

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  
Заведующая кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

## **БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Использование мелассы в качестве субстрата для биосинтеза  
полигидроксиалканоатов  
тема

Руководитель \_\_\_\_\_ доцент, к.б.н. А.В. Демиденко  
подпись, дата должность, ученая степень

Выпускник \_\_\_\_\_ М.В. Филимонова  
подпись, дата

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Использование мелассы в качестве субстрата для биосинтеза полигидроксиалканоатов» содержит 39 страниц текстового документа, 42 использованных источника, 2 таблицы и 11 рисунков.

Ключевые слова: *CUPRIAVIDUS NECATOR*, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ФРУКТОЗА, ГЛЮКОЗА, МЕЛАССА, ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ.

Цель работы: определить возможность использования мелассы в качестве основного субстрата для биосинтеза полигидроксиалканоатов. Для ее достижения были реализованы следующие задачи:

1. Исследовать состав мелассы, возможности ее эффективного использования в процессе культивирования.
2. Провести процесс культивирования бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на различных субстратах (глюкозе, фруктозе, мелассе). Определить динамику накопления биомассы.
3. Исследовать динамику накопления ПГА в процессе культивирования бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на различных субстратах.

Актуальность: оценка использования альтернативных субстратов (в данной работе свекловичной мелассы) для синтеза полигидроксиалканоатов с целью снижения стоимости их промышленного производства.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1. Обзор литературы .....	7
1.1 Характеристика полигидроксиалканоатов.....	7
1.2 Свойства ПГА .....	10
1.3 Биосинтез ПГА.....	11
1.4 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА.....	13
1.5 Меласса как источник углерода в промышленности.....	15
1.6 Предварительная обработка мелассы для использования в качестве С-субстрата .....	16
2. Материалы и методы .....	19
2.1 Объект исследования – <i>Cupriavidus necator</i> В-10646 .....	19
2.2 Подготовка инокулята.....	19
2.3 Анализ проб.....	20
2.3.1 Подсчёт микроорганизмов в счётной камере.....	20
2.3.2 Определение абсолютно сухой биомассы клеток.....	21
2.3.3 Определение концентрации фруктозы .....	22
2.3.4 Определение концентрации глюкозы .....	23
2.3.5 Определение содержания аммонийного азота.....	24
2.4 Расчет кинетических параметров роста культуры .....	24
2.5 Определение процентного содержания ПГА в клетках .....	25
2.6 Подготовка мелассы для культивирования бактерий.....	25
2.6.1 Предварительная обработка мелассы .....	26

2.6.2	Ферментативный гидролиз мелассы .....	26
2.6.3	Осветление мелассы раствором $H_2O_2$ .....	26
3.	Результаты и обсуждения.....	27
3.1	Химический состав мелассы .....	27
3.2	Культивирование бактерий <i>Cupriavidus necator B-10646</i> на очищенной мелассе.....	29
3.3	Культивирование <i>Cupriavidus necator B-10646</i> на различных С-субстратах .....	31
	Выводы .....	34
	Список использованных источников .....	35

## ВВЕДЕНИЕ

В современном мире ежегодно увеличивается спрос на пластмассы, основой которых служат нефтепродукты. Изделия на основе нефти представляют собой неразлагающиеся продукты, из-за чего создают значительные нагрузки для окружающей среды, накапливаясь в больших объёмах в почве, водоёмах и на свалках. Создание биополимеров является одним из возможных вариантов решения данной проблемы. Эти полимеры являются биоразлагаемыми и биосовместимыми, а получить их можно из таких ресурсов как масла, жиры, белки, крахмал и целлюлоза [1].

На 2018 год мировое производство пластика составило около 400 млн тонн в год. Всего же с 1950 по 2018 год было произведено около 6,3 млрд тонн пластмассы, из них переработано около 9%, а сожжено – 12%. Ежегодно в мире увеличиваются объёмы выпуска пластмассовых изделий, основой которых служат нефтепродукты, которые представляют собой неразлагающиеся продукты, из-за чего создают значительные нагрузки для окружающей среды, накапливаясь в больших объёмах в почве, водоёмах и на свалках. И хотя подобные синтетические материалы имеют ряд преимуществ, пластиковое загрязнение – это глобальная проблема, над решением которой работают ученые мира. При поиске альтернативы синтетическим материалам особое внимание уделяется полигидроксиалканоатам [2].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой сложные полиэфиры, которые образуются в процессе ферментации микроорганизмов из возобновляемых ресурсов. Имеют выраженные свойства биоразлагаемости и биосовместимости, что значительно расширяет спектр их промышленного применения [3]. ПГА – это экологичные пластики, которые оказывают положительное экологическое воздействие по сравнению с обычными пластиками с точки зрения производства и переработки. Кроме того,

биопластик является возобновляемым и устойчивым ресурсом, значительно сокращая потребность образования захоронений отходов.

На данный момент существует потенциал для увеличения эффективности производства ПГА и сокращения затрат на субстраты, которые составляют около 40% от стоимости производства. Исследования показали, что использование отходов сельского хозяйства и промышленности может значительно снизить затраты и увеличить экологическую устойчивость производства. Кроме того, развитие новых технологий, таких как генетические модификации микроорганизмов, может привести к созданию более эффективных и быстрорастущих культур для создания биополимеров, что значительно повысит производительность и его использование в более широком спектре промышленности [4].

Для снижения производственных затрат культивирования микроорганизмов необходимо использовать недорогие, но богатые питательными веществами субстраты. Свекловичная патока-меласса имеет низкую стоимость, высокий уровень содержания углерода и необходимые для роста микроорганизмов микро- и макроэлементы, является продуктом переработки сахара и относится к промышленным отходам [5].

**Цель работы:** определить возможность использования мелассы в качестве основного субстрата для биосинтеза полигидроксиалканоатов.

**Задачи:**

1. Исследовать состав мелассы, возможности ее эффективного использования в процессе культивирования.
2. Провести процесс культивирования бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на различных субстратах (глюкозе, фруктозе, мелассе). Определить динамику накопления биомассы.
3. Исследовать динамику накопления ПГА в процессе культивирования бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 на различных субстратах.

## **1. Обзор литературы**

### **1.1 Характеристика полигидроксиалканоатов**

Начиная с 1933 года, когда были открыты пластики на нефтяной основе, изделия из синтетической пластмассы прочно закрепились в жизни человека. С помощью исключительных свойств и отличных характеристик они послужили заменой традиционным материалам такими как металл или дерево в различных отраслях промышленности. Пластмассы из нефти имеют длительный срок службы, так как чрезвычайно устойчивы к воздействию микроорганизмов и химии.

С течением времени широкое использование таких материалов стало вызывать беспокойство по поводу их воздействия на окружающую среду и влияния на здоровье человека. Большой спектр изделий из пластмасс привел к образованию свалок, так как высокопрочные пластики не сжигаются из-за высокой стоимости процесса и образования токсичных побочных продуктов. Дальнейшее производство и использование синтетических продуктов приведет не только к пластиковому загрязнению, но и истощению ископаемых ресурсов и повышением уровня CO<sub>2</sub> в атмосфере [6].

Для решения проблемы пластикового загрязнения были начаты обширные исследования в области биотехнологии. Биоразлагаемые полимеры, которые были открыты еще 100 лет назад, могут заменить традиционные пластмассы и снизить нагрузку на окружающую среду. Их получают из натуральных возобновляемых ресурсов, таких как белки или крахмал. Разложение происходит при помощи микроорганизмов, превращая изделия в натуральные продукты, не вызывающие загрязнения природы, что делает их отличным альтернативным экологичным материалом [7]. В настоящее время выделяют семь классов биополимеров: полинуклеотиды,

полиамиды, полисахариды, полиизопрены, лигнин, полифосфаты и полигидроксиалканоаты [8].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой семейство полимеров, которые по своим свойствам близки к синтетическим полимерам, но при этом способны к биодegradации в природных условиях, что делает их идеальными для использования в различных отраслях промышленности. Процесс накопления ПГА у микроорганизмов происходит в ответ на ограниченный доступ к питательным веществам или экзогенные раздражители в качестве резервного источника углерода и энергии. Полимер накапливается в виде гранул сложных полиэфиrow гидроксисалкановых кислот размером от 0,2 до 0,5 мкм, они в основном аморфны и содержат от 5 до 10% воды, они имеют фосфолипидную однослойную мембрану, содержащую белки, в том числе ПГА-синтазу и деполимеразы. Стабилизацию аморфного гидрофобного ПГА внутри цитоплазмы гидрофильных клеток выполняют белки фазины, которые также содержатся в мембране [9]. На рисунке 1 представлены электронно-микроскопические снимки *C. necator* DSM 545, на которых видны внутриклеточные включения ПГА на разных увеличениях [6]. Форма, физические свойства, размер и структура зависят от продуцента и условий культивирования.

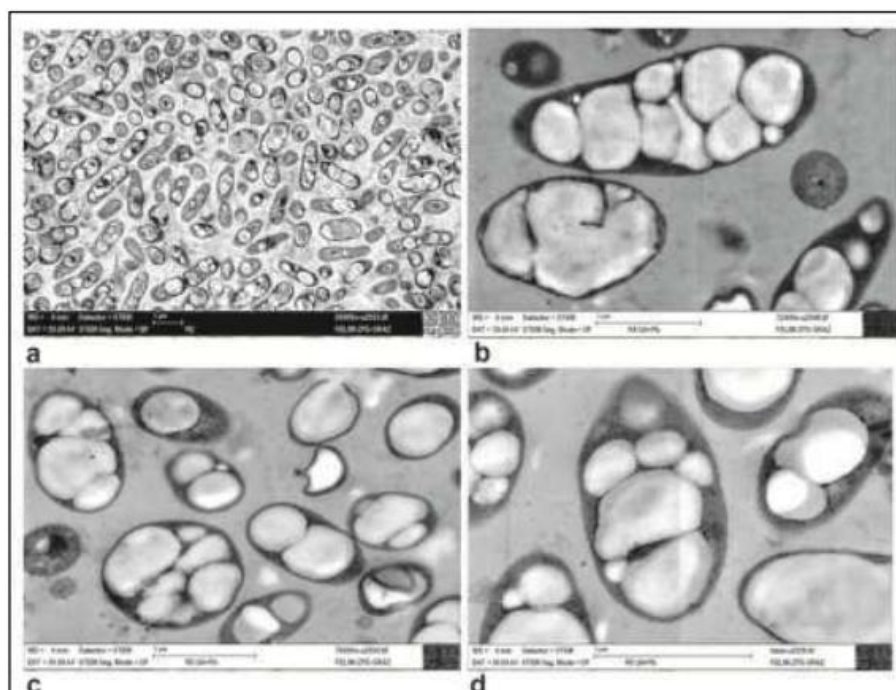




Рисунок 1 - Электронно-микроскопические снимки *Cupriavidus necator* DSM 545 [6].

В условиях голодания запасенные материалы могут быть мобилизованы, что дает клетке преимущество для выживания. Также клетки используют накопленный ПГА в условиях стресса, таких как воздействие окислителей, ультрафиолетовое облучение, экстремальные температуры [10].

Все полиэфиры являются нетоксичными, нерастворимыми в воде, термопластичными и относительно устойчивыми к гидролитическому разложению, биосовместимы и биоразлагаемы, а также обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами и пьезоэлектрическим эффектом.

Субстратная специфичность ПГА-синтаз, которые осуществляют полимеризацию, связана с диапазоном длины углерода. По этому признаку все полимеры делят на 3 группы:

1. 3-5 атомов углерода – короткоцепочечные (short-chain-length, scl): высокая кристалличность, хрупкость и жесткость. К ним относят поли(3-гидроксибутират) и его сополимеры с гидроксивалератом [2], [11].

2. 6-14 атомов углерода – среднецепочечные (medium-chain-length, mcl): более низкая температура плавления, низкая кристалличность и предел прочности при растяжении. Характерным представителем данной группы являются поли(3-гидроксиоктаноат) [12].

3. Более 14 атомов углерода – длинноцепочечные (long-chain-length, lcl). К ним относятся поли(3-гидроксипентадеканоат) [2].

Основные структуры ПГА представлены на рисунке 2 [13].

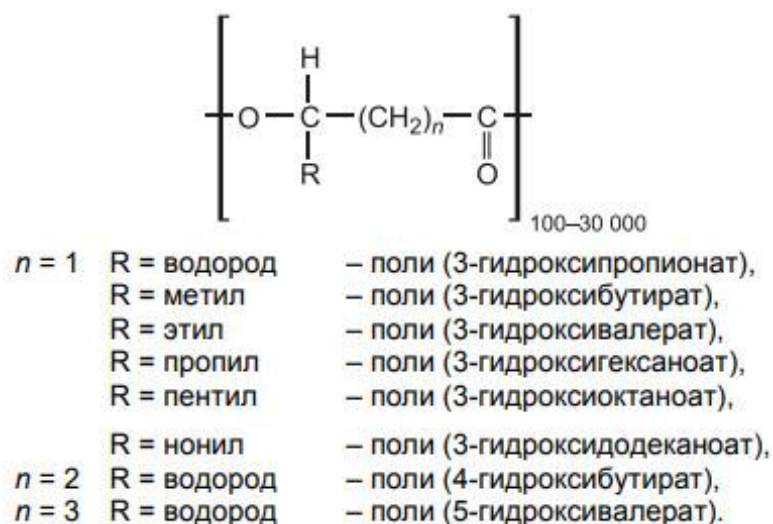


Рисунок 2 – Структура полигидроксиалканоатов [13].

Сферы применения ПГА различны. Наиболее перспективны биополимеры для разработки перевязочных материалов, устройств медико-биологического назначения, элементов для восстановительной хирургии и трансплантологии.

## 1.2 Свойства ПГА

Основным преимуществом полигидроксиалканоатов является биоразлагаемость и биосовместимость. В отличие от синтетических пластмасс на основе нефтепродуктов, которые разлагаются в течение нескольких десятилетий, ПГА полностью разлагаются сапрофитными бактериями в течение года. Они синтезируют внеклеточные ПГА-деполимеразы, которые стимулируют разложение ПГА до воды и углекислого газа в аэробных условиях, или образование метана – в анаэробных условиях. Этот процесс показывает, что ПГА являются частью естественного замкнутого цикла веществ. Благодаря биосовместимости ПГА широко используют в медицинской области [3], [8].

ПГА могут иметь вид жестких и хрупких пластиков, либо упругих и эластичных материалов. Их можно плавить и придавать нужную форму, обращая внимание на состав и длину цепи полимера. Гомополимеры

являются высококристаллическими из-за высокой стереорегуляции, в результате чего материал получается жестким и хрупким с высокой температурой плавления, высоким модулем упругости, высокой прочностью на растяжение и низким удлинением при разрыве. Примером такого материала является поли(3-гидроксибутират). Пластичность материала может быть повышена введением больших боковых групп на основную цепь, таких как этильная или пропильная группы, с образованием сополиэфиров, чтобы разрушить или уменьшить кристаллическую решетку [5]. Таким образом кристалличность может быть снижена, образуется пластичный материал с низкой температурой плавления, но высокое содержание длинных мономеров приводит к низкой прочности и медленной кристаллизации.

Различные физические свойства сополимеров основаны на различной молекулярной структуре. Поэтому полигидроксиалканоаты могут иметь характеристики от кристаллической термопластичности до полной эластомерии [10].

### **1.3 Биосинтез ПГА**

Крупномасштабное производство зависит от нескольких факторов: стоимость субстрата, его обработка, содержание ПГА в микроорганизмах и разработка всего биопроцесса. Продуцирующий микроорганизм должен идеально подходить для биосинтеза ПГА: необходим быстрый рост на дешевых источниках углерода и отсутствие чувствительности к предшественникам, используемых для производства сополимеров. Для обеспечения непрерывного производства штамм должен быть генетически стабильным, а содержание ПГА в клетках должно составлять не менее 70% от сухой биомассы [14].

Полигидроксиалканоаты служат источником энергии и углерода во время голодания. Они обладают низкой растворимостью и высокой

молекулярной массой, которая вызывает незначительный осмотический стресс для бактериальных клеток. Хранится ПГА во взвешенном состоянии в цитоплазме.

Процессы промышленного производства ПГА разработаны, как правило с использованием грамтрицательных штаммов *Cupriavidus necator* и *Alcaligenes latus*. Главное их преимущество – высокий выход полимера и способность суперпродукции на различных субстратах [15]. Наиболее экономически эффективный процесс представляет культивирование *C. necator*. Гены этой культуры используются даже если производство переключается на другие бактерии или сельскохозяйственные культуры [16]. Также разрабатываются новые методы производства ПГА с целью повышения его выхода и оптимизации параметров культуры. Например, использование генной инженерии позволяет усилить экспрессию генов, ответственных за синтез полимера или ввести гены, кодирующие новые ферменты, что может улучшить свойства полимера. Для того, чтобы сократить объем используемых средств и снизить затраты изучают также возможность культивирования на субстратах меньшей плотности. Много усилий прилагается к разработке синтеза полимеров на основе грамположительных штаммов, например *Bacillus sp.* Это связано с тем, что эти бактерии не имеют липополисахаридного слоя и поэтому могут производить ПГА с минимальной очисткой. Такое сырье является идеальным для сферы медицинских применений.

Использование термофильных и термостабильных штаммов также предоставляет ценовые преимущества промышленного производства. Такие бактерии растут при умеренных и высоких температурах, что увеличивает скорость реакции, снижает затраты на охлаждение вероятность перекрестного загрязнения другими микроорганизмами [17].

Синтез ПГА происходит в условиях несбалансированного роста, который вызван избытком источника углерода и дефицитом микроэлементов (магний, железо) или макроэлементов (кислород, фосфор или азот). Этого

можно достичь с помощью двухэтапного процесса: сначала условия являются оптимальными для роста биомассы, затем происходит ограничение питательных веществ и, как следствие, происходит накопление полимера [6], [17].

С точки зрения биохимии процесс накопления ПГА начинается с ацетил-КоА. При сбалансированном росте он используется в основном цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), где на первом этапе высвобождается свободный кофермент А. Его концентрация регулирует метаболизм клетки. Таким образом, при сбалансированном росте концентрация свободного КоА высокая, а значит энергии в виде АТФ высвобождается больше. Субстраты в таком случае используются для синтеза макромолекул, важных для жизнедеятельности микроорганизма. В условиях несбалансированного роста происходит ингибирование ферментов ЦТК, что в свою очередь приводит к снижению концентрации свободного КоА и увеличению концентрации ацетил-КоА, который используется бактерией для синтеза запасного вещества в виде ПГА [16], [18].

У *Cupriavidus necator* в процессе биосинтеза ПЗГБ участвуют три фермента: β-кетотиолаза, которая кодируется геном PhaA, ацетоацетил-КоА-редуктаза, кодируемая геном PhaB и ПГА-синтаза, ген PhaC. Первый фермент β-кетотиолаза катализируют реакцию конденсации двух молекул ацетил-КоА до ацетоацетил-КоА. Он, в свою очередь, восстанавливается НАДФН-зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазой до (R)R-3-гидроксибутирил-КоА, который далее полимеризуется в ПЗГБ с помощью ПГА-синтазы [9].

#### **1.4 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА**

Из-за стоимости производства ПГА, которая в 5-10 раз выше стоимости производства пластмасс на нефтяной основе, изготовление биоматериала является невыгодным. Несмотря на это, в последнее время интерес к ПГА

значительно вырос, так как их получают из возобновляемых ресурсов [19]. Поэтому существует необходимость поиска источника углерода, который будет устойчивым, легкодоступным и при этом недорогим.

Углеродсодержащие субстраты, которые могут усваивать микроорганизмы принято делить на несколько поколений:

1. Углеводы – субстраты I поколения.

К этой категории относятся пищевые отходы. Сложные потоки отходов помимо основных компонентов могут содержать дополнительные вещества, которые способствуют росту бактерий и делают их выгодными в сравнении с чистыми субстратами [6]. Широкое распространение и низкая стоимость делают это направление наиболее перспективным для крупномасштабного производства полигидроксиалканоатов.

Субстраты I поколения можно поделить на шесть категорий: масло, глицерин, сахар, крахмал, молочная кислота и целлюлоза. Эти материалы уже имеют широкую область применения в лабораторных масштабах [11], [12] [20].

2. Жидкие углеводороды – субстраты II поколения.

Микроорганизмы способны усваивать практически все классы углеводородов, содержащие n-парафины, например очищенные жидкие парафины или прямогонные дизельные фракции. Но лучше всего утилизируются углеводороды нормального строения с длиной углеродной цепи C11-C18, которые имеют температуру кипения 200-320 °C.

3. Оксидазы углеводородов, газообразные углеводороды, углекислота, водород – субстраты III поколения.

Спирты, водород и природные газы также являются перспективными видами сырья для промышленного производства биополимеров. Наиболее показательными субстратами III поколения являются метанол и этанол, благодаря технологичности этих спиртов и качеству получаемого белка.

Метан является неисчерпаемым источником углерода для синтеза ПГА, он широко распространен на месторождениях, а также образуется при биологическом разложении органических веществ анаэробными микроорганизмами. Но так как его хранение и транспортировка имеет высокую стоимость, газ сжигают и выбрасывают в атмосферу. Биосинтез ПГА на основе метана не только снизит стоимость производства, но и поможет предотвратить парниковый эффект [21].

Род *Cupriavidus* имеет универсальный метаболизм, способный подстраиваться под широкий спектр источников углерода, что является ключевым фактором для его использования в крупномасштабном производстве ПГА [16].

### **1.5 Меласса как источник углерода в промышленности**

Процесс производства свекловичного сахара включает в себя множество стадий, таких как мойка, измельчение, экстракция, очистка, концентрация и кристаллизация. На его долю приходится 20% мирового производства. 1 т сахара получают из 7 т сахарной свеклы, а в процессе кристаллизации образуется 0,25-0,35 т патоки. Высокая вязкость мелассы не позволяет провести процесс кристаллизации, из-за чего ее отделяют от системы для предотвращения накопления примесей и продают по низкой цене как отходы производства [22].

Несмотря на то, что патока является отходом производства сахара, ее можно использовать в качестве корма для животных или в производстве биотоплива. Также существует потенциал для использования мелассы в производстве биологически активных добавок и удобрений.

Тем не менее, использование свекловичной патоки-мелассы имеет и некоторые недостатки, такие как отсутствие продолжительного срока хранения и быстрое загрязнение субстрата микроорганизмами. Поэтому

перед использованием необходимо проводить обеззараживание субстрата для уничтожения всех вредоносных бактерий.

Патока имеет сложный и непостоянный химический состав. Помимо высокого содержания сахарозы меласса содержит минеральные, азотистые и безазотистые органические вещества.

Меласса имеет темно-коричневый цвет, из-за наличия пектиновых веществ, перешедших в результате переработки свеклы, и окрашенных веществ, образовавшихся в результате меланоидиновой реакции при щелочной деградации моноз [23], [24].

Серьезным недостатком использования мелассы является то, что существуют различия между отдельными партиями мелассы, что изменяет характеристики роста и свойства бактерий, растущих на ней. Для решения этой проблемы необходимо подобрать эффективные методы очистки мелассы от коллоидных частиц и карамели. Для этих целей могут быть использованы, например, перманганат калия или перекись водорода, благодаря использованию которых из патоки происходит адсорбция несхаров и достижение обесцвечивающего эффекта [25].

## **1.6 Предварительная обработка мелассы для использования в качестве С-субстрата**

Меласса содержит 40-60% сахарозы. *S. necator* выделяется среди полимерпродуцирующих микроорганизмов тем, что может накапливать до 90% ПГБ и использовать различные субстраты в качестве источников углерода. Как упоминалось выше, синтез ПГБ происходит в два этапа. Сначала растет количество микроорганизмов в стабильных условиях, затем – производство ПГБ путем ограничения какого-либо компонента, например фосфора или азота. Штамм способен метаболизировать фруктозу, глюкозу, глицерин и органические жирные кислоты, однако не имеет фермента сахараз, который может гидролизовать сахарозу в патоке. Поэтому для



эффективного накопления полимера с использованием мелассы, она должна быть предварительно обработана для гидролиза сахарозы до ее мономеров – фруктозы и глюкозы [26], [27].

Существуют три метода гидролиза сахарозы: химический (кислота, щелочь), ферментативный (сахароза, инвертаза) и комбинированный методы [28].

Химический гидролиз сахарозы проводится с использованием соляной кислоты и имеет преимущество в виде более низкой себестоимости по сравнению с использованием ферментов. Однако недостатком этого метода является загрязнение окружающей среды из-за выделения токсичных побочных продуктов НМФ – гидроксиметилфурфурола и фурфурола – циклических производных глюкозы и фруктозы, подвергающихся воздействию низкого рН и высокой температуры [19], [29], [30].

Гидролиз производится посредством подкисления раствора сахарозы до достижения рН от 2 до 3 и нагревания при температуре 80°C в течение определенного времени. При этом не происходит 100 %-но инверсии сахарозы высокой концентрации, поскольку при более высоких температурах происходит образование нежелательных побочных продуктов, таких как гуминовые вещества, муравьиная и уксусная кислоты, ангидриды моносахаров, которые способны ингибировать рост клеток и биосинтез ПГА [19], [31]. Помимо соляной кислоты используют и другие коррозионно-активные вещества, такие как серная и фосфорная кислоты либо же их смеси [29].

Удаление токсичных продуктов, которые образуются в результате химической обработки требует дополнительных манипуляций и, соответственно, дополнительных затрат. В связи с этим наиболее приоритетным является ферментативный гидролиз, который проводится с помощью  $\beta$ -фруктофуранозидазы. Используя инвертазу, дорогостоящая очистка продукта не требуется. При этом методе гидролиза требуется меньше энергии, но стоимость фермента значительно выше стоимости

соляной кислоты. Большим преимуществом ферментативного метода является использование зеленых катализаторов и мягкие условия гидролиза [9], [32] [33].

В настоящее время основным источником фермента для коммерческого производства являются мезофильные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [19]. Эти клетки несут внеклеточную инвертазу, которая является наиболее термостабильным ферментом, способным гидролизовать сахарозы до молекул фруктозы и глюкозы. Также инвертаза способна к ферментации в растворах высокой концентрации. Для высокой гидролитической активности температура не должна превышать 55°C, а оптимальным значением pH является 4,5 для свободного фермента [33].

Около 80% инвертазной активности связана с клеточной стенкой дрожжей, а остальная часть содержится в цитозоле клетки [34]. Таким образом, при ферментативном гидролизе сахароза расщепляется посредством секреции инвертазы, а не проникает через клеточную мембрану. В дальнейшем полученные моносахариды транспортируются в клетки и метаболизируются [33], [35]. При гидролизе живыми дрожжевыми клетками происходит образование побочных продуктов в виде этанола и ацетата, которые являются загрязнителями для синтеза ПГА. Для того, чтобы исключить их образование необходимо проводить предварительное тепловое воздействие на дрожжи (автолиз) для разрушения клеток. Таким образом, полученные изолированные клеточные стенки не загрязняют раствор сахарозы побочными продуктами, устойчивы к нагреванию и экстремальным значениям pH, но при этом содержат до 80% активности фермента [34], [36].

## 2. Материалы и методы

### 2.1 Объект исследования – *Cupriavidus necator* В-10646

В данном исследовании использовался штамм В-10646 водородокисляющей бактерии *Cupriavidus necator* (ранее известной как *Ralstonia eutropha* или *Wautersia eutropha*). Он является одним из вариантов, выделенных из культуры штамма *Ralstonia eutropha* В-8562, способен синтезировать ПГА различных составов. Штамм получен в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза в Институте биофизики СО РАН и зарегистрирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

*C. necator* обладает широким органотрофным потенциалом, растет на минеральных средах, содержащих сахар (глюкозу, фруктозу) или органические кислоты, в атмосфере водорода, углекислого газа и кислорода, не требует специальных факторов роста или органических добавок. Оптимум роста 30-31°C, pH 6,7-7,2 [37].

Морфология культуры: грамотрицательные, палочковидные, слабоподвижные клетки.

### 2.2 Подготовка инокулята

Культивирование проводилось в строго стерильных условиях с использованием стеклянных колб, наполовину заполненных средой Шлегеля.

Основой стал фосфатный буфер, который состоит из  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 9 и  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5 (г/л). Растворы  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,025;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0 (г/л) и раствор микроэлементов, который содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,228;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,030;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,176;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{NiCl}$  – 0,008 (г/л) добавляли в

соответствии с составом среды Шлегеля [38]. Микроэлементы готовили в соответствии с прописью Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. В качестве источника углерода использовали глюкозу и фруктозу.

Для инкубации культуры использовали шейкер-инкубатор Innova серии «New Brunswick Scientific», США (рисунок 3). Температурный режим – 30°C, аэрация – 200 оборотов.



Рисунок 3 – Шейкер-инкубатор Innova 44

Инокулят получали в стерильных условиях методом ресуспензирования музейной культуры *Cupriavidus necator* В-10646, которая хранилась на агаризованной среде Шлегеля при температуре 5°C.

## 2.3 Анализ проб

### 2.3.1 Подсчёт микроорганизмов в счётной камере

Меласса имеет насыщенный темный цвет из-за чего измерение оптической плотности для контроля роста культуры давала недостоверные результаты. Поэтому мы использовали метод прямого подсчета микроорганизмов в камере Горяева (рисунок 4). Она выполнена в виде предметного стекла, которое имеет углубление с выгравированной сеткой площадью 9 мм<sup>2</sup> в центральной части. Эта сетка разделена на 225 больших квадратов с площадью 0,2 мм<sup>2</sup>, 25 из которых разделены по вертикали и

горизонтали еще на 16 малых квадратов с площадью 0,05 мм<sup>2</sup> каждый. Покровное стекло притирается к предметному до образования «колец Ньютона» и, так как сетка расположена на 0,01 мм ниже соседних участков, туда помещается 0,004 мкл жидкости.

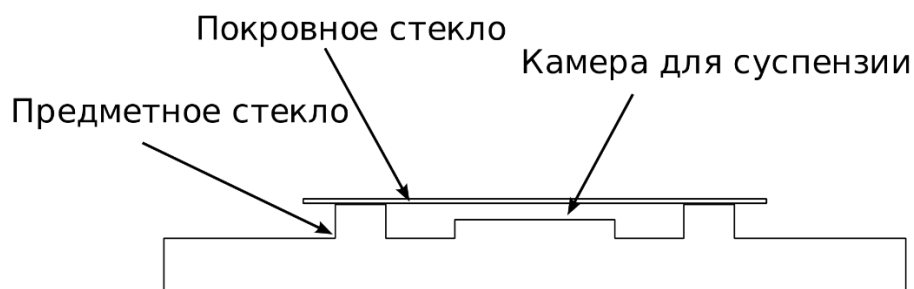


Рисунок 4 – Устройство камеры Горяева

После того, как покровное стекло было плотно прижато к предметному, на площадку камеры Горяева наносили бактериальную суспензию, предварительно окрашенную раствором метиленового синего. Количество клеток в 1 мл суспензии считали по формуле:

$$M = \frac{A \cdot 10^3}{h \cdot S} n, \quad (1)$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии;

h – высота камеры, мм;

S – площадь 1 квадрата сетки, мм;

10<sup>3</sup> – коэффициент перевода см<sup>3</sup> в мм<sup>3</sup>;

n – разведение исследуемой суспензии [39].

### 2.3.2 Определение абсолютно сухой биомассы клеток

Для определения количества биомассы использовали объемно-весовой метод. Аликвоты объемом 3 мл центрифугировали в течение 10 минут при 6000g, затем отмывали клетки дистиллированной водой и снова центрифугировали. Данную процедуру повторяли дважды. Отмытые клетки переносили в бюксы, которые предварительно были доведены до

постоянного веса, и сушили при температуре 105°C в течение 24 часов. После охлаждения бюксов в эксикаторе, взвешивали их на аналитических весах Adventurer, «OHAUS» (США). Вес абсолютно сухой биомассы определяли как разницу между бюксом с клетками и весом чистого бюкса.

На основе полученных данных был построен калибровочный график зависимости количества биомассы от количества клеток (рисунок 5).

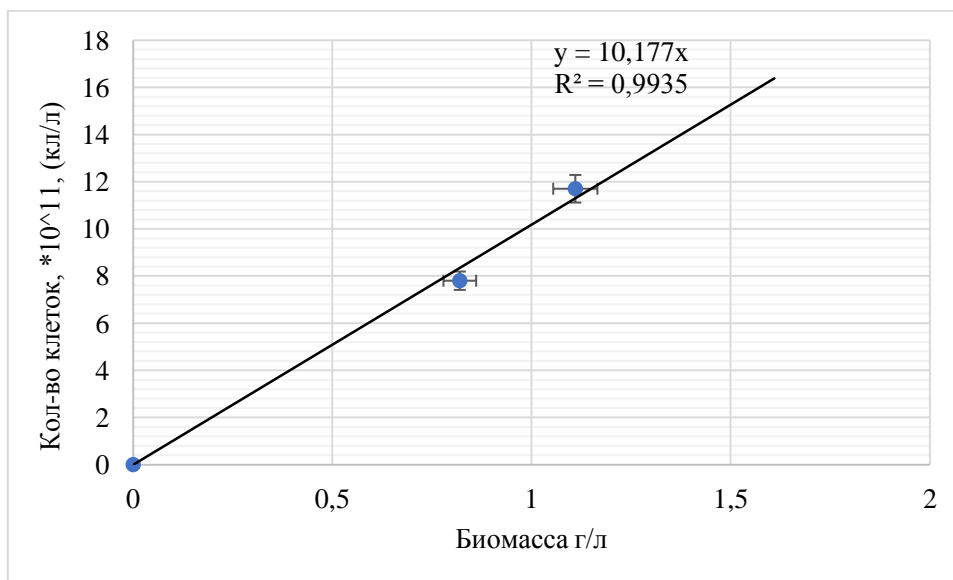


Рисунок 5 – Калибровочный график для определения биомассы

### 2.3.3 Определение концентрации фруктозы

Для определения концентрации фруктозы использовали резорциновый метод [40]. 2 мл бактериальной суспензии центрифугировали, полученный супернатант разводили в 50 раз. 1 мл приготовленной пробы смешивали с 1 мл спиртового раствора резорцина и 3 мл раствора «соляная кислота: дистиллированная вода» в соотношении 5:1. В качестве контроля вместо культуральной среды использовали дистиллированную воду. Затем обе пробирки помещали на водяную баню при  $t=80^{\circ}\text{C}$  на 20 минут. По истечению времени пробирки охлаждали до комнатной температуры, измеряли оптическую плотность на спектрофотометре UNICO 2100 при длине волны 540 нм в кюветах с длиной оптического пути 5 мм.

Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику (рисунок 6).

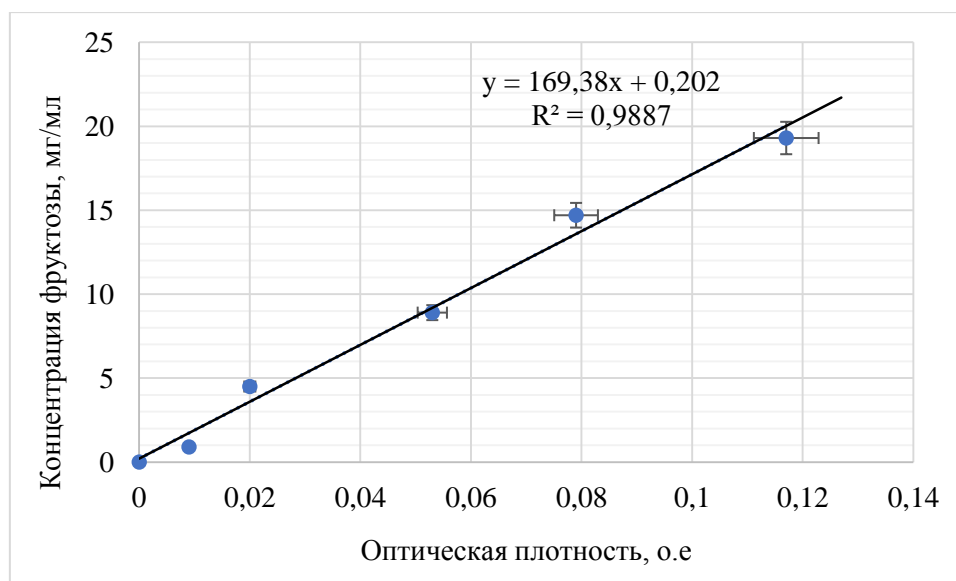


Рисунок 6 – Калибровочный график для определения концентрации фруктозы

### 2.3.4 Определение концентрации глюкозы

Количественное содержание глюкозы определяли при помощи набора «Глюкоза-ФКД» в комплект которого входят калибратор (раствор глюкозы с известной концентрацией) и таблетка ФХС (ферментно-хромогенной смеси), которую предварительно необходимо растворить в 100 мл дистиллированной воды.

2 мл бактериальной суспензии центрифугировали 2 минуты при 6000g, 1 мл фугата разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:4. 2 мл культуры центрифугировали 2 минуты при 6000g.

В 3 пробирки наливали раствор ФХС. В первую добавляли 40 мкл дистиллированной воды – контроль, во вторую – 40 мкл калибратора, в третью – 40 мкл опытной пробы. Пробирки оставляли на 25 минут при комнатной температуре и по истечению времени измеряли оптическую

плотность на спектрофотометре UNICO 2100 при длине волны 490 нм в кюветах с длиной оптического пути 5 мм.

Концентрацию глюкозы определяли по формуле:

$$K = \frac{ОП_о}{ОП_к} * 9,8, \quad (2)$$

где ОП<sub>о</sub> – оптическая плотность опытной пробы, о.е.;

ОП<sub>к</sub> – оптическая плотность калибровочной пробы, о.е.;

9,8 – концентрация глюкозы в калибраторе, г/л.

### 2.3.5 Определение содержания аммонийного азота

Качественное содержание азота определяли следующим образом: к 1 мл фугата добавляли 10 мл дистиллированной воды, 05 мл реактива Несслера и 1 каплю 33%-ного раствора КОН. Раствор менял свой цвет в зависимости от количества азота, окраску сравнивали со стандартом.

## 2.4 Расчет кинетических параметров роста культуры

В качестве кинетических параметров роста культуры рассматривали удельную скорость роста, удельную скорость биосинтеза ПГА и экономический коэффициент по субстрату [41].

Удельную скорость роста культуры ( $\mu$ , ч<sup>-1</sup>) определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_k}{x_n}\right)}{\Delta t}, \quad (3)$$

где  $x_n$  – начальная концентрация бактерий, г/л;

$x_k$  – конечная концентрация бактерий, г/л;

$t$  – время культивирования, ч.

Удельную скорость синтеза полимера ( $\mu_\beta$ , ч<sup>-1</sup>) определяли по формуле:

$$\mu_\beta = \frac{\ln\left(\frac{ПГА_k}{ПГА_n}\right)}{\Delta t}, \quad (4)$$

где ПГА<sub>н</sub> – начальная концентрация полимера в клетках, кг/м<sup>3</sup>;



ПГА<sub>к</sub> – конечная концентрация полимера в клетках, кг/м<sup>3</sup>;

Экономический коэффициент культуры по субстрату (Y, г/г) считали по формуле:

$$Y = \frac{x_k - x_n}{S_k - S_n}, \quad (5)$$

где S<sub>н</sub> – начальное содержание используемого субстрата, г/л;

S<sub>к</sub> – конечное содержание используемого субстрата, г/л.

## **2.5 Определение процентного содержания ПГА в клетках**

Для определения внутриклеточного содержания полимера делали хроматографию метиловых эфиров жирных кислот после предварительной этерификации сухой биомассы. Использовали газовый хроматограф Agilent Technologies 7820A.

Для того, чтобы подготовить образцы для хроматографии, брали 3,0-4,0 мг сухой биомассы, к ней добавляли 1 мл хлороформа (внутренний стандарт), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Пробы выдерживали на водяной бане с обратными холодильниками в течение 3 часов. Затем добавляли 2 мл дистиллированной воды, чтобы произошло разделение жидкостей. Нижний хлороформенный слой использовали для анализа в хроматографии.

## **2.6 Подготовка мелассы для культивирования бактерий**

Для проведения исследования была взята патока-меласса свекловичная. Исходную мелассу подвергали ферментативному гидролизу с целью трансформации сахарозы в более доступные для бактерий моносахара, и затем осветляли 33%-ным раствором перекиси водорода.

### **2.6.1 Предварительная обработка мелассы**

Мелассу разбавляли в мерном цилиндре дистиллированной водой в соотношении 1:1. Приготовленный раствор центрифугировали при 6000g в течение 15 минут и использовали в дальнейших экспериментах [42].

### **2.6.2 Ферментативный гидролиз мелассы**

Ферментативный гидролиз мелассы проводили внеклеточным ферментом  $\beta$ -фруктофуранозидазой, полученным методом автолиза клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для этого 31 г прессованных затворённых в 50 мл воды пекарских дрожжей с добавлением 0,93 г поваренной соли (NaCl) выдерживали при 55°C в течение 1 ч на магнитной мешалке. Полученный автолизат добавляли в раствор мелассы объёмом 250 мл предварительно разбавленной 1:1 дистиллированной водой и доводили pH до 4,5 добавлением концентрированной серной кислоты. Выдерживали при 55°C в течение 24 часов на магнитной мешалке. После гидролиза мелассу нейтрализовали раствором КОН до pH 7,0 [34].

### **2.6.3 Осветление мелассы раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Для удаления несахаров из мелассы и снижения интенсивности окраски проводили её осветление (Славянский и др., 2005) [25]. Полученный гидролизат нагревали до 55°C на плитке с магнитной мешалкой и добавляли 33%-ный раствор перекиси водорода в объёмном соотношении 7 % от объёма мелассы и выдерживали 24 часа при 55°C. Затем мелассу остужали и центрифугировали при 6000g в течении 5 минут.

Очищенную таким образом мелассу использовали в качестве углеродного субстрата для бактериальной культуры.

### **3. Результаты и обсуждения**

#### **3.1 Химический состав мелассы**

Страницы 27-33 изъяты в связи с авторским правом

## ВЫВОДЫ

1. Исследован химический состав мелассы. Показано, что при правильной подготовке мелассы, в ней содержится более 200 г/л моносахаров и практически все макро- и микроэлементы необходимые для полноценного протекания процесса культивирования.

2. Исследование процесса культивирования *Cupriavidus necator* В-10646 на мелассе показало, что глюкозно-фруктозный субстрат гидролизованной мелассы не уступает по эффективности процессу выращивания бактерий на отдельных субстратах глюкозы или фруктозы. Кроме того, полученные данные свидетельствуют, что культивирование на мелассе позволяет ее использовать в качестве единственного углеродного и азотного субстрата. Также данный процесс более эффективно протекает в условиях использования экспериментальной водной среды с добавлением фосфора.

3. Использование мелассы показало целесообразность ее использования в качестве основного субстрата для биосинтеза полигидроксиалканоатов.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Raza Z. A., Abid S., Banat I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2018. – Т. 126. – С. 45-56.
2. Бессонова В. А., Ануфриева К. М. Полигидроксиалканоаты-новые биоматериалы //Современные научные исследования и инновации. – 2016. – №. 7. – С. 25-27.
3. Amache R. et al. Advances in PHAs production //Chemical engineering transactions. – 2013. – Т. 32. – С. 931-936.
4. Albuquerque M. G. E. et al. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses //Journal of biotechnology. – 2007. – Т. 130. – №. 4. – С. 411-421.
5. Medjeber N. et al. Screening and production of polyhydroxyalkanoates by Bacillus megaterium by the using cane and beet molasses as carbon sources //Der Pharm Lett. – 2015. – Т. 7. – №. 6. – С. 102-109.
6. Gouda M. K., Swellam A. E., Omar S. H. Production of PHB by a Bacillus megaterium strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources //Microbiological research. – 2001. – Т. 156. – №. 3. – С. 201-207.
7. Kaur L. et al. Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis to commercial production-A review //Journal of Microbiology, biotechnology and Food sciences. – 2021. – Т. 2021. – С. 1098-1106.
8. Santhanam A., Sasidharan S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from Alcaligenes spp. and Pseudomonas oleovorans using different carbon sources //African Journal of Biotechnology. – 2010. – Т. 9. – №. 21. – С. 3144-3150.
9. Yu J. Microbial production of bioplastics from renewable resources //Bioprocessing for value-added products from renewable resources. – Elsevier, 2007. – С. 585-610.

10. Miranda De Sousa Dias M. et al. Fed-batch synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from sucrose and 4-hydroxybutyrate precursors by Burkholderia sacchari strain DSM 17165 //Bioengineering. – 2017. – Т. 4. – №. 2. – С. 36.
11. Du C. et al. Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials //Current Chemical Biology. – 2012. – Т. 6. – №. 1. – С. 14-25.
12. Pagliano G. et al. Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes //Biotechnology for Biofuels. – 2017. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-24.
13. Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксидоканоаты (ПОА)–биоразрушаемые полимеры для медицины. – 2003.
14. Braunegg G. et al. Production of PHAs from agricultural waste material //Macromolecular symposia. – Weinheim, Germany : WILEY- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999. – Т. 144. – №. 1. – С. 375-383.
15. Volodina E., Raberg M., Steinbüchel A. Engineering the heterotrophic carbon sources utilization range of Ralstonia eutropha H16 for applications in biotechnology //Critical reviews in biotechnology. – 2016. – Т. 36. – №. 6. – С. 978-991.
16. Kumar M. et al. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects //Journal of Cleaner Production. – 2020. – Т. 263. – С. 121500.
17. Volova T. G. et al. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates //Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. – 2012. – Т. 5. – №. 3. – С. 280-299.
18. Sohn Y. J. et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sucrose by metabolically engineered Escherichia coli strains //International journal of biological macromolecules. – 2020. – Т. 149. – С. 593-599.

19. Silva L. F. et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol //International journal of biological macromolecules. – 2014. – Т. 71. – С. 2-7.
20. 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.
21. Волова Т. Г. и др. Введение в биотехнологию. – 2008.
22. Rajaeifar M. A. et al. A review on beet sugar industry with a focus on implementation of waste-to-energy strategy for power supply //Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2019. – Т. 103. – С. 423-442.
23. Яровенко В. Л. и др. Технология спирта. – 2002.
24. Беккер М. Е. Введение в биотехнологию. – Рипол Классик, 1978.
25. Шнайрман Л. О. Производство витаминов из растительного и животного сырья. – 1950.
26. Arikawa H., Matsumoto K., Fujiki T. Polyhydroxyalkanoate production from sucrose by *Cupriavidus necator* strains harboring csc genes from *Escherichia coli* W //Applied microbiology and biotechnology. – 2017. – Т. 101. – С. 7497-7507.
27. Park S. J. et al. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose //Biotechnology and bioengineering. – 2015. – Т. 112. – №. 3. – С. 638-643.
28. Dalsasso R. R. et al. Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate //Process Biochemistry. – 2019. – Т. 85. – С. 12-18.
29. Tomotani E. J., Vitolo M. Inverted sugar syrup attained from sucrose hydrolysis using a membrane reactor //Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Т. 46. – С. 571-577.

30. Yu J. Processes for producing microbial copolyesters from sucrose-containing feedstocks : пат. 9796988 США. – 2017.
31. Чесноков Н. В. и др. Изучение реакции кислотно-каталитического гидролиза сахарозы //Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2012. – Т. 5. – №. 3. – С. 311-319.
32. Ben Taher I. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues //Biotechnology Progress. – 2017. – Т. 33. – №. 2. – С. 397-406.
33. A Mahmood W. Hydrolysis of sucrose by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* invertase //Mesopotamia Journal of Agriculture. – 2010. – Т. 38. – №. 1. – С. 2-11.
34. Пат. RU2158761C1 Российская Федерация. Способ получения иммобилизованной инвертазы для гидролиза сахарозы / Е. М. Рязанов. – опубл. 10.11.00.
35. Islam M. F., Lampen J. O. Invertase secretion and sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts //Biochimica et Biophysica Acta. – 1962. – Т. 58. – №. 2. – С. 294-302.
36. Martínez D. et al. Complete sucrose hydrolysis by heat-killed recombinant *Pichia pastoris* cells entrapped in calcium alginate //Microbial Cell Factories. – 2014. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-9.
37. Пат. №2439143 Российская Федерация, МПК51 С 12 N 1/20, С 12 Р 7/62. Штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* ВКПМ В-10646 – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения / Т. Г. Волова, Е.И. Шишацкая. - № 2010146514/10; заяв. 15.11.10; опуб. 10.01.2012, Бюл. № 1. – 13 с.
38. Park S. J. et al. Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose //Biotechnology and bioengineering. – 2015. – Т. 112. – №. 3. – С. 638-643.
39. Прунтова О. В., Сахно О. Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – 2005.



40. Ермаков А. И. и др. Методы биохимического исследования растений //Л.: Агропромиздат. – 1987. – Т. 143.

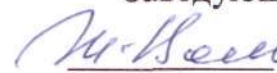
41. Волова Т. Г. и др. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения //Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2013. – Т. 55. – №. 7. – С. 775-775.

42. Küçükaşık F. et al. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp //Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – Т. 89. – С. 1729-1740.

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

Заведующая кафедрой

 Г. Г. Волова

« 26 » июня 20 23 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

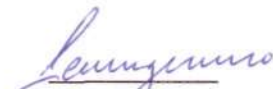
06.03.01 – Биология

Использование мелассы в качестве субстрата для биосинтеза

полигидроксиалканоатов

тема

Руководитель

  
подпись, дата

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

А.В. Демиденко

Выпускник

  
подпись, дата

М.В. Филимонова

Красноярск 2023