

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Волова Т.Г.

«___» _____ 2022г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез полимера поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират)

бактериями *Cupriavidus necator B-10646* на среде с пальмовым маслом

(тема)

Научный руководитель

подпись, дата

к.б.н., доцент

должность, ученая степень

Н. О. Жила

инициалы, фамилия

Студент ББ18-34Б, №041830777

подпись, дата

Д. А. Гурбанова

инициалы, фамилия

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Синтез полимера поли(3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 на среде с пальмовым маслом» содержит 39 страниц текстового документа, 1 таблицу, 13 иллюстраций, 48 литературных источника.

Ключевые слова: ПГА, полигидроксиалканоаты, полимер, пальмовое масло, 4ГБ, 4-гидроксибутират, 1,4-бутандиол, ϵ -капролактона, эмульгаторы, *Cupriavidus necator*.

Целью данной работы было изучить способности культуры *Cupriavidus necator* В-10646 синтезировать полимер поли(3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират) на среде с пальмовым маслом.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 на пальмовом масле при добавлении ϵ -капролактона.
2. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 на пальмовом масле при добавлении 1,4-бутандиола.
3. Исследовать молекулярно-массовые характеристики синтезированных полимеров.

Пластик наносит серьезный ущерб окружающей среде. Одним из путей решения данной проблемы является изучение и синтез новых биоразлагаемых материалов. Полигидроксиалканоаты являются альтернативой пластмассам нефтяного происхождения. При этом не маловажный факт, что сополимерные ПГА являются более привлекательными для переработки, но делают биотехнологический процесс дорогим. Синтез ПГА на растительных маслах, в том числе и на пальмовом масле в качестве источника углерода более выгоден. У растительных масел высокое молярное содержание углерода, за счет чего потенциальный выход ПГА значительно выше, чем на сахарных субстратах. Таким образом пальмовое масло - альтернативный субстрат, позволяющий экономически выгодно синтезировать сополимерные ПГА.

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	2
Содержание	3
Введение	4
1 Обзор литературы	6
1.1 Характеристика ПГА	6
1.2 Продуценты ПГА	7
1.3 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА	8
1.4 Свойства 4-гидроксибутирата	9
1.5 Синтез ПГА, содержащих мономеры 4ГБ	10
2 Материалы и методы	15
2.1 Культивирование и условия роста бактерий	15
2.2 Определение оптической плотности	16
2.3 Определение концентрации биомассы бактерий	16
2.4 Экстракция полимера	17
2.5 Определение содержания полимера	17
2.6 Определение молекулярных характеристик полимера	18
3 Результаты	19
3.1 Культивирование бактерий <i>Cupriavidus necator</i> В-10646 на пальмовом масле при добавлении 1,4-бутандиола	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	31
Список сокращений	33
Список использованных источников	34

ВВЕДЕНИЕ

Пластик наносит серьезный ущерб окружающей среде, начиная с его производства и заканчивая утилизацией. Глобальное производство полимерных материалов приводит к повышению уровня CO_2 в атмосфере, к растущему количеству отходов. Это связано с высокой прочностью и устойчивостью пластмасс к деградации. Истощение невозобновляемых ресурсов ведет к разрушению механизма саморегулирования биосферы с непредсказуемыми последствиями [1].

Ежегодно в мире производится 300 млн. т пластмасс, время полного распада которых составляет минимум 450 лет. Большинство изделий из них используются однократно. Лишь 5% от объема в конечном итоге подвергается переработке и используется повторно в быту и жизни. Загрязнение планеты пластиковыми отходами приобретает катастрофические масштабы [2].

Одним из способов решения данной проблемы является замена синтетических полимеров новыми материалами, которые способны разрушаться в окружающей среде естественным путем.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода [3]. ПГА считается одним из наиболее перспективных биопластиков, используемых в различных областях: в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине и фармакологии. Эти полимеры являются биоразлагаемыми, биосовместимыми, экологически чистыми материалам и могут быть получены из возобновляемых источников углерода, также ПГА могут способствовать снижению накопления CO_2 в биосфере [4,5]. Добавление мономеров 4-гидроксибутирата (4ГБ) в структуру полимера помогает снизить температуру плавления и кристалличность, что приводит к получению более гибких полимеров, подходящих для коммерческого применения.

Тем не менее, во всем мире производство ПГА ограничено. Причины довольно разнообразны. Высокая стоимость производства, из которой примерно 50% приходится на субстраты-предшественники (обычно чистые сахара и жирные кислоты) ограничивает массовое применение ПГА [6]. Эти микробные полиэфиры, по оценкам, в 3-4 раза дороже, чем синтетические пластмассы, такие как полипропилен и полиэтилен. Кроме того, доступность ПГА для разработки процесса ограничена, и во многих случаях методы обработки должны быть точно настроены на конкретный тип полимера (выбор соответствующих добавок, температурный профиль, адаптированный к оптимальной скорости кристаллизации) [7,8,9].

В последнее время внимание ученых сосредоточено на использовании продуцентов ПГА с высоким выходом ПГА и продуктивностью, используя дешевое, доступное сырьё. Таким образом, было обнаружено, что пальмовое масло и другие растительные масла могут являться отличным источником углерода для производства ПГА. Сравнение теоретического выхода ПГА из масел и жирных кислот ($> 0,65$ г ПГА / г источника углерода) против глюкозы (0.32-0.48 г ПГА / г глюкозы) предполагает, что липиды различного происхождения могут использоваться в качестве субстратов для биотехнологического производства ПГА [10].

Целью данной работы было изучить способности культуры *Cupriavidus necator* В-10646 синтезировать полимер поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират) на среде с пальмовым маслом.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 на пальмовом масле при добавлении ϵ -капролактона.
2. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 на пальмовом масле при добавлении 1,4-бутандиола.
3. Исследовать молекулярно-массовые характеристики синтезированных полимеров.

1 Обзор литературы

1.1 Характеристика ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой большой класс природных биополимеров, которые накапливаются микроорганизмами в виде запасов углерода и энергии при определенных условиях, таких как ограничение азота, фосфора или кислорода, в присутствии избыточного источника углерода. Бактерии накапливают высокое содержание ПГА в виде внутриклеточных гранул. Когда источник углерода в среде исчерпан, накопленные ПГА деполимеризуются, и продукты их разложения могут использоваться в качестве источника углерода и энергии [11].

Впервые ПГА были обнаружены Бейеринком в 1888 г. В 1925 году Лемонг обнаружил и впервые описал ПГА, которые синтезировала культура *Bacillus* [12]. В 1958 г. Макрэй и Уилкинсон доказали, что ПГА в бактериальных клетках играют роль резерва углерода и энергии и синтезируются клетками только в условиях ограниченного роста [13].

Полигидроксиалканоаты по ряду физико-химических свойств сходны с широко применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах и не разрушающимися в природной среде синтетическими полимерами (полипропиленом, полиэтиленом). ПГА нерастворимы в воде, обладают хорошей устойчивостью к гидролитическому воздействию, устойчивы к ультрафиолетовому излучению. Кроме того они характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью. [14]. Биоразрушаемость – это способность любого полимера быстро разрушаться до углекислоты и воды в аэробных условиях. Такие полимеры могут ассимилироваться многими видами микроорганизмов, тем самым, предотвращая их накопление в окружающей среде. Второе свойство – биосовместимость, означает, что ПГА не вызывают токсического воздействия на ткани организма [15].

Полигидроксиалканоаты термопластичны. При нагревании молекулярные цепи в ПГА легко сдвигаются относительно друг друга, в результате этого ма-

териал размягчается и приобретает текучесть. Данное технологическое свойство имеет большую коммерческую ценность, так как позволяет с использованием различных методов (прессования, экструзии) получать из ПГА разнообразные изделия и материалы. Из ПГА возможно получение гибких пленок различной толщины, в том числе полупроницаемых мембран, нитей, нетканых материалов, различных полых форм, таких как бутылки, контейнеры, коробки, а также гелей и клеев. Совокупность характерных свойств делает их перспективными для применения в различных сферах, – медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и других сферах [16, 17].

Производство ПГА в настоящее время осваивают или планируют практически все развитые страны, однако решающим для начала широкомасштабного получения и применения является снижение их стоимости.

1.2 Продуценты ПГА

Список микроорганизмов, способных аккумулировать полигидроксиалканоаты быстро пополняется. К настоящему времени он насчитывает свыше 300 организмов. Среди описанных организмов – аэробные и анаэробные бактерии, гетеротрофы, хемоорганотрофные и фототрофные прокариоты, аэробные и анаэробные фотобактерии, олиготрофные полипростековые бактерии, архебактерии и многие другие [18, 19].

Несмотря на разнообразие изученных микроорганизмов, для промышленного применения рассматривается очень небольшое число продуцентов. Среди них гетеротрофные микроорганизмы, относящиеся к трем таксонам – *Methylotraphus*, *Methylobacterium* и *Pseudomonas*, азотфиксаторы *Azotobacter*, представители рода *Cupriavidus* (ранее известные как *Ralstonia*, *Alcaligenes*, *Wautersia*, *Hydrogenomonas*). Последние относятся к наиболее изученному числу бактерий благодаря тому, что они имеют наиболее развитую внутриклеточную систему синтеза ПГА и могут накапливать значительное количество ПГА

(до 90% сухого веса клеток). Бактерии рода *Cupriavidus* аккумулируют ПГА различной химической структуры при выращивании на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств [20, 21, 22, 23].

1.3 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА

В значительной мере стоимость ПГА определяется затратами на исходное сырье, поэтому одно из магистральных направлений исследований ориентировано в настоящее время на поиск доступных субстратов для их получения. С этой целью в настоящее время активно изучают закономерности и эффективность биосинтеза ПГА уже известными организмами с привлечением новых субстратов, продолжают поиск новых природных штаммов-продуцентов ПГА и конструируют рекомбинантные продуценты, способные усваивать различные субстраты.

Для получения ПГА возможно привлечение разнообразных субстратов. К ним относятся: углекислый газ и водород, сахара, спирты, органические кислоты, отходы спиртовой, сахарной, гидролизной промышленности, производства оливкового и пальмового масла.

В настоящее время чистая фруктоза и глюкоза являются универсальными источниками углерода, используемыми для крупномасштабного производства ПГА. Потенциальными источниками углерода для получения ПГА считаются растительные масла (пальмовое, оливковое, кукурузное, соевое, рапсовое, подсолнечное), а также жирные кислоты [22, 23, 24]. Растительные масла и жирные кислоты имеют преимущество, заключающееся в более низкой стоимости. Также синтез веществ, подобных ПГА, более эффективен при использовании микроорганизмами таких субстратов из-за более высокого удельного молярного содержания в них углерода. Установлено, что при использовании растительного масла экономический коэффициент по субстрату составляет 0,8, тогда как

при использовании глюкозы в качестве единственного источника углерода он снижается до 0,3 [3, 25, 26].

Самый лучший рост – 5.5-5.6 г/л – и накопление полимера – 75-77 % от биомассы – наблюдали при росте *C. necator* H16 на пальмовом масле [27].

До 80% поли(3-гидроксibuтирата) (ПЗГБ) от биомассы продуцировалось *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 и его рекомбинантным штаммом при росте на различных растительных маслах [28].

Успехи в этих исследованиях говорят о необходимости более подробного изучения показателей роста микроорганизмов, способных синтезировать ПГА на растительных маслах.

1.4 Свойства 4-гидроксibuтирата

Поли(4-гидроксibuтират) является прочным термопластом и значительно более гибким, чем синтетические рассасывающиеся полимеры, такие как ПГА и поли-L-лактид (ПЛЛА). Его прочность растяжения сопоставима со сверхвысокомолекулярным полиэтиленом [29]. Механическая прочность П4ГБ увеличивается после растяжения, но материал остается гибким. То же самое не происходит с ПГА или ПЛЛА, механическая прочность которых повышается вместе с хрупкостью полимера [30].

Еще одной интересной особенностью П4ГБ является возможность изменения свойств полимера *in vivo* путем включения другого мономера, такого как 3ГБ, бактериальной ПГА-синтазой. Например, сополимеры 4ГБ и 3ГБ с долей 4ГБ 20-35% являются эластомерными. П4ГБ имеет температуру плавления (T_m) 60°C и температуру стеклования (T_g) 51°C. При расплавлении до 200°C П4ГБ достаточно стабилен и имеет лишь умеренную потерю молекулярной массы [29]. Была исследована термическая деградация в диапазоне от 100 до 200°C для П(3ГБ-со-ГВ) и П(3ГБ-со-4ГБ) с различными мономерными композициями до 71 моль% ГВ и 82 моль% 4ГБ соответственно. Полимеры демонстрировали зависящие от времени изменения молекулярной массы в соответствии

с кинетической моделью случайного разрыва цепи на сложноэфирных группах и считались термически стабильными при температурах до 160 °С. Скорости случайного расщепления не зависели от состава полимерного мономера, но сильно зависели от температуры [31].

Таким образом, П4ГБ имеет большие возможности для термообработки, и методы, применимые к термопластам, могут быть легко использованы для обработки П4ГБ в соответствии с желаемой формой, микроструктурой и свойствами.

В другом исследовании была определена аморфная плотность П4ГБ, которая составляла 1,213 по сравнению с 1,179 для ПЗГБ. Ферментативный анализ деградации П(ЗГБ-со-4ГБ) с различным содержанием 4ГБ (0-90%) проводили с использованием ПГА-деполимеразы из *Ralstonia pickettii* T1. Полимер с фракцией 4ГБ 15% или 24% имел самую высокую скорость деградации, в то время как самая медленная скорость деградации была с использованием полимера с 90% 4ГБ. Скорость деградации ПГА-деполимеразой уменьшалась с уменьшением кристалличности полимера и фракции 3ГБ [32].

Основываясь на исследованиях, П4ГБ, синтезированный в рекомбинантной *E. coli* JM109, экспрессирующей рKSSE5.3, может приводить к сверхвысокой молекулярной массе ($M_w \approx 2,0 - 2,5 \times 10^6$ г моль⁻¹) [33]. Было показано, что уменьшение молекулярной массы приводило к увеличению кристалличности полимера без влияния на температуру плавления и температуру стеклования. Более того, прочность при растяжении и эластичность полимера снижались вместе с уменьшением молекулярной массы. Следовательно, путем тщательного контроля молекулярной массы П4ГБ, механические свойства могут быть изменены в соответствии с предполагаемыми областями применения.

1.5 Синтез ПГА, содержащих мономеры 4ГБ

Полигидроксиалканоаты, содержащие 4ГБ в качестве компонентов, впервые были обнаружены исследовательской группой профессора Дои в конце

1980-х годов, когда *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha*) культивировали с использованием 4-гидроксимасляной кислоты и γ -бутиролактона в качестве источников углерода [34, 35]. Впоследствии биосинтез таких ПГА был достигнут у *Alcaligenes latus*, *Comamonas acidovorans*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Burkholderia sacchari* и других бактерий, которые являются известными производителями ПГА [36, 37, 38].

Сополимеры ПГА, содержащие 3ГБ и 4ГБ [П(3ГБ-со-4ГБ)], могут синтезироваться только в штаммах дикого типа из структурно родственных источников углерода, таких как 4-гидроксимасляная кислота, γ -бутиролактон, 4-хлормасляная кислота, 1,4-бутандиол и другие ω -алкандиолы [39]. Гомополимер П4ГБ почти не производился. В одном из исследований наблюдали производство П(3ГБ-со-4ГБ) у *C. necator* из прекурсоров 4ГБ (например, γ -бутиролактона, 1,4-бутандиола) в качестве уникальных источников углерода в среде, свободной от азота. При добавлении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и цитрата в виде субстратной смеси вместе с 4-гидроксимасляной кислотой, было снижено процентное содержание гомополимера П4ГБ с 16% П(3ГБ-со-13 мол.%4ГБ) до 2%. Метаболизм 4ГБ-КоА, направленный на ацетил-КоА был возможной причиной производства гомополимера П4ГБ. В том же исследовании было показано, что *C. acidovorans* JCM10181 (ранее DS-17) продуцирует гомополимер П4ГБ с накоплением до 28% из 4-гидроксимасляной кислоты и 1,4-бутандиола в качестве единственных источников углерода. *Alcaligenes latus*, который имеет связанное с ростом производство ПГА, произвел П(3ГБ-со-45 мол.% 4ГБ) из сахарозы и γ -бутиролактона [40].

В другой публикации сополимер с более высокой фракцией 4ГБ (от 13 до 83 мол.% 4ГБ) синтезировали в *A. latus* из 4-гидроксимасляной кислоты и 3-гидроксимасляной кислоты в среде, содержащей $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Однако рост клеток уменьшался вместе с увеличением концентрации 4-гидроксимасляной кислоты в среде и более высоким содержанием 4ГБ в полимере. *Comamonas acidovorans* и *A. latus* не способны расти на предшественниках 4ГБ, что указы-

вает на ограниченный метаболизм 4ГБ-КоА до ацетил-КоА. Это можно объяснить образованием ПГА с высокой долей 4ГБ в *C. acidovorans* [41].

C. necator также не способен расти ни на 4-гидроксимасляной кислоте, ни на 1,4-бутандиоле, этот штамм производит сополимеры из этих источников углерода [41].

Метаболизм 4ГБ в *C. necator* был изучен Валентином в 1995 г. Удалось выделить спонтанный мутант *C. necator* HF39, обозначенный SK4040, который показал рост на 4-гидроксимасляной кислоте. После мутагенеза были получены два класса вторичных мутантов, один из которых не был способен расти на 4-гидроксимасляной кислоте, а второй оказался с более слабым ростом на 4-гидроксимасляной кислоте по сравнению с SK4040. Геномный фрагмент, выделенный из SK4040, отличался от фрагмента 4ГБ– мутантов. Клонирование такого фрагмента в *C. necator* H16 придало дикому типу способность расти на 4-гидроксимасляной кислоте. Анализ последовательности ДНК показал наличие структурного гена, кодирующего дегидрогеназу 4-гидроксимасляной кислоты, а ферментативный анализ показал существование активной сукцинат-семиальдегид дегидрогеназы [42].

Таким образом, считалось, что деградация 4ГБ происходит через сукцинатный полуальдегид и сукцинат с последующей деградацией через цикл лимонной кислоты. Кроме того, не было обнаружено доказательств прямого преобразования 4ГБ в 3ГБ [42].

Тщательное исследование ПГА-синтазы (PhaССа) *C. acidovorans* JCM10181 показало, что причиной эффективного включения 4ГБ в фазу является бактериальный метаболизм, а не предпочтение PhaССа 4ГБ-СоА в качестве субстрата. Было показано, что эффективное включение 4ГБ *C. acidovorans* JCM10181 зависит от подаваемого предшественника 4ГБ (то есть 4-гидроксимасляной кислоты, 1,4-бутандиола и γ -бутиролактона), среди которых подача 4-гидроксимасляной кислоты приводила к получению полимера с наибольшей долей 4ГБ (96 мол.%) и накоплением до 25% от массы сухих клеток [43, 44]. Кроме того, было обнаружено, что пониженная аэрация культуры и

более высокая концентрация инокулята в среде, свободной от азота, содержащей предшественник 4ГБ, увеличивают фракцию 4ГБ в полимере. Увеличение доли 4ГБ (от 12,3 до 51,8 мол.%) в полимере, синтезированном в *C. necator*, было получено, когда в среду добавляли небольшие количества пропионата вместе с γ -бутиролактоном [45]. Активность ПГА-синтазы была в значительной степени индуцирована добавлением пропионата, а также концентрацией ацетил-КоА. Было предложено, чтобы избыток ацетил-КоА ингибировал реакцию кетоллиза и, таким образом, снижал лизис 4ГБ-КоА до двух молекул ацетил-КоА, что следовательно приводило к увеличению фракции 4ГБ, доступной для полимеризации. Подтверждая это предположение, тот же эффект во фракции 4ГБ наблюдался при добавлении ацетата [46].

Влияние добавления растворенного кислорода (DOT) (2 и 20%) и добавления пропионовой кислоты (2 г/л^{-1}) на накопление ПГА и включения 4ГБ, полученного в *C. necator* DSM 545, исследовали в периодическом культивировании с высокой плотностью клеток [47]. Отходы глицерина использовали в качестве источника углерода для роста и генерации 3ГБ, а γ -бутиролактон в качестве предшественника 4ГБ. Более высокое содержание кислорода (20%) благоприятствовало накоплению ПГА и не увеличивалось в присутствии пропионовой кислоты. С другой стороны, фракция 4ГБ была в значительной степени увеличена за счет добавления пропионовой кислоты в качестве стимулятора 4ГБ и за счет продления времени культивирования. Однако подача пропионовой кислоты приводила к получению терполимера, состоящего из 3ГБ, 4ГБ и 3-гидроксивалерата (3ГВ). Наибольшая доля 4ГБ, составляющая 30,6 мол.%, в терполимере, содержащем 6,7 мол.% 3ГВ, была достигнута при добавлении пропионовой кислоты и DOT в концентрации 2%.

Оптимизируя условия культивирования, полимер, содержащий только 4ГБ, был получен бактериями *H. Pseudoflava* [48]. Эксперимент состоял из трех стадий культивирования:

1 стадия - образование биомассы на среде LB с накоплением ПЗГБ (10 мас.%);

2 стадия - деградация остаточного ПЗГБ в среде, свободной от углерода, содержащей сульфат аммония;

3 стадия - синтез гомополимера П4ГБ (19,6 мас.%, 0,474 г/л⁻¹) в среде, свободной от азота, содержащей γ -бутиролактон.

Было отмечено, что активность дегидрогеназы 4-гидроксимасляной кислоты постепенно увеличивалась с течением времени в присутствии γ -бутиролактона. При одностадийной культивации требовалось не менее 120 ч для накопления 1,3 мас.% П(ЗГБ-со-63 мол.% 4ГБ) из γ -бутиролактона. Активность дегидрогеназы 4-гидроксимасляной кислоты составила 0,089 и 0,557 Ед мг⁻¹ при 96 ч и 144 ч одноступенчатой культивации соответственно. Отсутствие включения ЗГБ в полимер при трехступенчатом культивировании было связано с низкой активностью дегидрогеназы 4-гидроксимасляной кислоты в течение короткого периода накопления ПГА (36 ч), что приводило к низким уровням ацетил-КоА.

Таким образом, полигидроксиалканоаты являются альтернативой пластмассам нефтяного происхождения, считаются одними из наиболее перспективных биопластиков, используемых в различных областях: в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине и фармакологии. Эти полимеры являются биоразлагаемыми, биосовместимыми, экологически чистыми материалам и могут быть получены из возобновляемых источников углерода. Добавление мономеров 4-гидроксибутирата в структуру полимера помогает снизить температуру плавления и кристалличность, что приводит к получению более гибких полимеров. Методы, применимые к термопластам, могут быть легко использованы для обработки полимеров с включением 4ГБ в соответствии с желаемой формой, микроструктурой и свойствами.

2 Материалы и методы

2.1 Культивирование и условия роста бактерий

В работе использовали штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* В-10646. Бактерий выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля, которая состоит из: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (натрий фосфорнокислый) - 9,0 г/л; KH_2PO_4 (калий фосфорнокислый) - 1,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (сульфат магния) - 0,2 г/л; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \times \text{H}_2\text{O}$ (железо лимоннокислое) – 5 г/л. Микроэлементы вводятся по прописи Хоагланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 - 0,288 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л; NiCl_2 - 0,008 г/л.

Инокулят получали методом ресуспендирования хранящейся на агаризованной среде музейной культуры. В коническую колбу объемом 500 мл добавляли 200 мл фосфатного буфера, после чего стерилизовали. В стерильных условиях в колбу переносили музейную культуру *Cupriavidus necator* В-10646, хранящуюся на скошенной агаризованной среде в холодильнике. Далее в колбу добавляли: среду Шлегеля и фруктозу в концентрации 10-15 г/л. Колбу установили в термостатируемый шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 на 24 часа, при 30°C и 200 об/мин.

Культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 проводили в стеклянных колбах объемом 0,5 л. В колбы добавляли 200 мл фосфатного буфера и 20 мл инокулята. Для процесса ферментации использовали термостатируемый шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США), культивирование проводили при 30 °С и 200 об/мин. Время культивирования составляло 72 ч.

В роли источников азота были использованы хлорид аммония NH_4Cl и мочевины $((\text{NH}_2)_2 \text{CO})$ в концентрации 1 г/л. В качестве основного источника углерода использовали пальмовое масло в концентрации 10 г/л. Колбы с паль-

мовым маслом нагревали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 50 °С 30 мин. В качестве эмульгаторов использовали Tween 80 и лецитин в концентрации 2 г/л. Среду с пальмовым маслом эмульгировали 2 мин при 7 тыс. об/мин. В колбы с эмульгатором добавляли ϵ -капролактон и 1,4-бутандиол в концентрации 2 г/л на 0 ч культивирования. На протяжении культивирования периодически отбирали пробы для анализа.

2.2 Определение оптической плотности

Оптическую плотность культуры определяли на спектрофотометре UNICO-2100 при $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм); для измерения оптической плотности к культуре бактерий добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:5.

2.3 Определение концентрации биомассы бактерий

Концентрацию биомассы бактерий определяли с помощью весового метода. Для этого 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 10 мин при 7000 об/мин. Затем промывали клетки гексаном и вновь центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). Данную процедуру повторяли дважды, после этого осадок промывали дистиллированной водой. Полученную биомассу переносили в предварительно доведенные до постоянного веса бюксы. Бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 95 °С 24 ч. После этого бюксы охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

2.4 Экстракция полимера

Для выделения полимера применяли следующий метод: пробы бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 7 мин при 6000 об/мин. Сливали надосадочную жидкость, полученный осадок переносили в плоскодонную коническую колбу с притертой крышкой, к осадку добавляли этанол и хлороформа. Экстракцию проводили в течение 24 часов при 30 °С. Затем полученный раствор пропускали через бумажный фильтр в круглодонную колбу и растворитель удаляли на вакуумном роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI). Осаждение полимера проводили с помощью гексана.

2.5 Определение содержания полимера

Общее содержание полимера в биомассе определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A с масс детектором Agilent Technologies 5975C («Agilent», США). Для этого к навеске 0,0039 - 0,0045 г сухой биомассы добавляли 1 мл внутреннего стандарта (раствор 50 мг бензойной кислоты в 100 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Данную смесь выдерживали на водяной бане под обратным холодильником в течение 2 ч 40 мин, при температуре 80 °С. После этого к пробе добавляли 1 мл дистиллированной воды и оставляли в холодильнике для расслоения фаз.

Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий, скорость 1,2 мл/мин. Капиллярная колонка DB-35MS, длина – 30 м, диаметр – 0.25 мм. Температура ввода пробы – 220 °С; начальная температура хроматографирования – 55 °С; подъем температуры до 310 °С со скоростью 10 °С/мин, изотермальный режим – 5 мин; температура детектора – 150 °С; температура источника ионов – 230 °С; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными

массами от 30 до 550 аму при 0,5 сек/скан. Идентификацию мономеров образующих ПГА, проводили по масс-спектрам и временам удерживания.

2.6 Определение молекулярных характеристик полимера

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера определяли с использованием гелепроникающей хроматографии (Agilent Technologies 1260 Infinity, США), используя полистироловые стандарты (Fluka, Швейцария, Германия). Определяли среднечисловую (M_ч) и средневесовую (M_в) молекулярные массы, полидисперсность (D).

3 Результаты

3.1 Культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на пальмовом масле при добавлении 1,4-бутандиола

Изъятые страницы 19-30 в связи с авторскими правами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследован рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, накопление полимера и содержания 4ГБ при культивировании на пальмовом масле при использовании различных предшественников 4ГБ (1,4-бутандиола, ϵ -капролактона), источников азота (мочевина, хлорид аммония) и эмульгаторов (Tween-80, лецитин).
2. Показано, что при использовании 1,4-бутандиола в отсутствие эмульгаторов концентрация биомассы и содержание полимера на обоих источниках азота было сопоставимым и составляло соответственно 4,8-5,3 г/л и 33,3-38,9% от веса сухой биомассы. Добавление эмульгаторов привело к увеличению содержания полимера до 48-69%, однако практически не повлияло на концентрацию биомассы, за исключением эксперимента с добавлением лецитина (биомасса 7,8 г/л). Добавление 1,4-бутандиола не приводило к синтезу сополимера с 4ГБ.
3. Показано, что при использовании ϵ -капролактона в отсутствие эмульгаторов концентрация биомассы и содержание полимера на мочеvine были выше, чем при использовании хлорида аммония: соответственно 5,8 г/л и 50,6%, на хлориде аммония: 4 г/л и 28,7%. Добавление эмульгаторов не привело к увеличению содержания полимера и практически не повлияло на концентрацию биомассы, за исключением эксперимента с добавлением лецитина (концентрация биомассы составила 6,7 г/л, содержание полимера - 62,9%). Добавление ϵ -капролактона привело к синтезу сополимера с 4ГБ, наилучший результат был достигнут при добавлении лецитина, содержание 4ГБ составило 22,8 мол.%.
4. Исследованы молекулярно-массовые характеристики полученных образцов ПГА. Показано, что при использовании ϵ -капролактона на среде с мочевиной в отсутствие эмульгаторов M_w была ниже (450 кДа), чем на среде с хлоридом

аммония (550 кДа). В присутствии эмульгаторов отмечено увеличение Мв при сохранении тенденции более высокой Мв на среде с хлоридом аммония. Добавление в среду 1,4-бутандиола вне зависимости от источника азота и присутствия эмульгатора привело к более низким показателям Мв (126-303 кДа) по сравнению с ϵ -капролактоном.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЗГБ	3-гидроксibuтират
ЗГВ	3-гидроксивалерат
4ГБ	4-гидроксibuтират
Мв	Средневесовая молекулярная масса
Мч	Среднечисловая молекулярная масса
ПЗГБ	Поли-3-гидроксibuтират
П4ГБ	Поли-4-гидроксibuтират
ПГА	Полигидроксиалканоаты

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Виноградова, О. Н. Биосинтез и свойства ПГА, содержащих мономеры 3-гидрокси-4-метилвалерата / О. Н. Виноградова, Т. Г. Волова ; Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Красноярск : СФУ, 2016. – 145-152 с.
2. Волова, Т. Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов / Т. Г. Волова ; Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Красноярск : СФУ, 2015. – 131-151 с.
3. Жила, Н. О. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* в-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Н.О. Жила, Т.Г. Волова, Г.С. Калачева ; Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Красноярск : СФУ, 2014. – 161-173 с.
4. Киселев Е. Г. Техничко-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов / Е.Г. Киселев, О.Н. Шишацкий, С. Э. Дж ; Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Красноярск : СФУ, 2012. – 161-173 с.
5. Rana, A. Advances in PHAs production / A. Rana, A. Sukan, M. Safari, I. Roy, T. Keshavarz // Chemical engineering transactions. – 2013. – Т. 32. – С. 931-936.
6. Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Braunegg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner // New biotechnology. – 2017. Т. 37,. – С. 24-38.
7. Kourmentza, C., Placido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., et al. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production // Bioengineering (Basel). – 2017. Т. 4. – №. 2. – С. 55.

8. Zhang, L., Shi, Z. Y., Wu, Q., and Chen, G. Q. Microbial production of 4-hydroxybutyrate, poly-4-hydroxybutyrate, and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by recombinant microorganisms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – T. 84. – №. 5. – C. 909-916.
9. Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., and Alvarez, V. A. Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging // *Express Pol. Lett.* – 2014. – C. 791–808.
10. Thuoc, D.V. Bioconversion of Crude Fish Oil Into Poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia* sp. M91. / D.V. Thuoc, V.T. Anh // *Appl Biochem Microbiol.* - 2021. – T. 57. – C. 219–225.
11. Anderson, A. J., Dawes E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates // *Microbiological reviews.* – 1990. – T. 54. – №. 4. – C. 450-472.
12. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // *Proc. Biochem.* - 2004. – C. 607 – 619.
13. Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? / J. Możejko-Ciesielska, R. Kiewisz // *Microbiological research.* – 2016. – T. 192. – C. 271-282.
14. Sato, S. Regulation of 3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oil by using butyrate as a cosubstrate/ S. Sato, H. Maruyama, T. Fujiki, K. Matsumoto // *J. Biosci. Bioeng.,* - 2015. – C. 246–251.
15. Chen, G.Q. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications.* Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. - 2010. – 449 c.
16. Luzier, W. D. Materials derived from biomass/biodegradable materials // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1992. – T. 89. – №. 3. – C. 839-842.

17. Volova, T.G., Shishatskaya E.I., Sinsky A.J. Degradable Polymers: Production, Properties and Applications. New York: Nova Science Publ. - 2013. – С. 1-380.
18. G.Q. Chen, X.R. Jiang, Y. Guo. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA) // Synthetic and Systems Biotechnology. - 2016-T.1. – С. 236-242.
19. Sabbagha Farzaneh Production of poly-hydroxyalkanoate as secondary metabolite with main focus on sustainable energy/ Farzaneh Sabbagha, Ida Idayu Muhamada. //Renewable and Sustainable Energy Reviews . - 2017. – С. 95–104.
20. Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение : монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск : Красноярский писатель. – 2011. – 392 с
21. Volova, T. Cell growth and PHA accumulation from CO₂ and H₂ of a hydrogenoxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646 / T.Volova, , E. Kiselev, , E. Shishatskaya, , Zhila, N. Boyandin, A. Syrvacheva, D., O. Vinogradova, G. Kalacheva, A. Vasiliev, I.Peterson, //Bioresour. Technol. - 2013. – С. 215–222.
22. Sen, K. Y., Hussin M. H., Baidurah S. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – Т. 17. – С. 51-59.
23. Volova, T. et al. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs // PLoS One. – 2014. – Т. 9. – №. 2. – С.87-551.
24. Akiyama, M., Tsuge T., Doi Y. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation //Polymer Degradation and Stability. – 2003. – Т. 80. – №. 1. – С. 183-194.

25. Жила, Н. О. Биосинтез поли (3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) бактериями *Cupriavidus necator* B-10646, культивируемыми на смеси из олеиновой кислоты и предшественников 3-гидроксивалерата // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2020. – Т. 13. – №. 3.
26. Marangoni, C., Furigo A., Falcão de Aragão G. M. Oleic acid improves poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid // *Biotechnology Letters*. – 2000. – Т. 22. – №. 20. – С. 1635-1638.
27. Md. Iqbal N., Amirul A. A. Synthesis of P (3HB- co- 4HB) copolymer with target- specific 4HB molar fractions using combinations of carbon substrates // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2014. – Т. 89. – №. 3. – С. 407-418.
28. Fukui, T. et al. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1998. – Т. 49. – №. 3. – С. 333-336.
29. Martin, D. P., Williams S. F. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial // *Biochemical engineering journal*. – 2003. – Т. 16. – №. 2. – С. 97-105.
30. Williams, S. F., Martin D. P., Moses A. C. The history of GalaFLEX P4HB scaffold // *Aesthetic surgery journal*. – 2016. – Т. 36. – №. suppl_2. – С. 33-42.
31. Kunioka, M., Doi Y. Thermal degradation of microbial copolyesters: poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) // *Macromolecules*. – 1990. – Т. 23. – №. 7. – С. 1933-1936.
32. Mitomo, H. et al. Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Comamonas acidovorans* // *Polymer*. – 2001. – Т. 42. – №. 8. – С. 3455-3461.
33. Boesel, L. F. et al. The effect of molecular weight on the material properties of biosynthesized poly (4-hydroxybutyrate) // *International journal of biological macromolecules*. – 2014. – Т. 71. – С. 124-130.
34. Kurdikar, D. L. et al. High temperature PHA extraction using PHA-poor solvents : пат. 6087471 США. – 2000.

35. Doi, Y., Segawa A., Kunioka M. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus* // International Journal of Biological Macromolecules. – 1990. – T. 12. – №. 2. – C. 106-111.
36. Choi M. H., Song J. J., Yoon S. C. Biosynthesis of copolyesters by *Hydrogenophaga pseudoflava* from various lactones // Canadian journal of microbiology. – 1995. – T. 41. – №. 13. – C. 60-67.
37. Cesário, M. T. et al. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone // International journal of biological macromolecules. – 2014. – T. 71. – C. 59-67.
38. Mendonça, T. T. et al. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates // Journal of applied microbiology. – 2014. – T. 116. – №. 4. – C. 815-829.
39. Saito, Y. et al. Microbial synthesis and properties of poly (3- hydroxybutyrate- co- 4- hydroxybutyrate) // Polymer international. – 1996. – T. 39. – №. 3. – C. 169-174.
40. Kourmentza, C. et al. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production // Bioengineering. – 2017. – T. 4. – №. 2. – C. 55.
41. Kang, C. K. et al. Structure and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Alcaligenes latus* // Biotechnology letters. – 1995. – T. 17. – №. 6. – C. 583-588.
42. Valentin, H. E. et al. Metabolic pathway for biosynthesis of poly (3- hydroxybutyrate- co- 4- hydroxybutyrate) from 4- hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* // European journal of biochemistry. – 1995. – T. 227. – №. 1- 2. – C. 43-60.
43. Sudesh, K., Fukui T., Doi Y. Genetic analysis of *Comamonas acidovorans* polyhydroxyalkanoate synthase and factors affecting the incorporation of 4-

- hydroxybutyrate monomer //Applied and environmental microbiology. – 1998. – T. 64. – №. 9. – C. 3437-3443.
- 44.Lee, W. H., Azizan M. N. M., Sudesh K. Effects of culture conditions on the composition of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans* //Polymer Degradation and Stability. – 2004. – T. 84. – №. 1. – C. 129-134.
- 45.Lee, Y. H., Kang M. S., Jung Y. M. Regulating the molar fraction of 4-hydroxybutyrate in poly (3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Ralstonia eutropha* using propionate as a stimulator //Journal of bioscience and bioengineering. – 2000. – T. 89. – №. 4. – C. 380-383.
- 46.Kim, J. S., Lee B. H., Kim B. S. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* //Biochemical engineering journal. – 2005. – T. 23. – №. 2. – C. 169-174.
- 47.Cavalheiro, J. M. B. T. et al. Effect of cultivation parameters on the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol // Bioresource Technology. – 2012. – T. 111. – C. 391-397.
- 48.Choi, M. H., Yoon S. C., Lenz R. W. Production of poly (3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly (4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava* //Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – T. 65. – №. 4. – C. 1570-1577.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

/Заведующий кафедрой



Волова Т.Г.

«24» июня 2022г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез полимера поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират)

бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 на среде с пальмовым маслом

(тема)

Научный руководитель


подпись, дата

к.б.н., доцент
должность, ученая степень

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Студент ББ18-34Б, №041830777


подпись, дата

Д. А. Гурбанова
инициалы, фамилия

Красноярск 2022