

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  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Влияние источников азота на синтез полигидроксиалканоатов бактериями  
*Cupriavidus necator* B-10646 на олеиновой кислоте

Руководитель \_\_\_\_\_ к.б.н., доцент Н. О. Жила  
Подпись, дата Должность, ученая степень Инициалы, фамилия

Выпускник \_\_\_\_\_ Т. Р. Крикунова  
Подпись, дата Инициалы, фамилия

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа по теме «Влияние источников азота на синтез полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 на олеиновой кислоте» содержит 40 страниц текстового документа, 50 использованных источников, 4 таблицы и 15 рисунков.

Ключевые слова: *CUPRIAVIDUS NECATOR*, ПОЛИМЕР, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-3ГИДРОКСИВАЛЕРАТ), МОЧЕВИНА, ХЛОРИД АММОНИЯ, СУЛЬФАТ АММОНИЯ, ОЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА.

Целью данной работы являлось исследовать влияние источников азота на рост клеток бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез полимера на олеиновой кислоте. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать накопление биомассы и полимера у бактерий при культивировании на олеиновой кислоте и различных источниках азота (мочевина, хлорид аммония, сульфат аммония, ацетат аммония);
- 2) Исследовать синтез сополимеров П(ЗГБ-со-ЗГВ) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 при различных режимах внесения в среду валерата калия;
- 3) Исследовать молекулярно-массовые характеристики синтезированных полимеров;

Актуальность данной работы заключается в следующем:

Полимеры из нефтехимического сырья представляют собой актуальную экологическую проблему. Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются перспективной альтернативой традиционным пластмассам. Однако, стоимость биопластиков напрямую зависит от стоимости субстратов, поэтому всестороннее изучение стратегий культивирования может ускорить процесс перехода от нефтехимических пластмасс к биоразлагаемым пластикам.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>Раздел 1. Обзор литературы</b> .....	6
Микроорганизмы-продуценты полигидроксиалканоатов .....	6
Физические свойства ПГА .....	7
Химические свойства ПГА .....	7
Биосинтез ПГА .....	8
Производство ПГА.....	9
Биоразлагаемость ПГА .....	10
Получение и применение ПГА .....	11
1.8. Влияние азота на синтез ПГА.....	12
1.9. Влияние олеиновой кислоты на синтез ПГА бактериями .....	12
1.10. Влияние олеиновой кислоты и валерата калия на синтез ПГА .....	13
<b>Раздел 2. Материалы и методы</b> .....	14
2.1. Водородные бактерии <i>Cupriavidus necator</i> .....	14
2.2. Культивирование бактерий <i>C.necator</i> .....	14
2.3. Измерение оптической плотности.....	15
2.4. Измерение концентрации источника азота .....	15
2.5. Определение концентрации биомассы .....	15
2.6. Определение веса полимера.....	16
2.7. Определение содержания и состава полимера .....	16
2.8. Определение остатка олеиновой кислоты.....	16
2.9. Определение экономического коэффициента.....	17
2.10. Определение молекулярно-весовых характеристик полимера. ....	17
<b>Раздел 3. Результаты и обсуждение</b> .....	19
3.1. Исследование роста бактерий <i>C. necator</i> В10646 и накопления полимера на олеиновой кислоте и различных источниках азота .....	19
3.2. Накопление биомассы <i>C. necator</i> В10646, содержание полимера в клетке, при добавлении валерата калия на 0 час культивирования.....	22
3.3. Накопление биомассы <i>C. necator</i> В10646, содержание полимера в клетке, при добавлении валерата калия на 24 час .....	25

3.4. Накопление биомассы <i>C. necator</i> В10646, содержание полимера в клетке, при дробном добавлении валерата .....	28
3.5 Молекулярная масса сополимера поли(3-гидроксибутирата- <i>co</i> -3-гидроксивалерата) на разных источниках азота при разных режимах добавления валерата калия.....	31
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	33
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	34
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	35

## ВВЕДЕНИЕ

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот (т.н. биопластики), которые обладают спектром полезных свойств, включая биосовместимость и биоразрушаемость. [1]. Полимеры синтезируются внутри различных микроорганизмов в качестве запаса углерода и энергии, и его синтез зависит от условий окружающей среды, например, дефицита азота, фосфата или кислорода. Эти биополимеры привлекли большое внимание из-за их сходных свойств с обычными пластмассами нефтехимического происхождения [2] в дополнение к их биосовместимости и биоразлагаемости. Таким образом, коммерциализация этих биополимеров может решить серьезные экологические проблемы, вызванные пластмассами нефтехимического происхождения. [3] Полимеры, получаемые из природного сырья или синтезируемые микроорганизмами, в отличие от нефтепродуктов, практически не вносят вклад в пополнение парниковых газов и глобальное потепление. Одно из преимуществ использования биоразлагаемых полимеров на биологической основе – возможность помочь обновить «углеродный цикл», или «реинкарнацию углерода». [1] Однако, внедрению биополимера в широкое производство препятствует экономический фактор.

Целью данной работы было исследовать влияние источников азота на рост клеток бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез полимера на олеиновой кислоте

## Раздел 1. Обзор литературы

### Микроорганизмы-продуценты полигидроксиалканоатов

*Bacillus megaterium* – это грамположительные палочковидные бактерии, одни из первых исследованных микроорганизмов, способных продуцировать ПГА. В 1950-х годах было установлено, что бактерии *Bacillus megaterium* накапливают П(ЗГБ) при высоком соотношении углерода и азота в среде, и напротив, полимер потребляется бактериями в отсутствие источника энергии и экзогенного углерода. [4]. Однако до 1970-х годов ПГА рассматривались исключительно как запасное вещество микроорганизмов.

Следующей исследованной бактерией является *Azotobacter vinelandii*. Благодаря изучению данного микроорганизма было установлено, что процесс синтеза ПГА у данного вида связан с азотфиксацией. *A. vinelan* не является оптимальным продуцентом ПГА из-за низкой стабильности процесса синтеза и накопления в клетках бактерий полисахаридов, что осложняет экстракцию[5].

*Cupriavidus necator* – один из самых изученных видов микроорганизмов, синтезирующих ПГА. Бактерии вида *C. necator* способны расти на различных субстратах (в том числе отходах производств), использовать одновременно органические и неорганические субстраты в качестве источников углерода и энергии. Кроме того, *C. necator* способен переключаться между автотрофным и гетеротрофным питанием, используя как органические соединения, так и  $H_2$ ,  $CO_2$  и  $O_2$  в отсутствие органических кислот, углеводов или липидов. [6]. Таким образом, данный микроорганизм имеет большой потенциал для коммерческого производства, поскольку помимо активного роста способны накапливать до 84% ПГА от сухой биомассы [7,8].

Еще одним коммерчески привлекательными микроорганизмом является *Haloferax mediterranei*. Микроорганизм способен накапливать П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) без предшественников. Кроме того, бактерии нуждаются в высокой концентрации солей в среде (100-350 г/л), что делает субстрат непригодным для роста и развития негалофильных бактерий. Таким образом, при выращивании

*H. mediterranei* не требуется стерилизация, что существенно упрощает и удешевляет синтез ПГА в промышленных масштабах [9].

### **Физические свойства ПГА**

В отличие от прочих биопластиков (например, полимолочная кислота), ПГА устойчивы к ультрафиолетовому излучению, обладают низкой водопроницаемостью, выдерживают температуру до 180 °С. Кристалличность может достигать 70%. Показатели ударной вязкости и гибкости зависят от процентного содержания 3ГВ в полимере. Также ПГА, имеющие в составе мономеры 3ГБ 3ГВ и 4ГБ, обладают пониженной температурой плавления и повышенным временем кристаллизации. ПГА растворимы в галогенированных растворителях, таких как хлороформ, дихлорметан или дихлорэтан. [10]

Физические свойства биополимеров напрямую зависят от вида бактерий-продуцентов, состава среды, длины углеродного скелета и мономерного состава. ПГА различного состава характеризуются разными физико-химическими свойствами: термопластичностью, прочностью на растяжение [11], способностью образовывать высокопрочные волокна и пленки, способностью к большим длительно развивающимся деформациям, способностью к набуханию и растворению, биосовместимостью [12].

### **Химические свойства ПГА**

ПГА являются запасными веществами бактерий. Гранулы полимера, хранящиеся внутри клеток, хорошо видны под электронным микроскопом. Полигидроксиалканоаты представляют собой линейные полиэфирные полимеры, состоящие из мономеров гидроксикислот. Наиболее часто встречающиеся мономеры представляют собой 3-гидроксикислоты с длиной углерода от C3 до C14.[13]

Наиболее распространенным ПГА является поли(3-гидроксибутират). Это сложный полиэфир с повторяющимся звеном 3-гидроксибутирата. П(ЗГБ) представляет собой жесткий и негибкий гомополимер.[14]

ПГБ может окисляться до углекислого газа и воды с выделением большого количества энергии.[15]

Большинство полигидроксиалканоатов, за исключением П(ЗГБ), содержат два или более различных мономера. В зависимости и природы источника углерода, бактерии способны включать в ПГА более 100 различных гидроксильированных мономеров. [16]

## **Биосинтез ПГА**

Начиная с ацетил-КоА, П(ЗГБ) синтезируется в три стадии. Ацетил-КоА превращается в ацетоацетил-КоА под действием фермента 3-кетотиолазы, который затем восстанавливается до 3-гидроксибутирил-КоА под действием ацетоацетил-КоА-редуктазы.[17] Фермент ПГА-синтаза отвечает за присоединение остатков 3-гидроксибутирата к растущей цепи П(ЗГБ).

Ферменты биосинтеза ПГБ имеют конститутивную природу. Таким образом, ферментативный аппарат синтеза П(ЗГБ) постоянно присутствует в клетке. [17-20]

Во время фазы активного роста ацетил-КоА окисляется в цикле Кребса. Кроме того, свободный кофермент А ингибирует 3-кетотиолазу, поэтому синтезируется очень мало П(ЗГБ). Когда рост прекращается или ограничивается снижением концентрации питательных веществ, работа цикла Кребса (т.е. окисление ацетил-КоА) снижается. Это в основном связано с ингибированием цитратсинтазы НАДН.[21]

Снижение концентрации кофермента А снимает ингибирование 3-кетотиолазы. Это позволяет использовать ацетил-КоА для производства П(ЗГБ). Поставка восстанавливающих эквивалентов, необходимых ферменту ацетоацетил-КоА-редуктазе, также регулирует синтез П(ЗГБ).

П(ЗГБ) может расщепляться до ацетил-КоА и метаболизироваться через цикл Кребса. Это происходит, когда организм лишен источников энергии, обеспечивающих углерод. П(ЗГБ) расщепляется деполимеразой с образованием 3-гидроксibuтирата. НАДН является ингибитором последующей реакции, катализируемой ферментом 3-гидроксibuтиратдегидрогеназой, т.е. образования ацетоацетата из 3-гидроксibuтирата. [22-25]

## **Производство ПГА**

Поли(3-гидроксibuтират) в основном производится путем периодического культивирования. Производство П(ЗГБ) происходит при избытке источника углерода и ограничении некоторых других необходимых питательных веществ, таких как источник азота, фосфора или серы. [26]

Различают две отдельные фазы: фазу роста и фазу накопления полимера. Когда фаза роста прекращается из-за истощения питательных веществ, начинается синтез полимера (П(ЗГБ)). Также возможно производить полимер, ограничивая поступление кислорода к аэробным бактериям. [27]

Следующим этапом в производстве ПГА является извлечение полимера. В настоящее время известно несколько основных методов экстракции ПГА. Один из них - экстракция с использованием таких растворителей, как хлороформ, дихлорметан, пропилен и дихлорэтан.

Другим направлением экстракции ПГА является извлечение побочных компонентов биомассы. Для этого используются такие детергенты, как SDS, ES-702 и AOS-40b. [28]

## Биоразлагаемость ПГА

Среди различных биоматериалов, доступных для тканевой инженерии и терапевтических применений, полигидроксиалканоаты обладают свойствами, представляющими интерес для медицинских применений, благодаря их высокой биосовместимости и биоразлагаемости, а также их различным термомеханическим свойствам. Микробные полиэфиры поли-3-гидроксибутират (П(ЗГБ)), поли(3-гидроксивалерат) (П(ЗГВ)) и поли[3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат] (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)) наиболее изучены для применения в ортопедии в качестве костных имплантатов, которые не вызывают хроническую воспалительную реакцию [29].

П(ЗГВ) изучался многими исследователями в связи с его биосовместимостью с костной тканью. Путем деградации *in vivo* П(ЗГБ) образует D-3-гидроксибутират, в норме обнаруживаемый в крови человека [30]. Биоразлагаемость ПГА обусловлена их стереоспецифической структурой со сложноэфирными связями, которая может подвергаться ферментативному разложению в биологической среде. Однако для различных медицинских применений необходимо улучшить их путем функционализации [31,32].

Производство полигидроксиалканоатов (ПГА) имеет особенности, отличные от других известных микробных полимеров (например, полисахаридов). Одним из интересных свойств их биологического синтеза является возможность использования предшественников для индуцирования структуры биополимера. Однако опубликованные результаты относительно выхода ферментации содержат относительно низкие уровни конечных концентраций биомассы и содержания полимера, возможно, из-за условий культивирования и состава среды, что ограничивает эффективность процесса. Новые генно-инженерные штаммы, альтернативные субстраты, смешанные культуры, периодическая или непрерывная работа могут преодолеть такие ограничения.[33-36]

Другими проблемами использования полимера являются нерастворимость в воде, внутриклеточный характер биополимера, требующий сложных и трудных и дорогостоящих стадий выделения и очистки, особенно для медицинских применений, требующих чистоты (хирургическая реконструкция и тканевая инженерия, включая прямой контакт с кровью). Гидрофобность изделий из полимера можно улучшить за счет гидрофильной функционализации, что расширит область применения ПГА.[37]

Хотя на сегодняшний день только поли(3-гидроксibuтират) одобрен FDA для таких медицинских применений [38], доказаны их благоприятные свойства (иммунологически инертные, биосовместимые, быстрое врастание в ткани, биорезорбируемые, медленно биоразлагаемые тканевые каркасы).

## **Получение и применение ПГА**

ПГА являются потенциальными биоматериалами, поскольку они биосовместимы и будут приняты системой хозяина без возникновения иммунных реакций или воспаления [39-40].

Мономерный компонент П(ЗГБ), который представляет собой (D)-3-гидроксимасляную кислоту, является нормальным компонентом в крови человека, который поддерживает функционирование организма. (D)-3-гидроксимасляная кислота естественным образом образуется в виде кетоновых тел после окисления жирных кислот в печени и циркулирует через кровоток. Эти кетоновые тела затем поглощаются мозгом и в конечном итоге метаболизируются в АТФ в качестве источника энергии [41]. Таким образом, ПГА используются для производства перевязочных материалов и доставки лекарств [42].

Также ПГА широко применяются в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, изготовлении упаковочной тары.[42]

## 1.8. Влияние азота на синтез ПГА

Азот является неотъемлемым элементом питательной среды при культивировании бактерий, продуцирующих ПГА. [43]

В основном исследования стратегий культивирования проводятся при низких концентрациях аммония (1 г/л), поскольку концентрация 2 г/л частично подавляет рост клеток, а концентрация 4 г/л полностью ингибирует рост. Для культивирования могут быть использованы отходы, содержащие различные соединения азота (мочевина, нитраты, соединения аммония).

Источник азота влияет на скорость роста бактерий. Например, штамм *S. necator* 335 достигает самой высокой концентрации клеток за короткий период культивирования (24 часа) при использовании мочевины. Самая быстрая скорость роста при длительном культивировании фиксируется в присутствии нитратов, самая медленная – при использовании аммония.

Форма азота также влияет и на конечный выход биомассы. Наибольшее количество биомассы наблюдается при культивировании в присутствии мочевины. Это может быть связано с тем, что карбамид, в отличие от нитратов и аммонийных соединений, служит не только источником азота, но и источником углерода. [44-47]

## 1.9. Влияние олеиновой кислоты на синтез ПГА бактериями

На сегодняшний день полная стоимость продукции ПГА намного выше по сравнению с пластиками, получаемыми химическим путем. Одна из причин - это высокая стоимость субстрата для культивирования бактерий (в том числе, источника углерода). В качестве углеродных источников для синтеза ПГА могут быть использованы различные отходы сельскохозяйственных производств, растительные масла, животные жиры [48].

Обычно в качестве источников углерода используются сахара, однако жирные кислоты, такие как олеиновая, способствуют получению более

высокого урожая и, соответственно, снижают стоимость производства ПГА, поскольку такие субстраты содержат больше углерода по отношению к массе по сравнению с углеводами (экономический коэффициент по биомассе и полимеру для олеиновой кислоты в два раза выше, чем для сахаров).

При низких концентрациях олеиновой кислоты (< 10 г/л), субстрат полностью утилизируется на ранних стадиях культивирования, что приводит к низкому выходу биомассы и полимера. Оптимальными являются концентрации олеиновой кислоты от 10 до 20 г/л. При концентрации выше 20 г/л, субстрат не используется бактериями в полной мере, и, следовательно, снижается содержание полимера в клетке.[49]

### **1.10. Влияние олеиновой кислоты и валерата калия на синтез ПГА**

Содержание ЗГВ в полимере влияет на прочность и эластичность сополимеров. Достаточными показателями обладают полимеры с 20-25 мол.% ЗГВ, благодаря чему они могут быть использованы для создания медицинских изделий. Тем не менее, существуют стратегии культивирования, при которых удается получать сополимеры с более высоким включением ЗГВ.

Добавление валерата калия или пропионата калия (1 г/л), не ингибирует рост бактерий и синтез полимера. Также присутствие олеиновой кислоты усиливает работу ферментной системы синтеза ПГА из-за наличия двойной связи при С9. В результате  $\beta$ -окисления олеиновой кислоты увеличивается внутриклеточный пул ацетил-КоА, и часть этого пула используется в качестве субстрата для биосинтеза ПГА. Кроме того, из-за окисления формируется дополнительный пул НАДФН.[50]

## Раздел 2. Материалы и методы

### 2.1. Водородные бактерии *Cupriavidus necator*

Царство: *Procariota*

Класс: *Betaproteobacteria*

Семейство: *Burkholderiaceae*

Род: *Cupriavidus*

Вид: *C. Necator*

Штамм: *C. necator* В-10646

Культурно-морфологические характеристики вида: грамотрицательные палочки (молодые – короткие, в стационарной фазе разной длины), подвижны. Оптимальный рост при 30-31°C, pH 6,7-7,2. Облигатные аэробы. Факультативные хемолитоавтотрофы.

### 2.2. Культивирование бактерий *C.necator*

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объёмом 500 мл. Объём культуры – 250 мл. Для выращивания была использована солевая среда Шлегеля следующего состава: Культуру выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля, состоящей из:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  9,0 г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,5 г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2 г/л;  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,025 г/л. Микроэлементы добавляли из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 литр среды. Раствор микроэлементов содержал:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,288 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;  $\text{NiCl}_2$  - 0,008 г/л,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,03 г/л.

В качестве источника азота использовали следующие соединения: мочевины, хлорид аммония, сульфат аммония, ацетат аммония.

Бактерии *Cupriavidus necator B-10646* культивировали в стеклянных колбах объемом 0,5 л с 250 мл фосфатного буфера в термостатируемом шейкере-инкубаторе «Incubator Shaker Innova® серии 44 («New Brunswick Scientific», США), при 30 °С и 200 об/мин. Общее время ферментации составило 72 часа.

### **2.3. Измерение оптической плотности**

К 1 мл культуры добавляется 5 мл дистиллированной воды и на фотоколориметре КФК-2МП измеряется оптическая плотность при длине волны 440 нм.

### **2.4. Измерение концентрации источника азота**

2 мл культуры центрифугируется, отбирается 1 мл надосадочной жидкости, доводится дистиллированной водой до 50 мл. К 10 мл пробы добавляется 1 капля КОН 33% и 0,5 мл реактива Нестлера. Проводится измерение на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 400 нм. Количество азота рассчитывается по калибровочному графику.

### **2.5. Определение концентрации биомассы**

25 мл культуры центрифугируются при 6000 оборотах, надосадочная жидкость сливается, осадок промывается дистиллированной водой и снова центрифугируется. После этого надосадочная жидкость снова сливается, осадок центрифугируется с гексаном, чтобы удалить остатки олеиновой кислоты. Полученная биомасса переносится в заранее взвешенные стеклянные бюксы и оставляется на сутки в сушильном шкафу при температуре 80 °С. Вес биомассы – разница между весом бюкса с биомассой и пустым бюксом.

## **2.6. Определение веса полимера**

50 мл культуры центрифугируются, надосадочная жидкость сливается, к осадку приливается еще 50 мл культуры и снова центрифугируются. Таким образом, исследуется количество полимера в 100 мл культуры. Получившийся осадок переносится в колбу, добавляется 20 мл этанола и 40 мл трихлорметана, колба закрывается и убирается в сушильный шкаф на 24 часа при температуре 30 °С. После экстракции, полученный раствор фильтруется, растворитель выпаривается с помощью роторного испарителя Rotavapor R-210 (BUCHI) на водяной бане (температура 50°C) и давлении 400 мБар. К получившемуся раствору приливается гексан для выделения полимера, затем полимер высушивается и взвешивается.

## **2.7. Определение содержания и состава полимера**

Метанолиз проб проводится следующим образом: к навескам сухой биомассы 0,0039 – 0,0045 г приливается 1 мл внутреннего стандарта, 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Пробы кипятятся 2 часа 40 минут с обратным холодильником. По окончании метанолиза в колбу добавляется двойной объём дистиллированной воды. При этом происходит разделение жидкостей. Нижний хлороформный слой используется для хроматографического анализа.

## **2.8. Определение остатка олеиновой кислоты**

В предварительно взвешенные колбы на 50 мл заливается 10 мл культуры, приливается 10 мл гексана и отбирается 5 мл раствора, которую переносим во взвешенные грушевидные стеклянные колбы объемом 25 мл. Гексан удаляется с помощью роторного испарителя Rotavapor R-210 (BUCHI).

Колбы помещаются в эксикатор на 24 ч. После этого колбы взвешивают и рассчитывают концентрацию (г/л) олеиновой кислоты в среде.

## 2.9. Определение экономического коэффициента

Экономический коэффициент (Y) выражает количественные потребности организма в питательных веществах.

$$Y(\text{б/м}) = dX / dS \quad (2.1)$$

Где:

$dX = X - X_0$ , г/л – X и  $X_0$  – концентрация биомассы в конечный и начальный моменты времени

$dS = S - S_0$ , г/л – S и  $S_0$  – концентрация биомассы в конечный и начальный моменты времени

## 2.10. Определение молекулярно-весовых характеристик полимера.

Значение средней числовой молекулярной массы образцов рассчитывается по формуле:

$$M_n = \sum (N_i \cdot M_i / N) \quad (2.2)$$

где:

$N_i$  — количество молекул массы I;

N — общее количество молекул;

$M_i$  — масса молекул длины I.

Среднюю весовую молекулярную массу образцов определяли по формуле:

$$M_w = \sum (w_i \cdot M_i) \quad (2.3)$$

где:

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

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

$$PD = M_w / M_n. \quad (2.4)$$

где:

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

$M_n$  – среднечисловая молекулярная масса, г/моль.

### **Раздел 3. Результаты и обсуждение**

Страницы 19-32 изъяты в связи с авторским правом

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, культивируемых на олеиновой кислоте и различных источниках азота (мочевина, ацетат аммония, сульфат аммония, хлорид аммония). Показано, что высокие показатели концентрации биомассы (7,32 – 9,3 г/л) и содержания полимера (67,3 – 73,2 %) показаны для культуры, выращиваемой на мочеvine, сульфате аммония и хлориде аммония.

Добавление валерата калия в различных режимах в культуру бактерий, выращиваемых на олеиновой кислоте и исследуемых источниках азота, позволило получить сополимеры поли(3-гидроксипропионата-co-3-гидроксивалерата) с включением 3-гидроксивалерата от 13,4 до 34,5 мол.% при сохранении высоких показателей биомассы и полимера.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПГА – полигидроксиалканоаты

ЗГБ – 3-гидроксибутират

ЗГВ – 3-гидроксивалерат

П(ЗГБ) – поли-3-гидроксибутират

П(ЗГБ-соЗГВ) – поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Volova, T. G. Degradable polyhydroxyalkanoates of microbial origin as a technical analog of non-degradable polyolefines // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2015. – Vol. 2(8). – P. 131-151.
- 2 Chen G. Q., A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based Bio- and Materials Industry // Chemical Social Revue. – 2009. – Vol. 38. – P. 2434-2446.
- 3 Bucci, D., Tavares, L., Sell, I. PHB packaging for the storage of food products // Polymer Testing. – 2005. – Vol. 24(5). – P. 564-571.
- 4 Arikawa H. et al. A study on the relation between poly (3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16 //Journal of biotechnology. – 2016. – Vol. 27. – P. 94-102
- 5 Sagong H. Y. et al. Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis //Trends in biochemical sciences. – 2018. – Vol. 43. – №. 10. – P. 790-805.
- 6 Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишатская Е. И. Полиоксиканоаты(ПОА)-биоразрушаемые полимеры для медицины. – 2003.
- 7 Friedrich, C. G., Friedrich, B., Bowien, B. Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus* / C. G. Friedrich, B. Friedrich, B. Bowien // Microbiology. – 1981. – Vol. 122, №. 1. – P. 69-78.
- 8 Ghysels S. et al. Targeted poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) bioplastic production from carbon dioxide //Bioresource technology. – 2018. – Vol. 249. – P. 858-868.
- 9 Ferre-Guell A., Winterburn J. Production of the copolymer poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with varied composition using different nitrogen sources with *Haloferax mediterranei* //Extremophiles. – 2017. – T. 21. – №. 6. – P. 1037-1047.

- 10 Bugnicourt E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez // *eXPRESS Polymer Letters* –Vol.8.–№.11. – 2014.– P.791-808.
- 11 Chen Y. Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactant-chelate aqueous system/ Y. Chen, Q. Xu, H. Yang, G. Gu, // *Process Biochem.* –2001. – Vol.36. –P.773-779.
- 12 Tsuge T. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis // *Polymer Journal.* – 2016. – Vol. 48. – №. 11. – P. 1051-1057.
- 13 Gumel A. M. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates /A. M. Gumel, M. S. M. Annuar, Y. Chisti // *J Polym Environ* –2012. –Vol. 21. –P.580–605.
- 14 Winnacker M. Polyhydroxyalkanoates: recent advances in their synthesis and applications // *European Journal of Lipid Science and Technology.* – 2019. – Vol. 121. – №. 11. – P. 1901.
- 15 Reusch R.N., Low molecular weight complexed poly (3-hydroxybutyrate): A dynamic and versatile molecule *in vivo*.// *Microbiology.* – 2015. – Vol. 41. - №7. – P. 50–54.
- 16 Rai, R. Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a medium chain length polyhydroxyalkanoate homopolymer from *Pseudomonas mendocina* / Yunos, D.M., Boccaccini, A.R., Knowles, J.C., Barker, I.A., Howdle, S.M., Tredwell, G.D., Keshavarz, T., Roy, I. // *Biomacromolecules.* – 2011. – Vol. 12. – P. 2126–2136.
- 17 Visakh P.M. Polyhydroxyalkanoates (PHAs), their Blends, Composites and Nanocomposites: State of the Art, New Challenges and Opportunities. In *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Based Blends, Composites and Nanocomposites*; The Royal Society of Chemistry: London, UK/ - 2015. - P. 1–17.

- 18 Martin D.P. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: A strong flexible absorbable biomaterial. //Biochem Eng. – 2003. – Vol. 16. – P. 97–105.
- 19 Rai, R. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. // Scientific Engineering. – 2011. - Vol. 72. – P. 29–47.
- 20 Lenz, R.W. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. //Biomacromolecules. – 2005. – Vol. 6. – P. 1–8.
- 21 Lim, S.P. Degradation of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in tropical forest and mangrove soils. //Biotechnology. – 2005. – Vol. 126. – P. 23–32.
- 22 Chen, G. Wang, Y.C. Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates. //Polymer Sci. – 2013. – Vol. 31. – P. 719–736.
- 23 Bugnicourt, E., Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. / Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., Alvarez, V. // Express Polym. Lett. - 2014. – Vol. 8. – P. 791-808.
- 24 Hong Chen, Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids: Effect of pH and feeding regimes / Huijuan Meng, Zuchao Nie, Mingmei Zhang. //Bioresource Technology. – 2013. - Vol. 128. – P. 533–538.
- 25 Loo C. Y., Sudesh K. Biosynthesis and native granule characteristics of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans* //International journal of biological macromolecules. – 2007. – Vol. 40. – P. 466-471.
- 26 Sangkhara K. Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. //Microbiology. – 2021. – Vol. 58. – P. 173–182.
- 27 Araujo P.L.B. Biodegradable conductive composites of poly (3-hydroxybutyrate) and polyaniline nanofibers: Preparation, characterization and radiolytic effects. //Express Polymer. - 2011. – Vol. 5. – P. 12–22.

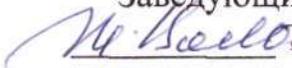
- 28 Киселев Е. Г., Шишацкий О. Н., Дж С. Э. Техничко-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов //Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2012. – Т. 5. - №3.
- 29 Kim D.Y.. Molecular characterization of extracellular medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoate) depolymerase genes from *Pseudomonas alcaligenes* strains. //Microbiology. – 2018. – Vol. 43. – P. 285–294.
- 30 . Gumel A. M. Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates /A. M. Gumel, M. S. M. Annuar, Y. Chisti //J Polym Environ –2012. –Vol. 21. –P.580–605.
- 31 Kiun J. T. et al. Optimizing the biosynthesis of renewable polyhydroxyalkanoate copolymer containing 3-hydroxyvalerate by *Massilia haematophila* using statistical modeling //BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology. – 2019. – R.100. – №. 4.
- 32 Wu Q. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. //Biotechnology. – 2016. – Vol. 37. – P. 1–12.
- 33 Novackova I. et al. Adaptation of *Cupriavidus necator* to levulinic acid for enhanced production of P (3HB-co-3HV) copolyesters //Biochemical Engineering Journal. – 2019. – Vol. 151. – P. 1073.
- 34 Obruca S. et al. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds //Process biochemistry. – 2014. – Vol. 49. – № 9. – P. 1409-1414.
- 35 Pernicova I. et al. Production of polyhydroxyalkanoates on waste frying oil employing selected *Halomonas* strains //Bioresource technology. – 2019. – Vol. 292. – P. 122.
- 36 Rand J. M. A metabolic pathway for catabolizing levulinic acid in bacteria //Nature microbiology. – 2017. – Vol. 2. – P. 1624-1634.

- 37 Reinecke, F., Steinbüchel, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of 40 technically interesting biopolymers / F. Reinecke, A. Steinbüchel // *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. – 2009. – Vol. 16. – P. 91-108.
- 38 Azira T. M. F. et al. Biosynthesis of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through two-step cultivation process // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 27. – P. 2287-2295.
- 39 Berezina N. Enhancing the 3- hydroxyvalerate component in bioplastic PHBV production by *Cupriavidus necator* // *Biotechnology journal*. – 2012. – Vol. 7. – P. 304-309
- 40 Tsuge T. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis // *Polymer Journal*. – 2016. – Vol. 48. – P. 1051-1057.
- 41 Muzaiyanah A. R., Amirul A. A. Studies on the microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates containing 4-hydroxyvalerate using valerolactone // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2013. – Vol. 170. – P. 1194-1215.
- 42 Naik S., Gopal S. K. V., Somal P. Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: a metabolic approach // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – Vol. 24. – P. 2307-2314.
- 43 Xiaoyong Yang, Mingyi Xu, Rusen Zou, Irini Angelidaki, Yifeng Zhang. Microbial protein production from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and recycled nitrogen: Focusing on ammonia toxicity and nitrogen sources // *Journal of Cleaner Production*. – 2021. – Vol. 291. – P. 271-279.
- 44 Chen S., Weixing C., Charles J., Sonia H., Ronghou L. Biogas production from undiluted chicken manure and maize silage: A study of

- ammonia inhibition in high solids anaerobic digestion // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 218. – P. 1215-1223.
- 45 Rui D., Shenbin C. Combined Partial Denitrification (PD)-Anammox: A method for high nitrate wastewater treatment // *Environment International*. – 2019. – Vol. 126. – P. 707-716.
- 46 Chanprateep S., Shimizu H., Shioya S. Characterization and enzymatic degradation of microbial copolyester P (3HB-co-3HV) s produced by metabolic reaction model-based system // *Polymer degradation and stability*. – 2006. – Vol. 91. – P. 2941-2950.
- 47 Chung S. H. et al. Effect of levulinic acid on the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* KHB-8862 // *Journal of Microbiology*. – 2001. – Vol. 39. – P. 79-82.
- 48 Du G. C. et al. Feeding strategy of propionic acid for production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha* // *Biochemical engineering journal*. – 2001. – Vol. 8. – P. 103-110.
- 49 Natalia O. Zhilaa, Galina S. Kalachevaa, Viktoriya V. Fokhtb, Svetlana S. Bubnovab, Tatiana G. Volovaa. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* B-10646 from Mixtures of Oleic Acid and 3-Hydroxyvalerate Precursors // *Journal of Siberian Federal University*. – 2020. – Vol. 13(3). – P. 331-341.
- 50 Lemechko P., Le Fellic M., Bruzaud S. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using agro-industrial effluents with tunable proportion of 3-hydroxyvalerate monomer units // *International journal of biological macromolecules*. – 2019. – Vol. 128. – P. 429-434.

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  
 Г. Волова  
«14» июня 2023 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Влияние источников азота на синтез полигидроксиалканоатов бактериями  
*Cupriavidus necator* B-10646 на олеиновой кислоте

Руководитель



Подпись, дата

к.б.н., доцент

Должность, ученая степень

Н. О. Жила

Инициалы, фамилия

Выпускник



Подпись, дата

Т. Р. Крикунова

Инициалы, фамилия

Красноярск 2023