

УДК 579.6

Biosynthesis and Properties of PHA Containing Monomers 3-Hydroxy-4-Methylvalerate

Olga N. Vinogradova^{a,b,*} and Tatiana G. Volova^{a,b}

^a*Siberian Federal University*

79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia

^b*Institute of Biophysics SB RAS*

50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Received 15.11.2015, received in revised form 11.03.2016, accepted 01.06.2016

*The ability of wild-type strain *Cupriavidus eutrophus* B10646 to synthesize copolymers containing 3-hydroxy-4-methylvalerate (3H4MV) [P(3HB/3HV/3H4MV)] was studied. The possibility of synthesis of terpolymers containing 3HB, 3HV and 3H4MV monomers using glucose, or butyric acid and co-substrate was shown. A family of copolymers with different content of 3H4MV monomer was synthesized. The highest content of 3H4MV was 7.7 mol. %. Increase of 3HV and 3H4MV content in copolymers caused the reduction of crystallinity degree and of molecular weight, and changes of thermal characteristics of copolymers.*

*Keywords: polyhydroxyalkanoates, poly(3-hydroxybutyrate/3-hydroxy-4-methylvalerate), *Cupriavidus eutrophus* B10646, substrates-precursors, 4-methylvalerate.*

DOI: 10.17516/1997-1389-2016-9-2-145-152.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: olgav88@mail.ru

Биосинтез и свойства ПГА, содержащих мономеры 3-гидрокси-4-метилвалерата

О.Н. Виноградова^{а,б}, Т.Г. Волова^{а,б}

^аСибирский федеральный университет
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

^бИнститут биофизики СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

*Исследована способность природного штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646 синтезировать сополимеры, содержащие 3-гидрокси-4-метилвалерат (ЗГ4МВ) [П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ)]. Показана возможность синтеза трехкомпонентных сополимеров, содержащих мономеры ЗГБ, ЗГВ и мономеры ЗГ4МВ при использовании глюкозы или масляной кислоты и субстрата-предшественника. Синтезировано семейство сополимеров с различным соотношением мономеров и содержанием ЗГ4МВ максимально до 7,7 мол. %. Показано существенное снижение степени кристалличности при увеличении содержания мономеров ЗГВ и ЗГ4МВ на фоне изменения термического поведения сополимеров и падения величины молекулярной массы.*

*Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, поли(3-гидроксибутират/3-гидрокси-4-метилвалерат), *Cupriavidus eutrophus* B10646, субстрат-предшественник, 4-метилвалерат.*

Введение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры, синтезируемые микроорганизмами при лимитировании роста элементами конструктивного метаболизма. Наиболее распространенным и изученным представителем ПГА является гомополимер поли(3-гидроксибутират) [П(ЗГБ)] (Choi, Lee, 1999; Huisman, Madison, 1999), однако П(ЗГБ) обладает высокой степенью кристалличности (70-80 %), что затрудняет изготовление из него изделий. Для улучшения свойств полимеров проводится работа, направленная на изучение возможности синтеза сополимеров П(ЗГБ) с другими мономерами. Список известных типов ПГА пополняется, и в настоящее время появляется информация о возможности микробного синтеза полимеров этого класса, содержащих новые, в том числе нео-

бычные, мономеры (Chia et al., 2010; Sudesh et al., 2000). Сравнительно недавно в литературе появились данные по синтезу сополимерных ПГА, содержащих в своем составе мономеры 3-гидрокси-4-метилвалерата (ЗГ4МВ) (Dai et al., 2007; Tanadchangsang et al., 2009; Saika et al., 2011). К настоящему времени в качестве продуцентов этих сополимеров в основном описаны генетически модифицированные штаммы (Chia et al., 2010; Tanadchangsang et al., 2009; Saika et al., 2011; Lau et al., 2011) и в меньшей степени природные микроорганизмы (Tanadchangsang et al., 2009; Lau et al., 2010, 2011; Lau, Sudesh, 2012), обладающие такой способностью. В серии работ описаны условия синтеза сополимеров, содержащих мономеры ЗГ4МВ, на различных субстратах: глюкозе (Tanadchangsang et al., 2009; Saika et al., 2011; Lau et al., 2011; Lau, Sudesh,

2012), валерате, пропионате (Lau et al., 2010), соевом масле (Watanabe et al., 2012). При этом малоизученным остается вопрос о физико-химических свойствах сополимеров этого типа.

Целью настоящей работы было исследование условий микробиологического синтеза и физико-химических свойств сополимеров, содержащих мономеры 3Г4МВ.

Материалы и методы

Исследован штамм *Cupriavidus eutrophus* B10646, обладающий способностью синтезировать сополимерные ПГА, образованные коротко- и среднецепочечными мономерами гидроксипроизводных алкановых кислот различного строения, и имеющий широкий органотрофный потенциал (Volova et al., 2013, 2014).

Для культивирования бактерий использовали стандартную минеральную среду Шлегеля (Schlegel, 1961) с лимитированным содержанием азота в среде (40 % от потребностей культуры в элементе) (NH_4Cl – 0,4 г/л). В качестве основного источника углерода брали глюкозу или масляную кислоту (Panreac, ЕС), последнюю нейтрализовали 33%-ным раствором КОН (рН 7,0±0,2), затем стерилизовали фильтрацией с применением мембранного фильтра Opticap XL300 Millipore «Экспресс» SHC (США).

Бактерии выращивали в стеклянных конических колбах объемом 2 л, наполовину заполненных минеральной средой в термостатируемом шейкер-инкубаторе Innova® серии 44 (New Brunswick Scientific, США) при температуре 30 °С и 200 об/мин. Концентрацию глюкозы или масляной кислоты поддерживали в культуре на уровне 20 или 0,5-1,0 г/л соответственно в связи с ранее определенными границами физиологического действия этих углеродных субстратов (Volova et

al., 2011). Для синтеза трехкомпонентных ПГА [П(3ГБ/3ГВ/3Г4МВ)] в культуральную среду вносили субстрат-предшественник 4-метилвалерат (Sigma, США), используя режим дробного дозирования, при котором однократная доза не превышала 1,5 г/л. Культивирование проводили в течение 96 ч, добавки субстрата-предшественника вносили на 24-, 48- и 72-й ч.

Урожай биомассы клеток бактерий оценивали измерением оптической плотности культуры и по весу сухого вещества. Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после предварительного метанолиза образцов на хромато-масс-спектрометрической системе 7890/5975С (Agilent Technologies, США), а также ¹Н ЯМР-спектроскопией растворов ПГА в дейтерированном хлороформе (CDCl_3) на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 (Bruker, Германия).

Концентрацию глюкозы в среде определяли с помощью набора «Глюкоза – ФКД», включающего ферментно-хромогенную смесь и калибратор (раствор глюкозы с известной концентрацией, 10 ммоль), фотометрически на фотоколориметре КФК-2МП (Россия). Концентрацию азота устанавливали фотометрическим методом с реактивом Несслера, масляной кислоты и 4-метилвалерата – с помощью газохроматографического анализа (7890/5975С, Agilent Technologies, США) после предварительной экстракции хлороформом из подкисленных образцов культуральной среды (рН 2-3).

Исследования физических свойств образцов ПГА включали измерение молекулярно-массовых характеристик методом гелепроникающей хроматографии (1260 Infinity, Agilent Technologies, США): средневесовой (M_w), среднечисловой (M_n) молекулярной массы и полидисперсности (\bar{D}), позволяю-

щей оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости; температурных характеристик (дифференциально-сканирующая калориметрия (DSC-1, Mettler Toledo, Швейцария); степени кристалличности (на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE (Bruker, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартным отклонением.

Результаты и обсуждение

В культуре бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646, выращиваемой на моноуглеродном субстрате (глюкоза 20 г/л) при лимитировании роста по азоту, урожай био-

массы и содержание полимера за 96 ч культивирования составили 7,3 г/л и 86 % соответственно. Синтезированный полимер был представлен гомополимером 3-гидроксибутирата (ЗГБ). Синтез сополимерных ПГА исследован при внесении в культуру бактерий субстрата-предшественника: 4-метилвалерата (4МВ). Варьируя режим углеродного питания и количество вносимых добавок дополнительных углеродных субстратов, удалось синтезировать трехкомпонентный полимер с различным соотношением мономеров ЗГБ, ЗГВ и ЗГ4МВ (табл. 1).

Из представленных данных следует, что 4-метилвалерат ингибировал рост бактерий и в еще большей степени накопление полимера. При внесении 4-метилвалерата в концентрации 0,5 г/л включение мономеров ЗГВ и ЗГ4МВ в сополимере составило 10,0

Таблица 1. Содержание в биомассе и состав полигидроксиалканоатов, синтезируемых бактериями *Cupriavidus eutrophus* B10646 в различных условиях углеродного питания (среднее±стандартное отклонение, n=3)

Концентрация 4-метилвалерата*, г/л	Выход сухой биомассы, г/л	Содержание полимера, % от сухой биомассы	Выход полимера, г/л	Состав полимера, мол. %		
				ЗГБ	ЗГВ	ЗГ4МВ
Глюкоза 20 г/л						
0,0	7,31±0,33	86,0±2,1	6,29±0,37	100,0	0,0	0,0
0,5	5,63±0,31	40,4±2,0	2,27±0,16	83,3	10,0	6,7
1,0	4,82±0,24	21,5±1,5	1,04±0,07	85,3	7,0	7,7
1,5	2,01±0,20	10,2±0,9	0,20±0,01	97,7	1,6	0,7
Масляная кислота 0,5 г/л						
0,0	4,65±0,21	52,1±2,3	2,42±0,18	100,0	0,0	0,0
0,5	4,24±0,30	36,2±2,1	1,53±0,07	82,3	12,6	5,1
1,0	4,72±0,34	39,1±1,3	1,84±0,10	73,9	21,5	4,6
1,5	1,51±0,21	26,4±1,1	0,40±0,01	82,9	16,1	1,0
Масляная кислота 1,0 г/л						
0,0	6,25±0,33	84,0±2,5	5,25±0,28	100,0	0,0	0,0
0,5	5,41±0,30	80,2±2,7	4,34±0,19	90,5	6,3	3,2
1,0	5,64±0,24	78,6±2,4	4,43±0,21	71,1	23,3	5,6
1,5	1,61±0,07	48,3±1,5	0,78±0,03	88,4	7,3	4,3

* Каждая добавка 4-метилвалерата была внесена на 24, 48 и 72 час культивирования.

и 6,7 мол. % соответственно, общий выход сополимера – 40 %. При увеличении концентрации 4-метилвалерата до 1,5 г/л оба показателя снижались (до 1,6 и 0,7 мол. % соответственно) на фоне снижения общего выхода полимера (до 10 %). Максимальное включение мономеров 3Г4МВ (7,7 мол. %) получено при добавлении 4МВ в концентрации 1,0 г/л. Общий выход сополимера при этом был низким (20 %).

Полученные данные согласуются с результатами зарубежных авторов по токсическому влиянию субстратов-предшественников на рост бактерий и синтез ПГА. Так, в одной из первых работ сополимер П(3ГБ/3ГВ/3Г4МВ) был получен в культуре рекомбинантного штамма *Ralstonia eutropha* РНВ-4 при росте на глюкозе с добавками 4-метилвалерата или 4-метил-2-пентеноата (Tanadchangsang et al., 2009). При этом содержание мономеров 3Г4МВ было на уровне 13 мол. %, урожай биомассы и общий выход сополимера – 1,5 г/л и 46 %. В работе Lau (2011) при культивировании дикого штамма *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) и его трансформированного штамма, содержащего плазмиду pBBREE32d13 с геном ПГА-синтазы из *A. caviae*, на фруктозе с добавлением 4-метилвалерата получены более высокие результаты. Выход биомассы и сополимера составили 4,5 г/л и 24 % и 3,72 г/л и 17 % у дикого и трансформированного штамма соответственно, однако содержание мономеров 3Г4МВ было высоким (21 мол. %) у трансформированного штамма и низким (1 мол. %) у дикого штамма.

Замена глюкозы масляной кислотой сопровождалась увеличением общего выхода сополимера П(3ГБ/3ГВ/3Г4МВ) и включением мономеров 3ГВ, содержание мономеров 3Г4МВ оставалось на том же уровне. Варьирование концентрации 4-метилвалерата не позволило повысить величину включения мо-

номеров 3Г4МВ в сополимер (табл. 1). В связи с токсичностью масляной кислоты в концентрации 1 г/л выход биомассы (6,2 г/л) был несколько ниже, чем на глюкозе (7,3 г/л).

Снижение концентрации масляной кислоты до 0,5 г/л привело к снижению содержания полимера до 52 % и выходу биомассы до 4,6 г/л, что, вероятно, обусловлено недостаточной концентрацией субстрата, однако при этом возросло содержание в сополимере мономеров 3ГВ (до 12,6-21,5 мол. %) при низком уровне мономеров 3Г4МВ (1,0-5,1 мол. %). Дробное внесение 4-метилвалерата в культуру бактерий при суммарном количестве внесенного вещества 3 г/л и стабилизации концентрации масляной кислоты на уровне 1,0 г/л позволило получить сополимер с включением мономеров 3ГВ и 3Г4МВ на более высоком уровне – 23,3 и 5,6 мол. % соответственно.

Таким образом, при варьировании типа и концентрации основного углеродного субстрата (глюкоза и масляная кислота) и режимов дозирования субстрата-предшественника (4-метилвалерата) удалось увеличить общий выход трехкомпонентного сополимера до 78 % при содержании мономеров 3ГВ и 3Г4МВ соответственно 23,3 и 5,6 мол. %.

Синтезирована и исследована линейка сополимерных образцов с различным соотношением мономеров 3ГБ, 3ГВ и 3Г4МВ (табл. 2).

Молекулярно-массовые характеристики являются одним из наиболее важных параметров, характеризующих свойства высокомолекулярных соединений и определяющих технологические свойства полимеров. Значение среднечисловой молекулярной массы (M_n) у сополимеров варьировало от 100 до 166 кДа и было в 2,0-3,5 раза ниже, чем у гомополимера П(3ГБ) (365 кДа); M_w также была ниже, чем у гомополимера (920 кДа),

Таблица 2. Химический состав и свойства гомополимера П(ЗГБ) и трехкомпонентных ПГА, образованных мономерами ЗГБ, ЗГВ и ЗГ4МВ

Состав ПГА, мол. %			M _ч , кДа	M _в , кДа	ПД	C _х , %	T _{стекл.} , °C	T _{крист.} , °C	T _{пл.} , °C	T _{дегр.} , °C
ЗГБ	ЗГВ	ЗГ4МВ								
100,0	0,0	0,0	365	920	2,52	76	-	99,0	173,1	280,8
88,4	7,3	4,3	130	566	4,36	42	1,6	72,4	153,4; 165,9	295,2
84,2	14,0	1,8	153	590	3,85	44	1,2	68,6	146,4; 158,0	296,2
82,3	12,6	5,1	100	415	4,15	43	1,2	55,9	146,6; 160,8	296,0
71,1	23,3	5,6	166	585	3,53	44	0,9	57,5	142,3; 156,7	296,6

Примечание: M_ч – среднечисловая молекулярная масса, M_в – средневесовая молекулярная масса, ПД – полидисперсность, C_х – степень кристалличности, T_{стекл.} – температура стеклования, T_{крист.} – температура кристаллизации, T_{пл.} – температура плавления, T_{дегр.} – температура термической деградации, «-» – не обнаружено.

в пределах 415-590 кДа. У всех полученных трехкомпонентных образцов полидисперсность находилась на относительно высоком уровне – 3,53-4,36.

Для полученных сополимерных образцов сняты термограммы в широком диапазоне температур, включающих границы стеклования (T_{стекл.}), кристаллизации (T_{крист.}), плавления (T_{пл.}) и термической деградации (T_{дегр.}) полимера. При исследовании температурных характеристик (табл. 2) у трехкомпонентных образцов зафиксировано наличие двух пиков температуры плавления, различающихся по величине на 12-14 °C. Вторая особенность в термическом поведении трехкомпонентных образцов заключается в обнаруженном значительном (140-150 °C) разрыве между T_{пл.} и T_{дегр.}, что выше известных и полученных ранее данных для различных представителей ПГА. При этом температура термической деградации для трехкомпонентных сополимеров и П(ЗГБ) была близкой. В отличие от сополимерных ПГА у П(ЗГБ) не обнаружено пика T_{стекл.}. Существенных отличий в температуре стеклования и кристаллизации не зафиксировано.

Результаты рентгеноструктурного анализа показали, что степень кристалличности синтезированных сополимерных образцов

также существенно отличалась от таковой у высококристаллического гомополимера (76 %) и была значительно ниже, в пределах 42-44 %. Это согласуется с данными работы (Tanadchangsang et al., 2010), в которой показано снижение степени кристалличности пленок П(ЗГБ/ЗГ4МВ) с 60 до 13 % при увеличении содержания мономеров ЗГ4МВ от 0 до 39 мол. %. Зависимости значения степени кристалличности от мономерного состава сополимера не выявлено.

Заключение

Показана возможность синтеза природным штаммом *Cupriavidus eutrophus* В10646 трехкомпонентных сополимерных ПГА, содержащих, помимо мономеров ЗГБ и ЗГВ, мономеры ЗГ4МВ. Варьирование условий углеродного питания, включая дозирование субстрата-предшественника, позволило синтезировать линейку образцов с различным соотношением мономеров. Исследованы физико-химические свойства образцов сополимеров и показано существенное снижение степени кристалличности при увеличении содержания мономеров ЗГВ и ЗГ4МВ на фоне изменения термического поведения сополимеров и падения молекулярной массы.

Работа выполнена за счет средств государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № гос. регистрации 01201351505).

Список литературы

Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. (1972) *Методы биохимического исследования растений*. Л., Колос, 306 с. [Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P., Peruviansky Y.V., Lukovnikova G.A., Ikonnikova M.I. (1972) *Biochemical methods of research of plants*. Leningrad, Kolos, 306 p. (in Russian)]

Chia K.-H., Ooi T.-F., Saika A., Tsuge T., Sudesh K. (2010) Biosynthesis and characterization of novel polyhydroxyalkanoate polymers with high elastic property by *Cupriavidus necator* PHB-4 transformant. *Polymer Degradation and Stability*, 95: 2226-2232

Choi J., Lee S.Y. (1999) Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51: 13–21

Dai Y., Yuan Z., Jack K., Keller J. (2007) Production of targeted poly(3-hydroxyalkanoates) copolymers by glycogen accumulating organisms using acetate as sole carbon source. *Journal of Biotechnology*, 129: 489–497

Huisman G.W., Madison L.L. (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 21–53

Lau N.-S., Sudesh K. (2012) Revelation of the ability of *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer. *AMB Express*, 2: 41

Lau N.-S., Chee J.-Y., Tsuge T., Sudesh K. (2010) Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM (JCM15050). *Bioresource Technology*, 101: 7916–7923

Lau N.-S., Tsuge T., Sudesh K. (2011) Formation of new polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer in *Burkholderia* sp. *Applied Microbiology Biotechnology*, 89: 1599–1609

Saika A., Watanabe Y., Sudesh K., Abe H., Tsuge T. (2011) Enhanced incorporation of 3-hydroxy-4-methylvalerate unit into biosynthetic polyhydroxyalkanoate using leucine as a precursor. *AMB Express*, 1: 6

Schlegel H.G., Kaltwasser H., Gottschalk G. (1961) A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies. *Archives of Microbiology*, 38: 209–222

Sudesh K., Abe H., Doi Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress Polymer Science*, 25: 1503

Tanadchangsang N., Kitagawa A., Yamamoto T., Abe H., Tsuge T. (2009) Identification, biosynthesis, and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymer consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxy-4-methylvalerate. *Biomacromolecules*, 10: 2866–2874

Tanadchangsang N., Tsuge T., Abe H. (2010) Comonomer compositional distribution, physical properties, and enzymatic degradability of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-4-methylvalerate) copolyesters. *Biomacromolecules*, 11: 1615–1622

Volova T.G., Kiselev E.G., Shishatskaya E.I., Zhila N.O., Boyandin A.N., Syrvacheva D.A., Vinogradova O.N., Kalacheva G.S., Vasiliev A.D., Peterson I.V. (2013) Cell growth and PHA

accumulation from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646. *Bioresource Technology*, 146: 215-222

Volova T.G., Kiselev E.G., Vinogradova O.N., Nikolaeva E.D., Chistyakov A., Sukovaty A.G., Shishatskaya E.I. (2014) A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus eutrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs. *PLoS One*, 9: 1-15

Volova T.G., Zhila N.O., Kalacheva G.S., Sokolenko V.A., Sinski E.J. (2011) Synthesis of 3-hydroxybutyrate-CO-4-hydroxybutyrate copolymers by hydrogen-oxidizing bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 494-499

Watanabe Y., Ichinomiya Y., Shimada D., Saika A., Abe H., Taguchi S., Tsuge T. (2012) Development and validation of an HPLC-based screening method to acquire polyhydroxyalkanoate synthase mutants with altered substrate specificity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113: 286–292