-32 мол.% 4ГВ) составляла -11,9° С, полимера П(ЗГБ-со-70,6 мол.% ЗГВ-со-27,8 мол.% 4ГВ) - -12,9 ° С, а пятикомпонентного полимера П(ЗГБ-со-47 мол.% ЗГВ-со-16 мол.% 4ГВ-со-15 мол.% ЗГГ-со-2 мол.% ЗГО) - -15 ° С[47].

Следующий параметр – прочность на растяжение. Как известно из предыдущих исследований, высокая эластичность сополимеров П(ЗГБ – 4ГВ), П(ЗГБ—ЗГВ) и трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) обусловлена содержанием мономеров 4ГВ, ЗГВ и 4ГВ. Как правило, эластичность вышеупомянутых полимеров выше, чем у гомополимера П(ЗГБ). Согласно исследованиям Martínez-Sanz и соавторов (2014) с увеличением валерата в составе полимера значительно снижается его жесткость, в результате чего полимер становится более пластичным [54]. Удлинение при разрыве у П(ЗГБ-со-24 мол.% 4ГВ), П(ЗГБ-со-35,9 мол.% ЗГВ) и трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-33,7 мол.% ЗГВ-со-2,1 мол.% 4ГВ) составляет до 1000%, т.е. на два порядка выше, чем у П(ЗГБ). У трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-47 мол.% ЗГВ-со-16 мол.% 4ГВ) удлинение при разрыве может достигать до 2000%. В статье Schemacet. al. (1998) полученный четырехкомпонентный полимер П(ЗГБ-со-62,1 мол.% ЗГВ-со-22 мол.% 4ГВ-со-2,7 мол.% ЗГГ) был прочнее гомополимера П(ЗГВ), и сила растяжения достигала 1000% [49]. Команда Gorenflo (2001) получила трехкомпонентный полимер П(ЗГБ-со-71,3 мол.% ЗГВ-со-25 мол.% 4ГВ), удлинение при разрыве которого составляет 200%. Трехкомпонентный полимер, в котором молярная доля мономера 4ГВ выше 25 мол.% (П(ЗГБ-со-64,7 мол.% ЗГВ-со-32 мол.% 4ГВ)), эластичнее, так как сила растяжения полимера составляла около 1000%. У пятикомпонентного полимера П(ЗГБ-со-47 мол.% ЗГВ-со-16 мол.% 4ГВ-со-15 мол.% ЗГГ-со-2 мол.% ЗГО) сила растяжения также составляла 1000% [47]. Трехкомпонентный полимер П(ЗГБ-со-33,7 моль% ЗГВ-со-2,1 моль% 4ГВ) и сополимер П(ЗГБ-со-35,9 моль% ЗГВ), согласно исследованию Sheu (2018), имели различия по пластичности, гибкости, и твердости. Удлинение на разрыв, модуль Юнга и предел прочности трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-33,7 моль% ЗГВ-со-2,1 моль% 4ГВ) составляли 636%, 816 МПа и 19,3 МПа, соответственно. В то время как сополимер П(ЗГБ-со-35,9 моль% ЗГВ) имел 462% - удлинение на разрыв, 937 МПа – модуль Юнга и 17,3 МПа – предел прочности. Полученные данные свидетельствуют о том, что трехкомпонентный полимер имеет более перспективные механические свойства, что позволяет использовать его в различных областях промышленности и медицины [8].

Значимым показателем, характеризующим гидрофильно/гидрофобный баланс поверхности, служит величина краевого угла смачивания водой. Измерение этой величины позволяет вычислить также такие важные характеристики поверхности, как величину сил сцепления, поверхностное натяжение и свободную энергию межфазовой поверхности. В доступной литературе, посвященной синтезу сополимеров с 4ГВ, нет данных о

гидрофильно/гидрофобном балансе поверхности полимерных пленок. Значение краевого угла смачивания водой поверхности пленок, полученных из П(ЗГБ), составляло ( $70.0 \pm 0.4^\circ$ ) [56], [57].

Важнейшими характеристиками полимеров служат величина молекулярной массы (ММ) и степень полидисперсности. Молекулярная масса является одним из базовых свойств полигидроксиалканоатов. Микроорганизмы в различных условиях роста синтезируют полимеры, имеющие молекулярную массу от сотен до миллиона дальтон. Регулирование молекулярной массы полимера в процессе синтеза является важным фактором влияния на его механические свойства. Понятия молекулярной массы полимера и низкомолекулярного соединения не адекватны между собой. Это различие связано с тем, что практически все синтетические полимеры, а также полигидроксиалканоаты, не являются индивидуальными соединениями в общепринятом смысле, а представляют собой смесь полимеров-гомологов одинакового состава, но различных степеней полимеризации, т.е. различных молекулярных масс (т.н. полимолекулярность). Полидисперсность позволяет оценить, каково соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полидисперсности [55]. Фактически для полимеров в отличие от низкомолекулярных соединений не выполняется закон постоянства состава. Нарушение закона постоянства состава для полимеров связано также с тем, что концевые звенья макромолекул отличаются от основных, повторяющихся звеньев цепи. При полимеризации возможны нарушения основной структуры цепи, за счёт боковых разветвлений различной длины. Вклад двух последних причин в сравнении с первой - полидисперсностью, в нарушение закона постоянства состава для полимеров пренебрежимо мал. Существует 3 вида молекулярных масс: среднечисловая ( $M_n$ ), средневесовая ( $M_w$ ) и средневязкостная ( $M_v$ ). Отношение средневесовой и среднечисловой молекулярной массы дает величину, характеризующую полидисперсность соответствующего полимера:

$$\text{ПД} = M_w / M_n (1)$$

Средневесовая молекулярная масса представляет собой сумму масс отдельных фракций, деленную на сумму всех масс. Среднечисловая молекулярная масса определяется делением массы образца полимера на число молекул. Полидисперсность (молекулярно-массовое распределение) – соотношение макромолекул различной молекулярной массы в данном образце полимера. Молекулярно-массовое распределение – фундаментальная характеристика полимера – наряду с химической и топологической структурой цепи макромолекулы, определяет весь комплекс физико-химических и механических свойств не только самого полимера, но и получаемого на его основе материала. Отношение  $\text{ПД} = M_w / M_n$  может служить мерой полидисперсности полимера. Нередко требуется более полная характеристика полидисперсности, чем указанное выше отношение. Одному и тому же  $M_w / M_n$  могут соответствовать различные типы молекулярно-

массового распределения (ММР) [51]. Корректная регистрация данных параметров возможна только с применением гельпроникающей хроматографии, которая позволяет определить молекулярную массу и полидисперсность полимера [17].

Согласно исследованиям Muzaiyanah и Amirul (2013), молекулярная масса трехкомпонентных полимеров П(ЗГБ-со-55 мол.% ЗГВ-со-2 мол.% 4ГВ) и П(ЗГБ-со-27 мол.% ЗГВ-со-2 мол.% 4ГВ) была меньше, чем гомополимера П(ЗГБ) и сополимера П(ЗГБ-со-9 мол.% ЗГВ) и была равна от 110 до 570 кДа, в то время как масса П(ЗГБ) составляла 141 кДа и масса П(ЗГБ-со-9 мол.% ЗГВ) находилась в пределах от 510 до 1840 кДа [7]. Однако, значения полидисперсности трехкомпонентных полимеров П(ЗГБ-со-91 мол.% ЗГВ-со-1 мол.% 4ГВ) и П(ЗГБ-со-55 мол.% ЗГВ-со-2 мол.% 4ГВ) были выше, чем гомополимера П(ЗГБ) и составляли от 2,6 до 3,8. Согласно данным Schemacet. al. значения полидисперсности для пятикомпонентных полимеров П(ЗГБ-со-52,9 мол.% ЗГВ-со-23,9 мол.% 4ГВ-со-4,7 мол.% ЗГГ-со-0,5 мол.% ЗГО) и П(ЗГБ-со-52,3 мол.% ЗГВ-со-17,8 мол.% 4ГВ-со-5,9 мол.% ЗГГ-со-1,1 мол.% ЗГО) колебались в пределах от 2,5 до 3,6 [49]. Содержание мономеров ЗГВ и 4ГВ зависело от концентраций октановой и левулиновой кислот при культивировании рекомбинантного штамма *P. Putida*. С увеличением концентрации левулиновой кислоты (720 г) и уменьшением концентрации октановой кислоты (60 г) снижается содержание мономеров 4ГВ с 23,9 мол.% до 17,8 мол.%. Команда Gorenflo(2001) получила полимеры П(ЗГБ-со-58,4 мол.% ЗГВ-со-34,6 мол.% 4ГВ) и П(ЗГБ-со-71,3 мол.% ЗГВ-со-25 мол.% 4ГВ) со значениями молекулярной массы 193 кДа и 338 кДа. Это показывает, что 4-гидроксивалератсодержащие полимеры принадлежат к классу эластомеров [47].

В работе Sheu (2018) установлено, что П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) имеет высокую молекулярную массу, что значительно сказывается на улучшении термических и механических свойств данных полимеров. При максимальном содержании 4ГВ в полимере наблюдаются наибольшие значения средневесовой (4032 кДа) и среднечисловой (982 кДа) молекулярных масс. Значения полидисперсности для всех образцов были примерно одинаковыми и составляли около 4.

## **2. Материалы и методы**

### **2.1.Бактериальный штамм, среда и условия роста**

В работе использовали штамм бактерий *Cupriavidusnecator* B-10646. Посевной материал исследуемого штамма получали ресуспендирированием музейной культуры, хранящейся наагаризованной среде. Далее музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде в стеклянных колбах объемом 0,5 л при коэффициенте заполнения 0,4 с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «IncubatorShakerInnova»®серии 44 («NewBrunswickScientific», США) при 30 °C и 200 грт. Для выращивания бактерий использовали среду Шлегеля (г/л): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O – 9.1; KН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 1.5; MgSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O – 0.2; NH<sub>4</sub>Cl – 1. Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который вводили из расчета 5 мл/л; микроэлементы вводили в среду из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л. среды. Стандартный раствор содержит: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,288; CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O – 0,030; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O – 0,08; MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O – 0,008; ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O – 0,176; NaMoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O – 0,050; NiCl<sub>2</sub> – 0,008 г/л. В качестве источников углерода в отдельных экспериментах использовали фруктозу и масляную кислоту при начальных концентрациях в среде 10 г/л и 2-4 г/л, соответственно. Динамика накопления биомассы клеток и ПГА штаммом B-10646 исследована в гетеротрофном режиме выращивания. Продолжительность культивирования составляла до 120 часов. В качестве дополнительного источника углерода использовали γ-валеролактон, в отдельных экспериментах дополнительно су-валеролактономдробно подавали 100мкг/л акрилата натрия в начале культивирования и на 24 час выращивания. Начальная концентрация фруктозы составляла 10 г/л, масляной кислоты – 2-4 г/л, γ-валеролактона – 1 и 2 г/л, акрилата натрия – 100 мкг/л. По ходу роста культуры и исчерпания субстрата делали добавки соответствующих субстратов, а именно фруктозы или масляной кислоты, в культуру в концентрациях, аналогичных исходным.

### **2.2. Измерение параметров культивирования**

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры.

Определение оптической плотности культуры: к 5 мл дистиллированной воды добавляли 1 мл культуры. Измеряли полученную пробу на спектрофотометреUNICO 2100 (UNITEDPRODUCTS&INSTRUMENTS, США) при длине волны 440 нм в кювете с длиной оптического пути 1 мм.

Для определения веса сухой биомассы 20-25 мл культуры центрифугировали на центрифуге «EppendorfCentrifuge 58 10 R®» при 6000

об/мин в течение 7 минут. Далее надосадочную жидкость сливали, биомассу промывали дистиллированной водой и снова центрифугировали. Данный процесс повторяли дважды. Полученный осадок переносили в предварительно взвешенные бюксы, помещали в сухожаровой шкаф «ШС-80-01 СПУ» и высушивали при температуре 105 °C в течение 24 часов. По истечении этого времени бюксы переносили в эксикатор для охлаждения, затем взвешивали и рассчитывали сухую биомассу (г/л).

Определение концентрации фруктозы проводили следующим образом: супернатант разводили в 50 раз. 1 мл полученной пробы наливали в пробирку и добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина + 3 мл 80%-ного раствора соляной кислоты. Пробирки помещали на водяную баню на 20 мин. Далее контроль и пробы охлаждали и измеряли на спектрофотометре UNICO 2100 (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США) при длине волны 540 нм. Концентрацию фруктозы (г/л) рассчитывали по калибровочному графику.

Для определения масляной кислоты 20 мл культуры центрифугировали на центрифуге «Eppendorf Centrifuge 58 10 R®» при 6000 об/мин в течение 7 минут. По завершении центрифугирования отбирали 2 мл надосадочной жидкости, подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения pH=2-3, добавляли 2 мл хлороформа, перемешивали. Далее из нижнего слоя отбирали 1 мкл пробы для анализа на хромато-масс-спектрометре 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 ами при 0,5 сек/скан. Содержание масляной кислоты (г/л) рассчитывали по калибровочному графику (Рис.6).

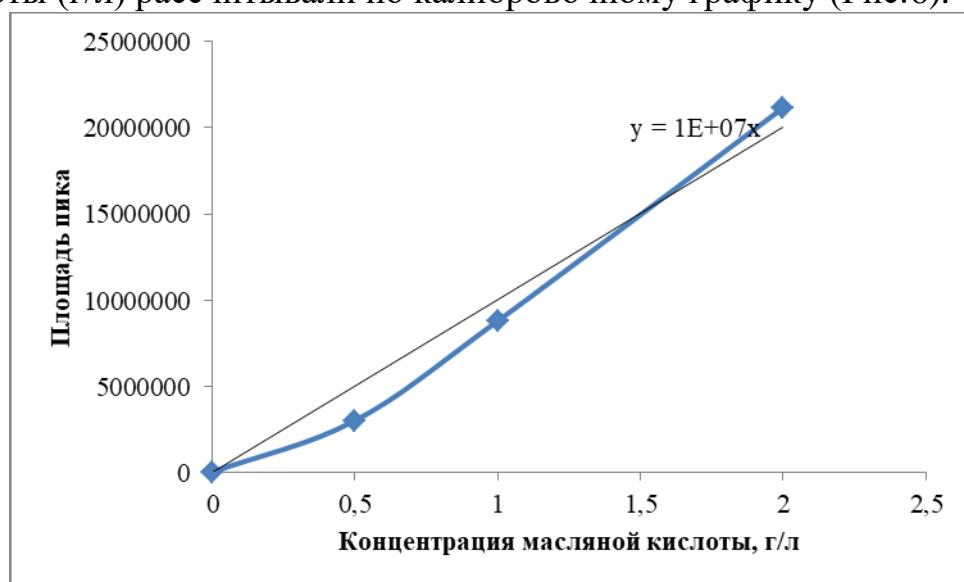


Рисунок 6 – Калибровочный график для расчета содержания масляной кислоты в среде (г/л).

Для определения концентрации  $\gamma$ -валеролактона 20 мл культуры центрифугировали на центрифуге «Eppendorf Centrifuge 5810 R®» при 6000 об/мин в течение 7 минут. По завершении центрифугирования отбирали 2 мл надосадочной жидкости, подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения pH=2-3, добавляли 2 мл хлороформа, перемешивали. Далее из нижнего слоя отбирали 1 мкл пробы для анализа на хромато-масс-спектрометре 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  $\gamma$ -валеролактона проводили по масс-спектрам и временам удерживания. Концентрацию  $\gamma$ -валеролактона в среде (г/л) определяли по калибровочному графику (Рис. 7).

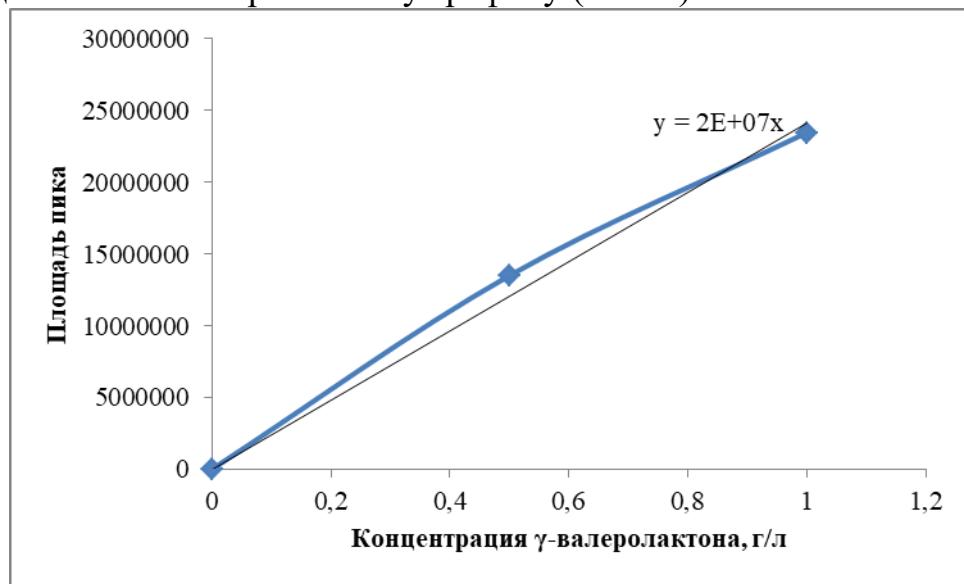


Рисунок 7 - Калибровочный график для расчета содержания  $\gamma$ -валеролактона в среде (г/л).

### 2.3. Измерение содержания полимера

Внутриклеточную концентрацию ПГА определяли в разные интервалы времени, анализируя образцы сухой клеточной биомассы. Сухая биомасса бактерий была подвергнена метанолизу: в сердцевидную колбу, объемом 25 мл, помещали предварительно взвешенную в пределах 3,9-4,5 мг сухую биомассу/полимер. Затем добавляли бензойную кислоту (1 мл) в качестве внутреннего стандарта для определения общего внутриклеточного ПГА, метанол (0,85 мл) и концентрированную серную кислоту (0,15 мл). Колбу помещали на водянную баню с холодильником и выдерживали 2 часа 40

минут при температуре 80 °C. Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра AgilentTechnologies 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.

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР растворов ПГА в  $\text{CDCl}_3$  получены с использованием ЯМР-спектрометра Avance III 600 “Bruker” (Германия).

## **2.4.Измерение молекулярной массы**

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера определяли с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии AgilentTechnologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов Agilent PS-H EasiVial. Растворяли образцы сополимерных ПГА навеской 10-12 мг в 2 мл хлороформа с дальнейшей их фильтрацией через фильтры Macherey-NagelChromafilfi. Полученные растворы полимеров переносили в виалы для для гельпроникающей хроматографии. Значения средневесовой и среднечисловой молекулярных масс, а также полидисперсности, рассчитывали с помощью хроматографа AgilentTechnologies 1260 Infinity (Германия) и калибровочных стандартов Agilent PS-H EasiVial.

## **2.5.Измерение свойств поверхности полимерных пленок**

Для изучения физико-химических свойств ПГА использовали образцы в виде пленок. Пленки получали методом полива разогревенного до 35°C раствора ПГА в дихлорметане(20 г/л) на обезжиренную поверхность предварительно нагретых до такой же температуры стеклянных чашек Петри диаметром 5 см (100 мг ПГА растворяли в 5 мл дихлорметана). Чашки Петри оставляли под стеклянным колпаком на сутки. Свойства поверхности рассчитывали на базе измерения контактного краевого угла смачивания водой и дийодметаном ( $\theta$ , град) с использованием оборудования KRUSS (Германия). К свойствам поверхности относятся: свободная поверхностная энергия  $\gamma_s$ , свободная энергия межфазовой поверхности  $\gamma_{SL}$  и величина сил сцепления  $W_{SL}$  (эр/см<sup>2</sup>). Полученные пленки нарезали ровными полосками, закрепляли их на подложке. Далее с помощью оборудования KRUSS

наносили поочередно капли воды и дийодметана. Нанесение капель регистрировала видеокамера. Полученные кадры обрабатывались при помощи программного обеспечения КРУСС, в котором использовался метод Юнга-Лапласа для определения динамики краевого угла смачивания, а именно величины краевого угла, общей поверхностной энергии, дисперсионной составляющей и полярной составляющей.

Микроструктуру поверхности пленок анализировали с применением растровой электронной микроскопии S 5500, Hitachi(Япония).

## **2.6.Измерение температуры плавления**

Комплексный термический анализ полигидроксиалcanoатов проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 («MettlerToledo», Швейцария). Образцы в виде порошка массой  $4,0 \pm 0,2$  мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью  $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Далее образцы охлаждали до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , выдерживали в течение 20 минут и повторно нагревали до  $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Температуры стеклования, кристаллизации, плавления и термической деградации определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE».

## **2.7.Измерение степени кристалличности**

Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности ПГА выполняли на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE “Bruker”, Германия (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Регистрацию проводили в пошаговом режиме с шагом  $0.04^{\circ}$  и двухсекундной выдержкой для измерения интенсивности в точке (режим работы прибора  $40\text{ kV} \times 40\text{ }\mu\text{A}$ ). Степень кристалличности рассчитывали с помощью программного обеспечения Bruker AXS TOPAS v.4.2 (Germany, 2008).



**[изъято 35 страниц]**

## **ВЫВОДЫ**

1. Исследован рост бактерий и синтез полимера при росте на фруктозе или масляной кислоте как основном субстрате и  $\gamma$ -валеролактоне, являющимся предшественником мономеров 4ГВ. Показано, что бактерии при росте на обоих субстратах синтезировали трехкомпонентный полимер П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ).
2. Показано, что при культивировании на фруктозе добавление акрилата натрия привело к увеличению содержания ЗГВ и 4ГВ в полимере. Максимальное содержание ЗГВ составило 26,2 мол.%, 4ГВ – 8 мол.%.
3. Максимальные включения ЗГВ (30,7 мол.%) и 4ГВ (5,4 мол.%) при росте бактерий на масляной кислоте получены при дробном добавлении  $\gamma$ -валеролактона.
4. Исследованы молекулярно-массовые характеристики и поверхностные свойства пленок, изготовленных из синтезированных полимеров различного состава. Отмечено снижение средневесовой молекулярной массы у полимеров, содержащих 4ГВ. Показано, что с увеличением содержания ЗГВ и 4ГВ происходило значительное снижение дисперсионной составляющей по сравнению с пленками из П(ЗГБ). Установлено, что с увеличением содержания мономеров 4ГВ в полимере, увеличивается количество и размер пор поверхности пленок.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Воинов, Н. А. Полигидроксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот: синтез, свойства, области применения / Волова, Т. Г. // JournalofSiberianFederalUniversity. Biology 2 (2015) 8) 131-151.
2. Волова, Т. Г. Высокомолекулярные соединения / Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения / Структура и свойства / Жила, Н. О., Шишацкая, Е. И., Миронов, П. В. / Серия А / 2013 / том 55 / №7 / С. 775-786.
3. Marang, L. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. / Jiang, Y.; C.M. van Loosdrecht, M.; Kleerebezem, R.//Bioresouce Technology (2013) 142:232-239.
4. Gahlawat, G. Valorization of waste glycerol for the production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)copolymer by *Cupriavidusnecator* and extraction in a sustainable manner./Soni, S. K. //Bioresouce Technology(2017) 243:492-501.
5. Reddy, M. VenkateswarPolyhydroxyalkanoates (PHA) production from synthetic waste using *Pseudomonas pseudoflava*: PHA synthase enzyme activity analysis from *P. pseudoflava* and *P. palleronii* / YasuteruMawatari, Rui Onodera, Yuki Nakamura, Yuka Yajima, Young-Cheol Chang // Bioresource Technology (2017) 234:99–105.
6. Choi, M.H. Biosynthesis and local sequence specific degradation of Poly(3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) in *Hydrogenophagapseudoflava*./ Lee, H.-J., Rho, J.K., Yoon, S.C., Nam, J.D., Lim, D., Lenz, R.W //Biomacromolecules(2003) 4:38–45.
7. Muzaiyanah, A. R. Studies on the Microbial Synthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Containing 4-Hydroxyvalerate Using  $\gamma$ -Valerolactone / A. A. Amirul // ApplBiochemBiotechnol (2013) 170:1194–1215.
8. Sheu, Der-Shyan Cultivation temperature modulated the monomer composition and polymer properties of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Cupriavidus sp. L7L* from levulinate as sole carbon source / Yuh-Ling Lee Chen, Wun-JyunJhuang, Houng-Yung Chen, Wann-Neng Jane // International Journal of Biological Macromolecules (2018) 118:1558–1564.
9. Daniel E. Agnew Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources / Brian F.Pfleger // Chemical Engineering Science (2013) 103:58-67.
10. Kumar, P. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications / Patel, S.K.S., Lee, J.K., Kalia, V.C. // Biotechnol. Adv. (2013) 31: 1543–1561.

- 11.Jiang, X.R. Morphology engineering of bacteria for bio-production/ Chen, G.Q. // Biotechnol. Adv. (2015) 34:435–440.
- 12.Elhadi, D. CRISPRi Engineering *E. coli* for Morphology Diversification/ Lv, L., Jiang, X.R., Wu, H., Chen, G.Q. // Metab. Eng. (2016) 38:358–369.
- 13.Nissila, M.E. Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolysates – a review/ Lay, C.H., Puhakka, J.A. // Biomass Bioenerg. (2014) 67: 145–159.
- 14.Patel, S.K.S. Enhancing biological hydrogen production through complementary microbial metabolisms/ Kumar, P., Kalia, V.C. // Int. J. Hydrot. Energy (2012a) 37:10590–10603.
- 15.Волова Т. Г. Разрушаemye микробныe полигидроксиалканoаты в качестве технического аналога разрушаemyx полиолефинов / Journal of Siberian Federal University. Biology 2 (2015) 8:131-151.
- 16.Berwig K. H. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process / Camila Baldasso, Aline Dettmer // Bioresource Technology (2016) 218:31-37.
- 17.Millán M. Molecular mass of Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is influenced by the polymer content in the inoculum / Miriam Salazar, Daniel Segura, Tania Castillo, Álvaro Díaz-Barrera, Carlos Peñalosa // Journal of Biotechnology (2017) 259:50-55.
- 18.Kim D. Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolyester containing cyclohexyl groups by *Pseudomonas oleovorans*/ SaetByel Jung, Gang Guk Choi, Young Baek Kim, Young HaRhee // International Journal of Biological Macromolecules (2001) 29:145-150.
- 19.Koller M. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymers in a sustainable manner / Lukáš Maršílek, Miguel Mirandade Sousa Dias, Gerhart Braunegg // New Biotechnology (2017) 37:24-38.
- 20.Zuñiga C. Polyhydroxyalkanoates accumulation by *Methylobacterium organophilum* CZ-2 during methane degradation using citrate or propionate as cosubstrates / Marcia Morales, Sergio Revah // Bioresource Technology (2013) 129:686-689.
- 21.Volova T. G. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646 / Evgeniy G. Kiselev, Ekaterina I. Shishatskaya, Natalia O. Zhila, Anatoly N. Boyandin, Daria A. Syrvacheva, Olga N. Vinogradova, Galina S. Kalacheva, Alexander D. Vasiliev, Ivan V. Peterson // Bioresource Technology (2013) 146:215-222.

22. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Константинова В.М. (1996) Способ получения гетерополимера  $\beta$ -оксимасляной и  $\beta$ -оксивалериановой кислот. Патент № 2051968.
23. Pal, S. Production of poly ( $\beta$ -hydroxybutyric acid) and 335exopolysaccharide by *Azotobacter beijerinckii* WDN-01 / Manna, A., Paul, A.K. // World J. Microbiol.Biotechnol. (1999) 15: 11–16.
24. Slater, S. Multiple  $\beta$ -ketothiolases mediate poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*/ Houmiel, K. L., Tran, M., Mitsky, T. A., Taylor, N. B., Padgett, S. R., &Gruys, K. J. // Journal of Bacteriology(1998) 180:1979–1987.
25. Lee, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates // Biotechnol. Bioeng. (1996)49:1–14.
26. Madison, L.L. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic/ Huisman, G.W. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. (1999) 63:21–53.
27. Witholt, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics/ Kesseler, B. // Curr. Opin. Biotech. (1999) 10:279–285.
28. Albuquerque, M. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties / Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., Reis, M. // J. Biotechnol. (2011) 151 (1):66–76.
29. Choi, S. Y. Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters / Rhie, M. N., Kim, H. T., Joo, J. C., Cho, I. J., Son, J., Jo, S. Y., Sohn, Y. J., Baritugo, K. A., Pyo, J., Lee, Y., Lee, S. Y., Park, S. J. //Metabolic Engineering (2020) 58:47–81.
30. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh., H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. – (2000) 1503-1555 c.
31. Huong, K. H. Microbial-based synthesis of highly elastomeric biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thermoplastic / C. H. Teh, A. A. Amirul // Int J BiolMacromol. (2017) 101:983-995.
32. Nor Faezah, A. Regulating the molar fraction of 4-hydroxybutyrate in Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by biological fermentation and enzymatic degradation/ A. Rahayu, S. Vigneswari, M. I. A. Majid, A. A. Amirul // World J MicrobiolBiotechnol (2011) 27:2455–2459.
33. Nyok-Sean L. Revelation of the ability of *Burkholderia sp. USM*(JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer / Kumar Sudesh // AMB Express (2012) 9;2(1):41.

34. Volova T. G. Biosynthesis of MultiComponentPolyhydroxyalkanoates by the Bacterium *Wautersiaeutropha*/ Kalacheva G.S., A. Steinbüchel // Macromol. Symp. (2008) 269: 1–7.
35. Ch'ng DH-E. Biosynthesis and lipase-catalysed hydrolysis of 4-hydroxybutyrate-containing polyhydroxyalkanoates from *Delftiaacidovorans* / Lee W-H, Sudesh K. // Malays J Microbiol (2012) 9(1):33–42.
36. Rehm, B.H.A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The phaG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase/ Kruger, N., Steinbuchel, A. // J. Biol. Chem. (1998) 273:24044–24051.
37. Foong C. P. A noveland wide substrate specific polyhydroxyalkanoate (pha) synthase fromunculturable bacteria found in mangrove soil / M. Lakshmanan, H. Abe, T.D. Taylor, S.Y. Foong, K. Sudesh // J. Polym. Res. (2017) 25:<https://doi.org/10.1007/s10965-017-1403-4>.
38. Volova, T.G. Polyhydroxyalkanoates – Plastic Materials of the 21st Century: production, properties, application. New York: Nova Science Pub., (2004) 282 p.
39. Senior, P. G. Polyhydroxybutyrate, a speciality polymer of microbial origin In / P. G. Senior, A. Dean, D. Ellwood, C. Evans, E. Horwood // eds. Continuous culture(1984) 8:266–271.
40. Agus, J. Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*/ PrihardiKahar, Hideki Abe, Yoshiharu Doi, Takeharu Tsuge // Polymer Degradation and Stability(2006) 91:1138-1146.
41. Tokiwa, Y. Biodegradability and biodegradation of polyesters / Calabia B.P. // J Polym Environ (2007) 15:259–267.
42. Тагер А. А. Физико-химия полимеров/Тагер А.А. – Москва: Издательство «Химия» – (1968) 500с.
43. Barham P. J. et al. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate //Journal of Materials Science. – 1984. – Т. 19. – №. 9. – С. 2781-2794.
44. Lakshmanan M. Biosynthesis and characterization of co and terpolyesters of polyhydroxyalkanoates containing high monomeric fractions of 4-hydroxybutyrate and 5-hydroxyvalerate via a novel PHA synthase / Choon Pin Foong, Hideki Abe, Kumar Sudesh // Polymer Degradation and Stability (2019) 163:122-135.
45. Arikawa, H. A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate)depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidusnecator* H16 / S. Sato, T. Fujiki, K. Matsumoto // Journal of Biotechnology (2016) 227:94-102.

- 46.Doi, Y. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyhexanoate) / S. Kitamura, H. Abe. // Macromolecules (1995) 28:4822-4828.
- 47.Gorenflo, V. Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4-Hydroxyvalerate-Containing Polyesters and Characterization of Their Physical and Mechanical Properties/ Schmack, G.; Vogel, R.; Steinbüchel, A. // Biomacromolecules(2001) 2:45-57.
- 48.Martin, C. H. High-titer production of monomeric hydroxyvalerates from levulinic acid in *Pseudomonas putida* / K. L. J. Prather // Journal of Biotechnology (2009) 139:61–67.
- 49.Schmac, G. Biotechnological Production and Characterization of Polyesters Containing 4-Hydroxyvaleric Acid and Medium-Chain-length Hydroxyalkanoic Acids / V. Gorenflo, A. Steinbüchel // Macromolecules (1998) 31:644-649.
- 50.Valentin, H. E. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by Mutants and Recombinant Strains of *Alcaligenes eutrophus* / A. Steinbüchel // Journal of Environmental Polymer Degradation (1995) 3:169-175.
- 51.Жирнов, А.Е. Структура полимеров [Электронный ресурс]: Методическая разработка для теоретического курса и лабораторных работ по высокомолекулярным соединениям / Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений; сост.: Жирнов А.Е., Аржаков М.С. – Москва, 2013. – С. 41.
- 52.Mahansaria, R. Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinemaajinwuensis* (assynonym) ≡ *Natrinemaaltunense* strain RM-G10 / AnusuaDhara, Amit Saha, SaubhikHaldar, Joydeep Mukherjee // International Journal of Biological Macromolecules (2018) 107: 1480–1490.
- 53.Baikar, V. Characterization of Polyhydroxyalkanoate Produced by *Bacillus megaterium* VB89 Isolated from Nisargruna Biogas Plant / Ashwini Rane, RajendraDeopurkar // Applied Biochemistry and Biotechnology (2017) 183:241–253.
- 54.Martínez-Sanz, M. Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial / Marianna Villano, Catarina Oliveira, Maria G.E. Albuquerque, Mauro Majone, Maria Reis, Amparo Lopez-Rubio, Jose M. Lagaron // New Biotechnology (2014) 31:364-376.
- 55.Рафиков, С. Р. Методы определения молекулярных весов и полидисперсности высокомолекулярных соединений / Павлова, С. А., Твердохлебова, И. И./ (1963) 335.
- 56.Arcos-Hernández, M. V. Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHBV) / Bronwyn Laycock, Bogdan C.Donose, Steven Pratt, PeterHalley, SalahAl-Luaibi,

AlanWerker, Paul A.Lant // European Polymer Journal (2013) том 49 № 4 904-913.

57. Волова, Т. Г. Высокомолекулярные соединения / Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения / Структура и свойства / Жила, Н. О., Шишацкая, Е. И., Миронов, П. В. / Серия А / 2013 / том 55 / №7 / С. 775-786.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова  
«9» июля 2020г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Синтез и свойства полигидроксиалканоатов, содержащих мономеры 4-  
гидроксивалерата  
06.04.01 - Биология  
06.04.01.01.– Микробиология и Биотехнология

Научный руководитель  09.07.2020 к.б.н. Н. О. Жила  
Выпускник  09.07.2020 М. Д. Гришкина  
Рецензент  09.07.2020 к.б.н. А. Н. Бояндина

Красноярск 2020