

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующей кафедрой

_____ В.А. Кратасюк

«__» _____ 2016г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

Микробиологический синтез полигидроксиалканоатов водородокисляющими бактериями *Cupriavidus eutrophus* В10646 с использованием прекурсоров

Руководитель _____

к.т.н., доцент

Е.Г. Киселев

Выпускник _____

Е.В. Петерфельд

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Текст 47 с., 11 рис., 4 табл., 7 формул, 57 источников.

СИНТЕЗ, КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПГА, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ/4-ГИДРОКСИБУТИРАТ), 4-ГИДРОКСИБУТИРАТ, *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS*, МАСЛЯНАЯ КИСЛОТА, 4-БРОММАСЛЯНАЯ КИСЛОТА.

Цель: определение влияния режима углеродного питания на продукцию сополимера 3ГБ/4ГБ, при которых содержание мономера 4ГБ в сополимере будет максимальным с использованием различных прекурсоров и изучение физико-химических свойства сополимеров 3- и 4-гидроксимасляной кислоты.

Актуальность данной работы заключается в высоких технологических свойствах этого сополимера, имеющего низкую степень кристалличности и высокую эластичность.

В результате проведённых экспериментов исследован рост штамма-продуцента в культуре и выход полимера у бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646 в гетеротрофных условиях. Максимальное содержание 4ГБ в гетеротрофных условиях роста бактерий было получено на среде с масляной кислотой в качестве основного ростового субстрата и 4-броммасляной кислотой в качестве прекурсора. Отработаны режимы культивирования и составы питательной среды, обеспечившие получение линейки сополимеров с различным содержанием мономеров 4-гидроксибутирата. Исследовано влияние содержания мономеров 4-гидроксibuтирата в сополимере на физико-химические свойства и установлено, что при увеличении содержания 4ГБ снижается степень кристалличности сополимера.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	7
1.1. Характеристика полигидроксиалканоатов.....	7
1.2. Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА.....	9
1.3. Синтез мономера 4ГБ.....	11
1.4. Влияние условий культивирования на синтез сополимеров поли(3ГБ/4ГБ)	14
1.5. Биохимические пути синтеза ПГА.....	17
2. Материалы и методы.....	21
2.1. Объект исследования.....	21
2.2. Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования.....	21
2.2.2. Контроль химических параметров процесса культивирования бактерий 24	
2.2.3. Определение содержания и состава полимера.....	25
2.3. Статистическая обработка данных.....	27
3. Результаты и обсуждения исследования.....	28
3.1. Определения констант насыщения и ингибирования для глюкозы и масляной кислоты.....	28
3.2. Определение наиболее активно действующего прекурсора.....	30
3.3. Выращивание бактерий <i>Cupriaviduseutrophus</i> B10646 на среде, содержащей в качестве субстрата масляную кислоту.....	33
3.4. Выращивание бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646 на среде, содержащей в качестве субстрата глюкозу.....	34
3.5. Выращивание бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646 на разных концентрациях 4-броммасляной кислоты.....	35
3.6. Дробные добавки 4-броммасляной кислоты.....	36
3.7. Свойства сополимеров 3-и 4-гидроксимаслянной кислоты.....	37
Выводы.....	40

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия загрязнение окружающей среды синтетическими полимерами является одной из важнейших проблем современного мира, вопрос о том, как решить эту проблему давно волнует человечество. Все дело в том, что применение синтетических полимеров приносит дисбаланс в углеродный цикл, так как уровень потребления углеродосодержащих ресурсов намного превосходит уровень их восполнения.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода [34]. ПГА в настоящее время становятся реальными кандидатами на роль материалов XXI века, с ними связаны большие надежды, так как помимо термопластичности аналогично полипропилену и полиэтилену, эти биопластики обладают пьезоэлектрическим эффектом и характеризуются высокой биосовместимостью.

Особо перспективными ПГА являются сополимеры, имеющие низкую кристалличность и обладающие свойствами эластомеров. Это короткоцепочечные сополимеры 3- и 4-гидроксибутирата, а также сополимеры, содержащие, помимо коротко-, среднецепочечные мономеры, например 3-гидроксигексаноат (ЗГГ) [40].

На сегодняшний день работ, посвященных синтезу поли(ЗГБ/4ГБ), достаточно много, однако результаты, приводимые авторами, в некоторой степени можно считать противоречивыми, главным образом из-за использования разными авторами различных штаммов микроорганизмов, разных ростовых субстратов и условий культивирования. Так же синтез

сополимерных ПГА является сложной биотехнологической задачей, так как для их получения в состав среды, как правило, необходимо внесение дополнительных источников углерода в качестве субстратов-предшественников целевых мономеров, которые в подавляющем большинстве ингибируют рост продуцентов. Это негативно сказывается на общей продуктивности процесса биосинтеза по биомассе клеток и общих выходах сополимеров [5]. А значит, возникает необходимость в поиске новых прекурсоров, которые бы не ингибировали рост бактерий и давали более высокое содержание мономера 4ГБ в сополимере.

Наиболее ценным свойством является возможность синтеза биополимеров различного состава с различными свойствами. Существенное внимание многими авторами уделяется бактериям *Cupriavidus metallotrophicus* в связи со способностью этих бактерий аккумулировать ПГА с высокими выходами на различных субстратах, в том числе различного состава (гомогенный полигидроксibuтират, более технологичные сополимеры гидроксibuтирата с гидроксигексаноатом (поли(3ГБ/3ГГ)), сополимеры 3- и 4-гидроксимасляной кислоты (поли(3ГБ/4ГБ)). В зависимости от содержания фракции 4-гидроксibuтирата в сополимере П[3ГБ/4ГБ], полимер может быть как высококристаллическим так и эластичным. Сопolíмеры с высоким содержанием 4ГБ являются термопластичными эластомерами, удлинение при разрыве данных сополимеров имеет более высокие значения по сравнению с большинством общеизвестных пластиков, к примеру, полипропилен и полиэтилен, а предел прочности на разрыв лежит в тех же пределах, что и у этих полимеров. Недавно было показано, что сополимеры с высоким содержанием 4ГБ обладают высокими механическими свойствами и перспективны для применения в медицине, в том числе биоразрушаемых материалов и эндопротезов [7,39].

Цель работы: определение влияния режима углеродного питания на продукцию сополимера 3ГБ/4ГБ, при которых содержание мономера 4ГБ в

сополимере будет максимальным с использованием различных прекурсоров и изучение физико-химических свойства сополимеров 3- и 4-гидроксимасляной кислоты.

Задачи:

- Определение влияния субстратов-предшественников (прекурсоров) на синтез мономера 4ГБ и выбор наиболее активного влияющих субстратов-предшественников на выход биомассы, содержание полимера, и процентное содержание мономера 4ГБ в полимере.

- Определение параметров обеспечивающих продуктивный синтез сополимера 3ГБ/4ГБ.

- Изучение физико-химических свойств в зависимости от соотношения мономеров.

1. Обзор литературы

1.1. Характеристика полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты (ПГА, англоязычная аббревиатура - PHA) обладают многими свойствами, привлекательными для различных сфер, включая биомедицинскую. Привлекательность и перспективность ПГА обусловлена наличием весьма существенных преимуществ этого класса биоматериалов:

- высокая биосовместимость ПГА, в частности, поли-3-гидроксибутирата, связана с тем, что мономер, образующий этот полимер – 3-гидроксимасляная кислота – это естественный метаболит клеток и тканей организмов;

- ПГА не гидролизуются в жидких средах, т.к. деградация ПГА является истинной биологической и происходит клеточным и гуморальными путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого закисления тканей и, следовательно, выраженной воспалительной реакции;

- скорости биорезорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полигликолипидов, изделия из ПГА в зависимости от формы и места имплантации *in vivo* могут функционировать от нескольких месяцев до 2-3 лет более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;

- ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует таких технологических этапов, как синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов;

- сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO₂ и H₂, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла, водосодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина [33,53];

Основные структуры полигидроксиалканоатов можно иллюстрировать следующим образом:

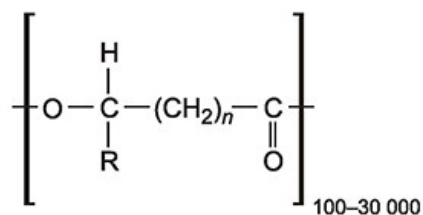


Рисунок 1 – Структура ПГА

В зависимости от числа атомов углерода, присутствующих в мономерных звеньях, ПГА могут быть классифицированы на три основных типа:

1. Короткоцепочечные ПГА, в которых есть 3-5 атомов углерода. Наиболее известные представителями этого класса - поли (3-гидроксибутират) (ПГБ), и его сополимеры с гидроксивалератом. Полигидроксибутират является гомополимером D(-)-3-β-оксимасяной кислоты и представляет собой полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами (C₄H₆O₂) [6]. Из всех ПГА, ПГБ наиболее часто встречается в природе [54]. Это самый простой ПГА по отношению к химической структуре, имеющие метилен группу (-CH₂). В состав полимера входят углерод (81%), водород (7,03%) и кислород (37,16 %). Мономеры, такие как 3-гидроксивалерат и 4-оксибутират, включают в ПГБ цепи с использованием специфических добавок в среде для роста бактерий [40,41].

2. Со средней длиной цепи ПГА, которые имеют 6-14 атомов углерода. Для синтеза средней длины цепи в качестве продуцента специально используют псевдомонад, а в качестве субстрата алифатические углеводороды, такие как n-алканы, n-алканоаты, или n-алканола. [42,43].

3. Длинноцепочечные, с содержанием 17-18 атомов углерода [44].

Такое свойство как гибкость может быть изменено путем изменения длины цепи атомов углерода [45]. Помимо числа атомов углерода, ПГА могут также быть классифицированы на основе типа мономерных звеньев. ПГА,

содержащие один тип мономерного звена, называются гомополимеры, такие как поли-(3-гидроксибутират) или ПЗГБ, поли-(3-гидроксигексаноат) и поли-(3-гидроксиоктаноат), тогда как ПГА, содержащие более чем один тип мономера устройства называются гетерополимерами такие как поли-(3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутират) [46].

Линейная структура молекул ПГА придает им свойство термопластичности и изменения прочности (возрастание по направлению растяжения). Как отмечалось ранее, полимеры данного класса обладают антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом, биоразрушаемостью и биосовместимостью[47].

В зависимости от концентрации основного источника углерода (глюкоза, масляная кислота, др.) и субстратов-предшественников (γ -бутиролактон, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол и 4-хлормасляная кислота, 4-броммасляная кислота), времени культивирования бактерий, получают полимеры с различным соотношением 3-гидроксибутирата(ЗГБ), 3-гидроксивалетрата(ЗГВ), 4-гидроксибутирата (4ГБ) и других мономеров [5,10].

1.2. Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА

Если сравнивать ПГА с другими эквивалентными коммерциализованными материалами, то пока что ПГА достаточно дорогие материалы, потому что значительная доля стоимости ПГА приходится на долю исходного сырья, основное направление исследований в настоящее время связано с поиском новых субстратов и расширением сырьевой. При этом исследуется рост и синтез ПГА как уже известными и изученными микробными штаммами с привлечением новых субстратов, так и продолжается поиск природных и конструирование новых штаммов, способных эффективно усваивать различные субстраты.

В качестве субстратов исследуются:

1. известные субстраты - смеси водорода и углекислоты, глюкоза, фруктоза, маниока, меласса, лактоза, молочная сыворотка, метанол, тапиока [24,25];
2. новые субстраты - углеводородные кислоты (пентановая, олеиновая, октановая, нонановая) и октан, глюконат, белковые гидролизаты (пептона, казеина), ксилоза, гидролизаты гемицеллюлоз, смеси жирных кислот животного и растительного происхождения, отходы производства оливкового и пальмового масла, а также [26];
3. необычные субстраты - метакриловая кислота, триглицериды, масляная кислота и жидкие продукты переработки углей [27].

В настоящее время потенциальными источниками углерода для получения ПГА считаются растительные масла, такие как оливковое, кукурузное, соевое, рапсовое, пальмовое, подсолнечное. Растительные масла по сравнению с другими общепринятыми источниками углерода, такими как сахара, имеют преимущество, заключающееся в более низкой стоимости, что немало важно [23]. Кроме того, растительные масла обеспечивали более высокие урожаи как биомассы 0,6-0,8г ПГА/г используемого масла, что в 2 раза выше, чем у сахаров (0,35 г ПГА/г используемого сахара). Еще одними кандидатами на роль дешевых ростовых субстратов являются жирные кислоты, а именно олеиновая кислота. Жирные кислоты дешевый продукт, но при этом выход полимера составлял примерно столько же, как и если бы мы в качестве источника углерода использовали масла (0,88г ПГА/г используемой кислоты). Такие сахара как глюкоза и фруктоза, чаще всего используются для получения ПГА, но вся проблема в том, что их надо много и они являются довольно дорогими, проще говоря, используя сахара, производство ПГА не станет на промышленное производство[27].

1.3. Синтез мономера 4ГБ

Для синтеза мономера 4ГБ в качестве предшественника в составе питательной среды используют: 4-гидроксимасляную кислоту, 1,4-бутандиол [8], γ -бутиролактон [13], 1,6-гександиол [2], 4-хлормасляная кислота [2], 4-броммасляная кислота применение которых в качестве оптимального субстрата определяется видом микроорганизма и его штаммовой спецификой. Повышение концентрации источников 4-гидроксимасляной кислоты приводит к увеличению содержания 4-гидроксибутирата в сополимере, но ингибирует рост и накопление сополимера. Увеличением концентрации γ -бутиролактона с 5 г/л до 20 г/л, увеличивает содержание 4ГБ с 22 мол.% до 60 мол.%, но при этом биомасса и содержание полимера падает в 1,5-3 раза.

Выделенный продуктивный штамм *Cupriavidus eutrophus* B10646, способный устойчиво синтезировать с высокими (70-90%) выходами технологичные гетерополимерные ПГА, дал обширные возможности для получения помимо 3-гидроксибутирата и другие мономеры (3-гидроксивалерат, 3-гидроксигексаноат, 4-гидроксибутират), имеющие степень кристалличности не выше 50%. Штамм растет на различных субстратах, включая смеси углекислоты с кислородом и водородом различного происхождения, сахарах (фруктоза, глюкоза) и спектрах органических кислот (ацетат, бутират, а также валерат, гексаноат, γ -бутиролактон и др.). Он имеет более широкие границы физиологического действия по отношению к перечисленным субстратам, являющихся предшественниками мономеров (4-гидроксибутирата, 3-гидроксивалерата, 3-гидроксигексаноата) и усиливающих образование гетерополимерных ПГА (Жила и др., 2014). Но важно заметить, что в качестве продуцентов мономера 4ГБ используют и другие штаммы бактерий, например *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 [7], *Escherichia coli* K12 [18], *Pseudomonas putida* KT2442 [20], *Bacillus cereus* FB11 [19] и многие другие.

Для анализа были взяты работы следующих авторов: S.V. Vigneswari [21], J. Cavalheiro [5] и H.L.Chai [2]. В каждой из данных работ в качестве продуцентов полимера выступали микроорганизмы рода *Cupriavidus*, в качестве

основного источника углерода была использована глюкоза в концентрации 10 г/л. Отличие работ в том, что были применены различные прекурсоры: 1,6-гександиол, γ -бутиролактон 1,4-бутандиол, соответственно, по результатам вышеописанных экспериментов было видно, что максимальный выход полимера 10,8 г/л получил J. Cavalheiro [5], используя γ -бутиролактон, что в свою очередь в 1,5 раза больше, чем получали на 1,4-бутандиоле, и в 5 раз выше чем на 1,6-гександиоле, однако максимальное содержание 4ГБ около 51 мол.% получили на 1,6-гександиоле, если сравнивать эти прекурсоры с 4-хлормасляной кислотой, которая добавлялась как субстрат-предшественник в дополнение к глюкозе, то на 4-хлормасляной кислоте удалось получить содержания 4ГБ только 2,8 мол. %, что в 25 раз меньше чем на 1,6-гександиоле.

Максимальное содержание мономера 4ГБ, равное 94 мол. %, в полимере, удалось получить W.C. Hsieh [13]. Он использовал штамм *D. acidovorans* IFO13582 с субстратом-предшественником: 1,4-бутандиол, концентрацией 10 г/л, а также установил, что оптимальными условиями для получения мономера 4ГБ является pH равное 7,0 и максимальное содержание 4ГБ достигается на 72 час культивирования.

Использование в качестве продуцента мономера 4ГБ штамма *C. eutrophus* B10646, обладающего повышенной предрасположенностью к γ -бутиролактону, в качестве углеродного субстрата в концентрации 10 г/л позволило увеличить содержание 4ГБ в сополимере до 24,3 %.

На *C.necator* было использовано несколько источников углерода (1,4-бутандиол; γ -бутиролактон, 1-пентанол). А также добавлялась олеиновая кислота для увеличения роста биомассы. Добавки 1,4-бутандиола и 1-пентанола увеличили содержания 4ГБ в полимере. Массовая доля мономеров 3ГБ и 4ГБ была в пределах от 2–41 мол.% и 5-31 мол.% соответственно. Большая концентрация полимера присутствовала при выращивании на олеиновой кислоте (3,3 г/л). Большое количество ацетила-СоА было сохранено, потому что олеиновая кислота предоставила предшественникам для синтеза жирных кислот

C_{2n} в метаболическом пути бактерий. Поэтому, это усиливало биосинтез П(3ГБ) из-за присутствия большего количества ацетила-СоА и/или NADPH [22]. Хотя олеиновая кислота действовала как предшественник для синтеза ацетила-СоА, это также имело значительный эффект на цикл трикарбоновых кислот, который увеличил биомассу клетки. Но больший выход 4ГБ до 55 мол.% происходил при выращивании на пальмитиновой кислоте. [23]

На смесях бутирата и 4-гидроксимасляной кислоты, а также в присутствии 4-хлорбутирата, 1,4-бутандиола или γ -бутиролактона *Ralstonia eutropha*H16 аккумулировала сополимеры 3ГБ и 4-гидроксibuтирата (4ГБ). На этих субстратах, накопление ПГА составило 40 % от сухого веса клеток с содержанием 4ГБ до 37 мол.%. Использование смеси масляной, пентановой и 4-гидроксимасляной кислот привело к накоплению полимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ) с содержанием 4-ГБ до 45 мол.% и 3ГВ до 23 мол.% [55].

Добавление небольшого количества пропионата (до 2 г/л) к культуре *R.eutropha* NCIMB 11599 при росте на γ -бутиролактоне привело к увеличению доли 4ГБ в П[3ГБ/4ГБ] с 12,3 мол.% (0 г/л пропионата) до 51,8 мол.% (2 г/л пропионата), а также содержания полимера с 24,6 до 36,8 % от сухого веса клеток [16].

В работе W.H Kim [14] для увеличения фракции 4ГБ в сополимере у штамма *S. eutrophus*V10646в среду добавляли пропионат или ацетат. Добавление небольшого количества (2 г/л) этих субстратов привело к увеличению фракции 4-ГБ в полимере с 37,9 до 53,7мол.% при использовании в качестве субстрата-предшественника только γ -бутиролактона.

Использование жирных кислот (пропионовая и пентановая), а также γ -бутиролактона, в качестве индукторов для синтеза, соответственно, 3-гидроксивалерата и 4-гидроксibuтирата приводит к снижению, как биомассы, так и полимера, вследствие токсичности данного субстрата для бактерий-продуцентов. Поэтому для решения этой проблемы проводится оптимизация

режима культивирования бактерий для получения одновременно высокого содержания полимера и гидроксивалерата в нем.

При одноступенчатом культивировании *Cupriavidus* sp. и использование в качестве единственного источника углерода γ -бутиролактона с концентрацией 5,6 г/л, содержание ПГА в клетке 0,5 г/л и содержит всего 12 мол. % 4ГБ. Максимальное содержание 4ГБ, равное 31 мол. %, и выход ПГА 0,8 г/л, осуществлялась при добавке 1,4-бутандиола, концентрацией 5,6 г/л, также подобное содержание, около 30 мол.%, проходило при добавке 5 г/л γ -бутиролактона и 0,6 г/л 1-пентанола, однако при этой добавке выход ПГА был самый низкий и составил всего 0,4 г/л [56].

В своей работе J.S. Kim [14] и W.H. Lee [16] хотели показать как меняется процентное соотношение 3ГБ и 4ГБ в полимере, если постепенно изменять концентрацию основного субстрата и субстрата-предшественника, так при концентрации глюкозы 20 г/л и γ -бутиролактона 0 г/л включение 4ГБ составляло 0 мол.%, при уравнивании концентраций субстрата-предшественника и основного субстрата по 10 г/л, соотношение мономеров 3ГБ к 4ГБ было 97,5 мол.% и 2,5 мол.% соответственно, а уже при концентрации γ -бутиролактона 20г/л включение 4ГБ составило 27,4%.

1.4. Влияние условий культивирования на синтез сополимеров поли(3ГБ/4ГБ)

Для увеличения включения 4-гидроксibuтирата в полимерную цепь, а также содержание самого сополимера (поли(3ГБ/4ГБ)), были исследованы следующие параметры среды: аэрация культуры, рН культуры, концентрация инокулята, соотношение C/N в среде.

Снижение аэрации культуры (данный показатель регулировался объемом культуры в колбе) привело к увеличению содержания 4ГБ в сополимере. Так, увеличение коэффициента заполнения с 0,12 до 0,32 привело к увеличению фракции 4ГБ от 23 до 75 мол.% у бактерий *Cupriavidus* sp. USMAA1020. Выход

полимера оставался постоянным, но наблюдалось снижение биомассы с 6,23 до 2,59 г/л. Следует отметить, что максимальный урожай полимера (28 %) достигнут при коэффициенте заполнения 0,2, при этом фракция 4-гидроксибутирата составляла 43 мол.% (Vigneswari, 2009). Аналогичные результаты получены для рекомбинантной *E.coli*, которая в условиях хорошей аэрации синтезировала сополимер (поли(3ГБ/4ГБ)), вместо гомополимера 4ГБ. Кроме того, увеличение коэффициента заполнения с 0,2 до 0,4 привело к увеличению содержания полимера в 3-10 раз в зависимости от среды культивирования, однако дальнейшее увеличение до 0,6 привело к его снижению (Hein, 1997). В отличие от *Cupriavidus* sp. USMAA1020 и рекомбинантной *E.coli*, увеличение коэффициента заполнения с 0,2 до 0,6 не повлияло на содержание полимера (40-46 % от веса сухой биомассы) и рост бактерий (2,1-2,2 г/л) *Comamonas acidovorans*. Однако снижение аэрации культуры также привело к увеличению фракции 4-гидроксибутирата в сополимере (поли(3ГБ/4ГБ)) с 29 до 50 мол.% [16].

В работе S. Vigneswari [22] также показано, что нейтральная среда является наилучшей для роста бактерий и накопления полимера у *Cupriavidus* sp. USMAA1020. Снижение pH до 5,7 и повышение pH до 7,8 привело к снижению биомассы и содержанию полимера, особенно в более кислых условиях. Напротив, содержание 4ГБ в нейтральной среде не отличалось и составляло 50-54 мол.%. Только при pH 6,0 и 6,3 отмечено снижение фракции 4ГБ до 30 мол.%. Было сказано что W.C. Hsieh [13] определил оптимальный pH для получения высокого содержания 4ГБ равный 7, а если pH смещался в кислую или щелочную среду, то содержание мономера 4ГБ сразу падало, однако исследователь W.H. Lee [16] в своей работе изучал то, как влияет изменение pH на диапазоне от 5,0 до 8,5 на содержание 4ГБ и выход полимера, используя бактерий *Comamonas acidovorans* он определил, что максимальное содержание 4ГБ до 96 %, было получено при значении pH около 8,5, а содержание полимера при этом составляло около 23 %.

В работе W.H. Lee [16] было также исследовано влияние концентрации инокулята на выход полимера и содержание 4-гидроксибутирата(4ГБ) в нем. Было показано, что увеличение концентрации инокулята с 1 до 10 % приводило к сокращению периода активного роста бактерий *Comamonas acidovorans* с 28 до 8 часов. Кроме того, было показано, что культуры, с различной начальной оптической плотностью по-разному накапливают полимер и включают в него 4-гидроксибутират. Оптимальной концентрацией инокулята для накопления полимера является 3 % (объем/объем) ($OD_{600nm}=2$), содержание ПГА при этом составило около 48 %. При концентрации инокулята 1-2 % содержание полимера не превышало 20 % от веса сухой биомассы. С увеличением концентрации инокулята происходило снижение содержания полимера до 30 %. Напротив, с увеличением концентрации инокулята отмечено увеличение содержания фракции 4- гидроксибутирата с 10 до 84 мол.%. Таким образом, физиологическое состояние клеток на первой стадии (условия для роста клеток) определяет содержание и состав сополимера (поли(3ГБ/4ГБ)), синтезируемого на второй стадии(фаза синтеза полимера).

Изучено влияние соотношения C/N на содержание 4ГБ в полимере у *C. necator* А-04. Показано, что снижение данного соотношения привело к увеличению доли 4ГБ в сополимере. Самое высокое содержание 4ГБ 70 и 94 мол.% было получено при соотношении C/N равное 4 на среде, содержащей, соответственно, 4-гидроксимасляную кислоту и масляную кислоту при соотношении 95:5 и 1,4-бутандиол. Снижение соотношения C/N в среде с 80 до 20 также привело к более высокому содержанию фракции 4-гидроксибутирата с 16 до 31 мол.% у *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. Напротив, снижение соотношения C/N с 40 до 10 привело к снижению 4ГБ с 14 до 6 мол. %[51]. Максимальный урожай полимера до 56 % с содержанием фракции 4ГБ около 8 мол.% был получен при соотношении C/N равное 20 при росте на бутиролактоне [56].

1.5. Биохимические пути синтеза ПГА

β -окисление является основным путем для биосинтеза субстратов среднецепочечных ПГА, когда бактерии растут на жирных кислотах в качестве субстрата [49]. Катаболизм жирных кислот является одним из самых распространенных путей, поставляющий гидроксиалканоаты (ГА), которые являются исходными мономерами при ПГА-синтезе [50]. Промежуточные продукты образованные при внутриклеточном метаболизме алкановых или жирных кислот через β -окисление способны обеспечить гидроксиалканоил-КоА (ГА-КоА), являющийся субстратом для среднецепочечных ПГА. Данный путь был обнаружен у нескольких бактерий, таких как *Pseudomonas oleovorans* и *Pseudomonas fragii*, которые синтезируют среднецепочечные ПГА из алкановых и жирных кислот. У таких бактерий мономерный состав синтезированного ПГА непосредственно связан с субстратом.

Существует два основных типа углеродных субстратов, потребление которых приводит к образованию среднецепочечных ПГА: субстраты, структурно связанные с мономерами и субстраты, не имеющие отношения к структуре мономеров. Обычно о продукции среднецепочечных ПГА, структурно связанных с мономерами, говорят в том случае, когда мономерный состав полимера подобен составу субстрата. Субстраты, структурно связанные с мономерами ПГА, являются субстратами (обычно жирные кислоты), использование которых приводит к синтезу среднецепочечных ПГА с очень сходными (*R*)-3-гидрокси кислотами, но с той же самой длиной С-цепи или с более короткой углеродной цепью [49]. Например, при использовании нонановой кислоты получены среднецепочечные ПГА, содержащие около 60 мол % (*R*)-3-гидроксинонаноата и около 40 мол % (*R*)-3-гидроксигептаноата [50].

Таким образом, использование жирных кислот с четным числом атомов углерода приводит только к синтезу (*R*)-3-гидроксиалканоатов с четным количеством атомов углерода, тогда как в результате потребления жирных

кислот с нечетным числом атомов углерода синтезируются только (R)-3-гидроксиалканоаты с нечетным количеством атомов углерода.

Промежуточные продукты β -окисления жирных кислот включают такие соединения как, еноил-КоА, 3-кетоацил-КоА и (S)-3-гидроксиацил-КоА, которые в свою очередь могут служить предшественниками (R)-3-гидроксиацил-КоА, соединения непосредственно участвующего в синтезе среднецепочечных ПГА (рис.2). Поэтому возможен синтез ПГА в клетках *E.coli*, которые не способны аккумулировать данный полимер, включением гена ПГА-синтазы[40,50].

Метаболические пути биосинтеза среднецепочечных ПГА на примере бактерий показаны на рисунке 2

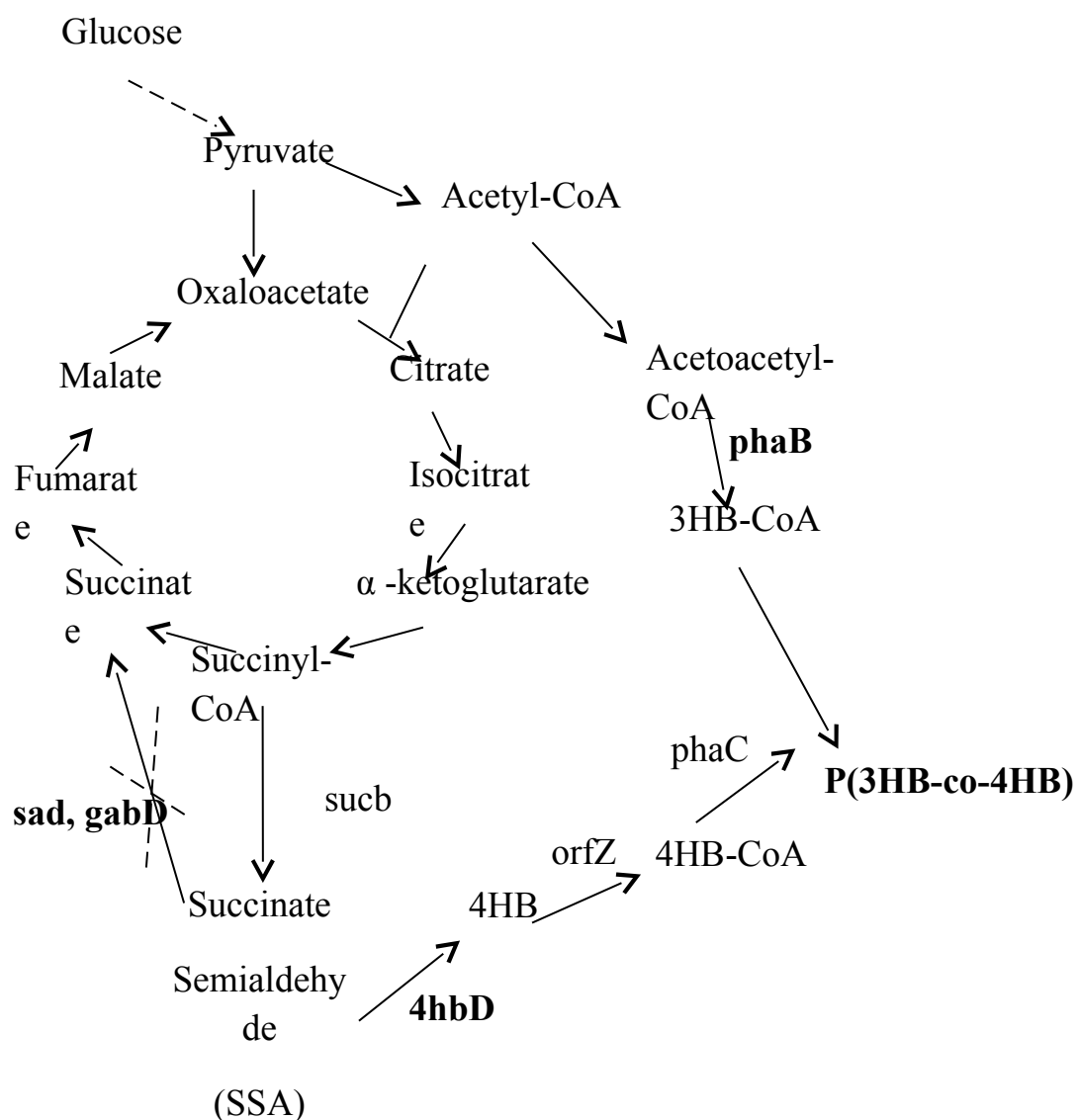


Рисунок 2 – Метаболический путь биосинтеза сополимера П[3ГБ/4ГБ]

Специальные ПГА, состоящие из 4-гидроксиалканоата, 5-гидроксиалканоата или 6-гидроксиалканоата, могут быть синтезированы различными бактериями при наличии соответствующих предшественников. 1 - ацил-СоАсинтетаза, 2 - ацил-СоАдегидрогеназа, 3 - еноил-СоАгидратаза, 4 - NAD-зависимая (S)-3-гидроксиацил-СоАдегидрогеназа, 5 - 3-кетואцил-СоФ тиолаза, 6 - (R)-специфическая еноил-СоАгидратаза, 7 - NADPH-зависимая 3-кетואцил-СоА редуктаза, 8 - 3-гидроксиацил-СоАэпимераза, 9 - сщп-ПГА полимераза, 10 - ацетил-СоА карбоксилаза, 11 - малонил-СоА-ацилпереносящий белок трансацилаза, 12 - 3-кето-ацилпереносящий белок

синтаза, 13 - 3-кето-ацилпереносящий белок редуктаза, 14 - 3-гидроксиацил-ацилпереносящий белок дегидратаза, 15 - еноил-ацилпереносящий белок редуктаза, 16 - ацил-ацилпереносящий белок тиолаза, 17 - (R)-3-гидроксиацил-СоА-ацилпереносящий белок трансацилаза, 18 - сщп-ПГА полимераза.

2. Материалы и методы

2.1. Объект исследования

Штамм *Cupriavidus eutrophus* депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ), коллекционный номер ВКПМ В10646.

Культурально-морфологические особенности штамма: грамтрицателен, клетки-палочки (молодые - короткие, в стационарной фазе - разной длины, размеры 0,3-0,5×1,2-2,0 мк), подвижные (молодые - монотрихи, с возрастом - перетрихи). Слабо подвижен. Оптимум роста 30-31°C, рН 6,7-7,2.

Ростовые характеристики: штамм растет на минеральной среде с сахарами или органическими кислотами, а также в атмосфере водорода, двуокиси углерода и кислорода, специфических факторов роста и органических добавок не требуется. Границы физиологического действия рН в диапазоне 4.4-8.6, штамм сохраняет способность к росту в диапазоне температур 20-41°C. Стабильно сохраняет свои характеристики при варьировании условий культивирования и сред (замена источника углерода и энергии, низкие или высокие значения активной реакции среды), повышение температуры до 35°C, использование в качестве ростового токсического субстрата - 4-бутиролактон и соли монокарбоновых кислот. На полной питательной среде удельная скорость роста - до 0,45 1/ч, продуктивность - до 2 г/л час.

2.2. Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5-1,0 л, заполненных культурой на 50-60% объема на термостатируемой качалке при температуре 30°C. Для выращивания бактерий за основу была принята солевая

среда Шлегеля следующего состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; NH_4Cl – 0,2-1,0 (г/л). Микроэлементы вводили по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 1,5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 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; NiCl_2 – 0,008 (г/л).

При гетеротрофном культивировании для штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646 ростовым субстратом, была глюкоза (10 г/л) или масляная кислота (2 г/л), в качестве индукторов для образования мономеров 4- гидроксимасляной кислоты использовали 4-броммасляную кислоту, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол и в концентрациях (1 г/л).

Культивировали на среде Шлегеля с уменьшенной на 60% от потребности бактерий концентрацией азота в режиме накопления полимера (NH_4Cl – 0,4 г/л).

Периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на фотоколориметре КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм).

Биомассу бактерий в культуре определяли весовым способом. Для этого аликвоты бактериальной суспензии объемом 20 мл, центрифугировали 10 мин при 10000g. Затем трижды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение суток, доводили до постоянной температуры в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

Контроль чистоты бактериальной культуры осуществляли высевом проб на пептонный агар (20г агара, 10г пептона, 5г 2,5% NaCl на 1 л воды из крана). Разведения проводились стандартным методом. Посевы производили из разведений 10^7 ; культивировали в термостате при температуре 33°C.

2.2.1. Расчет кинетических параметров роста культуры

Удельную скорость роста культуры (μ , ч⁻¹) определяли по формуле:

$$\mu = \ln \left[\frac{x_k}{x_n} \right] / \Delta t, \quad (2.1)$$

где:

x_n , - начальная концентрация бактерий, г/л;

x_k —конечная концентрация бактерий, г/л;

t – время культивирования, ч.

Экономический коэффициент культуры субстрату Y , г/г рассчитывали по формуле [48]:

$$Y = \frac{x_k - x_n}{C_k - C_n}, \quad (2.2)$$

где:

x_n , - начальная концентрация бактерий, г/л;

x_k —конечная концентрация бактерий, г/л;

C_k —конечное содержание используемого субстрата, г/л;

C_n – начальное содержание используемого субстрата, г/л.

Константу насыщения, как параметр роста культуры, определяли графически, методом обратных величин Лайнуивера-Бэрка, путем построения графика зависимости обратных величин μ , ч⁻¹ и C , г/л. Далее с помощью программного пакета Microsoft Excel определяли уравнение полученного графика, соответствующего вида $y = a \times x + b$. Для расчета субстратной константы (K_m) использовали следующую формулу [48]:

$$Km = \frac{a}{b} \quad (2.3)$$

Константу ингибирования определяли так же графически, методом обратных величин Лайнуивера-Бэрка, путем построения графика зависимости обратных величин μ , ч⁻¹ и C , г/л:

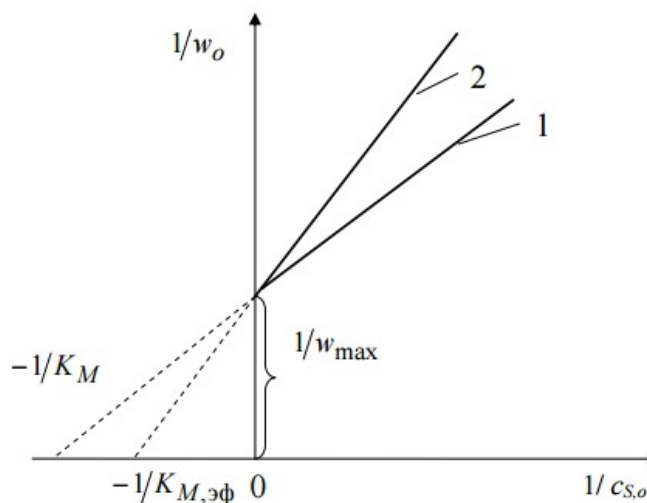


Рисунок 3 – Определение константы ингибирования методом обратных величин Лайнуивера-Бэрка

Константу ингибирования находим из уравнения, так как отношение тангенсов углов наклона прямых в точке пересечения с осью ординат равно:

$$\left(1 + \frac{c_{I,0}}{K_I}\right) \quad (2.4)$$

2.2.2. Контроль химических параметров процесса культивирования бактерий

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого супернатант разводили в 100 раз, затем 1мл пробы наливали в пробирку и добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 100 мл 95%-ного этилового спирта) и 3 мл 30% раствора соляной кислоты. В качестве контроля использовали раствор следующего состава: 1 мл

дистиллированной воды, 1 мл спиртового раствора ризорцина и 3 мл 30% раствора соляной кислоты. Пробирки с контролем и пробой помещали в водяную баню ($t=80^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. По истечении этого времени контроль и пробу охлаждали до комнатной температуры. Концентрацию фруктозы измеряли на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 540 нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику.

2.2.3. Определение содержания и состава полимера

Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца на хромато-масс-спектрометре Agilent7890A (AgilentTechnologies, USA). Метанолиз проб полимера проводили следующим образом: к навеске сухой биомассы (19-21 мг) добавляли 3 мл внутреннего стандарта (разведение 0,5 мг бензойной кислоты на 1 мл хлороформа), 2,55 мл метанола и 0,45 мл концентрированной серной кислоты и кипятили с обратными холодильниками в течение 5 часов. По окончании метанолизав колбу добавляли 3 мл дистиллированной воды. При этом происходило разделение жидкостей. Нижний хлороформенный слой использовали для анализа в хроматографии.

2.2.4. Определение физических свойств поли(ЗГБ/4ГБ)

Рентгеноструктурный анализ (определение степени кристалличности) образцов ПГА выполнены на рентгеноспектрометре D8 Advance («Bruker», Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Для этого сняты спектры в пошаговом режиме («scan-step») с шагом $0,04^{\circ}$ и 2-секундной выдержкой для измерения интенсивности в точке (режим работы прибора - 40 кВ x 40 мкА). Для определения кристалличности были приготовлены пленочные образцы из 1,5 % раствора сополимерных ПГА.

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

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов AgilentPS-HEasiVial. Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность (ПД), растворяя образцы сополимерных ПГА навеской 10-12 мг в 2 мл хлороформа с дальнейшей их фильтрацией.

Значение средней молекулярной массы сополимеров находили:

$$M_n = \sum(N_i \times M_i / N), \quad (2.5)$$

где N_i — количество молекул массы I ; N — общее количество молекул; M_i — масса молекул длины I .

Вес средней молярной массы сополимера определяли:

$$M_w = \sum(w_i \times M_i), \quad (2.6)$$

где w_i — доля массы ($w_i = N_i M_i / \sum (N_i \times M_i)$).

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, вычисляли из соотношения:

$$\text{ПД} = M_w / M_n \quad (2.7)$$

2.3. Статистическая обработка данных

Материал обрабатывали статистически по методу Лакина Г.Ф. с использованием программного пакета MicrosoftWord 2010 и MicrosoftExcel 2007 для Windows.

3. Результаты и обсуждения исследования

3.1. Определения констант насыщения и ингибирования для глюкозы и масляной кислоты

Для определения констант насыщения и ингибирования были взяты два основных источника углерода, это глюкоза и масляная кислота в разных концентрациях рассчитаны скорости роста микроорганизмов.

Были рассчитаны скорости роста по формуле 2.1 для каждой концентрации, как видно из таблицы 1 максимальная скорость роста бактерий на глюкозе равна 0,51 ч⁻¹ при концентрации 35-40 г/л.

Таблица 1 – Изменение скорости роста от концентрации субстрата

Концентрация глюкозы, г/л	Скорость роста, ч ⁻¹
0,5	0,33
1	0,35
3	0,40
5	0,45
10	0,47
20	0,48
30	0,51
40	0,46
50	0,43
60	0,48
70	0,38
80	0,34

Константа насыщения рассчитывалась графически (рисунок 4) и была равна 0,125 г/л из уравнения 2.3, из уравнения 2.4, можно рассчитать и константу ингибирования, которая для глюкозы составляет 38,5 г/л. Для

масляной кислоты была аналогичным образом рассчитана константа насыщения и ингибирования.

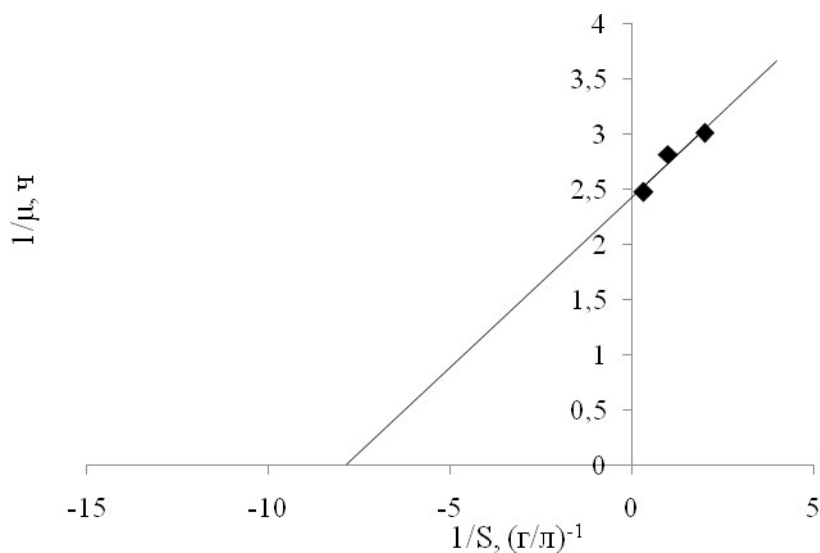


Рисунок 4 – Обратная зависимость скорости роста от концентрации глюкозы

В случае с масляной кислотой в таблице 2 максимальная скорость роста была равна $0,31 \text{ ч}^{-1}$ при концентрации 1 г/л , как видно из графика на рисунке 5 константа насыщения равна $0,85 \text{ г/л}$, а из уравнения 2.4, можно рассчитать константу ингибирования, которая уже для масляной кислоты составляет $1,25 \text{ г/л}$.

Таблица 2 – Изменение скорости роста от концентрации субстрата

Концентрация масляной кислоты, г/л	Скорость роста, ч^{-1}
0,1	0,06
0,2	0,10
0,3	0,13
0,5	0,29
0,7	0,29
1,0	0,30
1,5	0,22
2,0	0,09

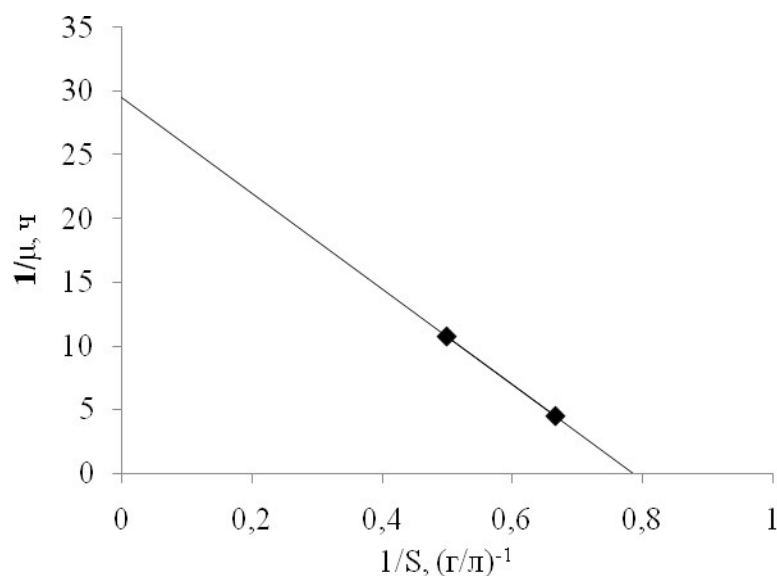


Рисунок 5 – Обратная зависимость скорости роста от концентрации масляной кислоты

3.2. Определение наиболее активно действующего прекурсора

Выращивание бактерий происходило с использованием масляной кислоты с добавками 1,4-бутандиола, 1,6-гександиола и 4-броммасляной кислоты в концентрациях 1г/л. Накопление биомассы на всех трех прекурсорах составило около 5 г/л, однако стоит заметить, что процентное содержание 4ГБ было в три раза выше на 4-броммасляной кислоте (2,0 мол.%) по сравнению с 1,6-гександиолом (0,8 мол.%) и 1,4-бутандиолом (0,6 мол.%) (рисунок 6). Содержание полимера было примерно одинаковым (50 %) на всех трех прекурсорах.

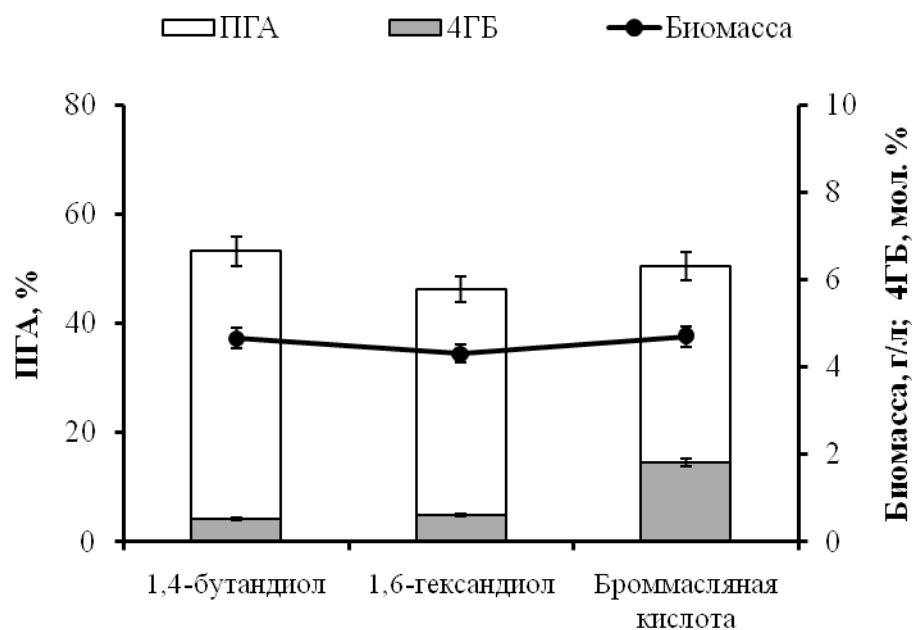


Рисунок 6 – Выход биомассы, содержание полимера и 4ГБ на 48 час культивирования на масляной кислоте с разными прекурсорами

Как видно из рисунка 7, аналогичная ситуация наблюдается и с глюкозой, то есть максимальное содержание 4ГБ в 1 мол.% было достигнуто тоже на 4-броммасляной кислоте, что в 2 раза выше чем на 1.6-гександиоле и в 5 раз выше чем на 1,4-бутандиоле, тогда как другие показатели, а именно биомасса и содержание полимера были равны.

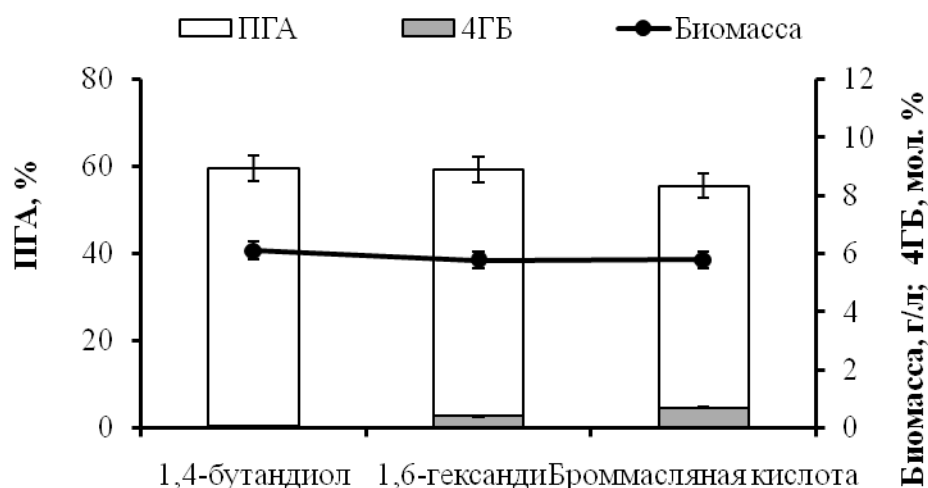


Рисунок 7 – Выход биомассы, содержание полимера и 4ГБ на 48 час культивирования на глюкозе с разными прекурсорами

Таблица 3 – Показатели биомассы, полимера и содержания 4ГБ, полученные на масляной кислоте и глюкозе с использованием 4-броммасляной кислоты

Среда	Биомасса, г/л	4ГБ, мол.%
Масляная кислота и 4-броммасляная кислота	6,2	2,0
Глюкоза и 4-броммасляная кислота	8,2	1,0

Можно сделать вывод, что из трех субстратов-предшественников именно 4-броммасляная кислота является наиболее активно влияющей на выход биомассы, содержание полимера, и процентное содержание мономера 4ГБ в полимере, однако как видно из таблицы 3, на масляной кислоте включение 4ГБ в 2 раза больше, чем на глюкозе. Опираясь на это для 4-броммасляной кислоты на масляной кислоте была рассчитана константа ингибирования, так как этот субстрат-предшественник является ингибитором, для этого были рассчитаны скорости роста *C. eutrophus* B10646 на разных концентрациях прекурсора, как видно из таблицы 4, максимальная скорость роста была 0,48 ч⁻¹ при концентрации 4-броммасляной кислоты 0 г/л, а константа ингибирования соответственно равна 2,5 г/л.

Таблица 4 – Изменение скорости роста от концентрации 4-броммасляной кислоты

Концентрация, г/л	Скорость роста, ч ⁻¹
0,0	0,48
0,5	0,45
1,0	0,39
2,0	0,36
3,0	0,21
5,0	0,08

3.3. Выращивание бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 на среде, содержащей в качестве субстрата масляную кислоту

Исследован рост и накопление поли(3ГБ/4ГБ) на среде содержащей масляную кислоту. Культивирование проводилось в течение 84 часов. На 72 час, то есть на 48 час после добавки было максимальное содержание полимера, 4ГБ (2 мол.%). К концу эксперимента биомассы составило 5 г/л (на 72 час – 6 г/л), содержание полимера составило 84%, в перерасчете 4.1 г/л полимера (на 72 час – 4.8 г/л), включение 4ГБ началось сразу после добавления 4-броммасляной кислоты (1,0 г/л) на 24 сутки и составляло (0,2 мол.%) (рисунок 8).

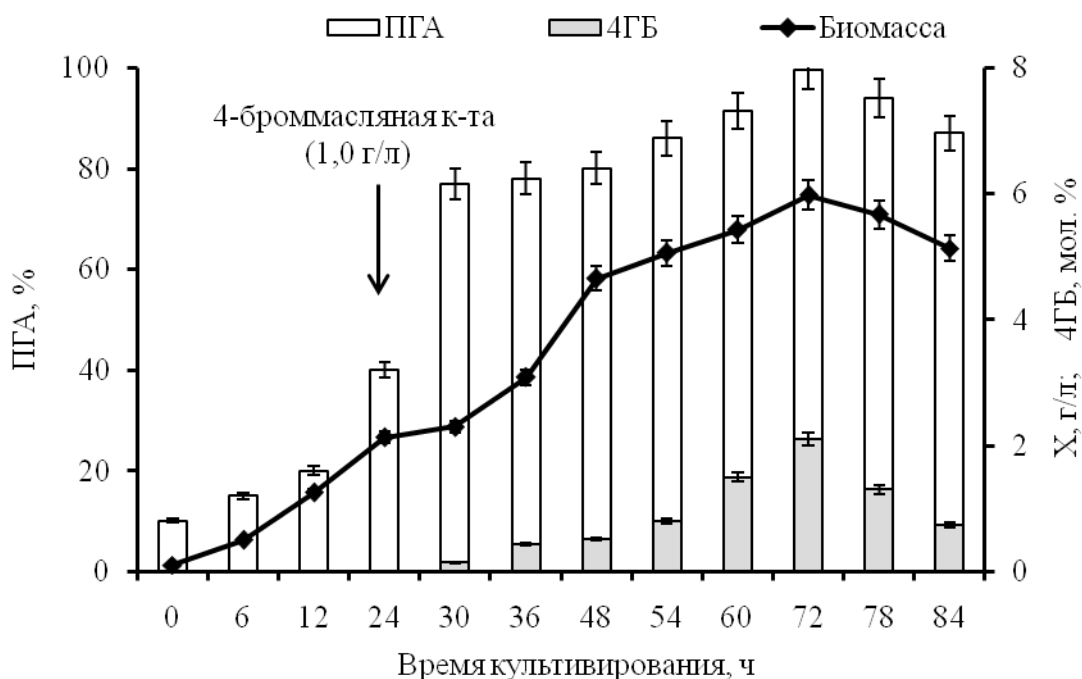


Рисунок 8 – Накопление биомассы, полимера и 4ГБ штаммами *C.eutrophus* на масляной кислоте

3.4. Выращивание бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 на среде, содержащей в качестве субстрата глюкозу

Также был и исследован рост и накопление поли(3ГБ/4ГБ) на среде содержащей в качестве основного субстрата глюкозу (рисунок 9).

Культивирование проводилось также в течение 84 часов. Максимальное процентное содержание 4ГБ в 2 мол.% наблюдалось также на 72 час, также как и биомасса (6 г/л) и содержание полимера (90 %). Как и предполагалось, масляная кислота дает показатели включения 4ГБ примерно в 1,5 раза выше, это значит, что в дальнейшем будет свойственно использовать как субстрат только масляную кислоту в концентрации 2 г/л и время культивирования брать в 72, то есть на 48 час после добавки субстрата-предшественника.

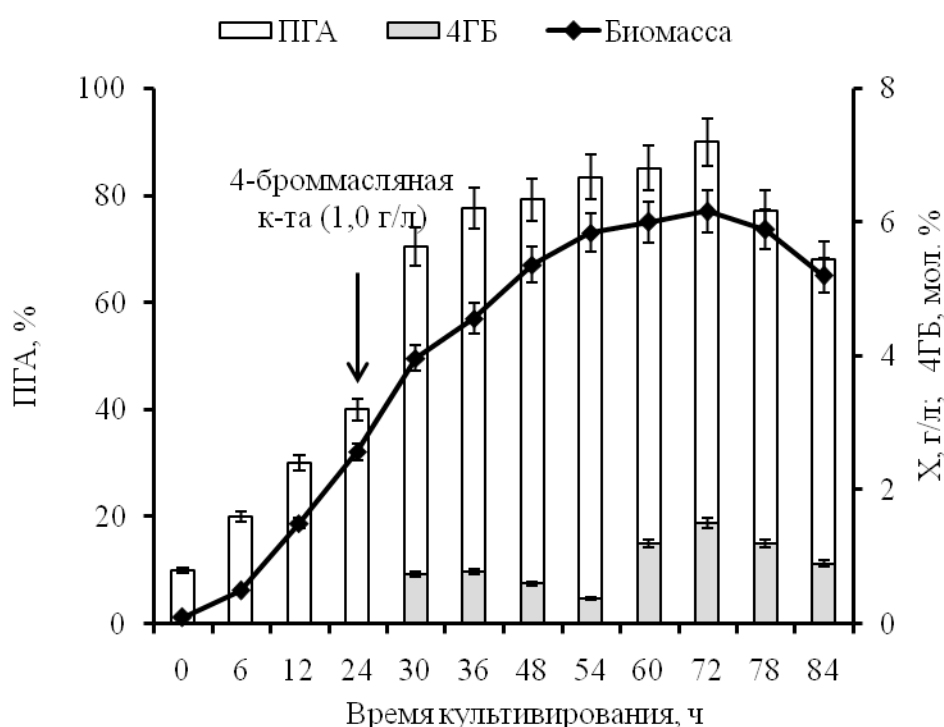


Рисунок 9– Накопление биомассы, полимера и 4ГБ штаммами *C.eutrophus* на глюкозе

3.5. Выращивание бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 при разных концентрациях 4-броммасляной кислоты

Для определения оптимальной концентрации субстрата-предшественника для синтеза 4-гидроксибутирата, были взяты разные концентрации 4-броммасляной кислоты: 0,5 г/л; 1 г/л; 1,5 г/л; 2 г/л; Культивирование

проводилось в течение 96 часов после первой добавки, а прекурсор вносили в среду каждые 24 часа. Необходимо отметить, что в составе ПГА были зафиксированы регулярные включения 4 – гидроксibuтирата начиная с 24 часов после добавки во всех концентрациях, максимальное включение происходило на 48 час после первой добавки прекурсора (4-броммасляной кислоты) при этом максимальное содержание 4ГБ наблюдалось при добавлении прекурсора в концентрации 2 г/л (12,7 мол.%), что в 4 раза больше, чем включение 4ГБ при концентрации 4-броммасляной кислоты 1,5 г/л, при этом выход биомассы в контроле к концу культивирования составил 6,5 г/л, при концентрации 4-броммасляной кислоты 0,5 г/л – 6 г/л, а при концентрациях 1,5 г/л и 2 г/л – результаты и составили по 4, 8 г/л. Делаем вывод, что в данных концентрациях 4-броммасляная кислота не ингибировала рост бактерий.

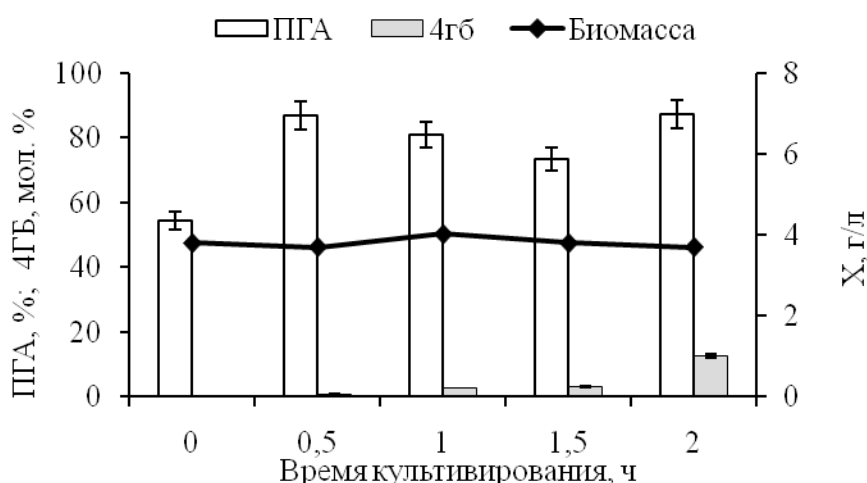


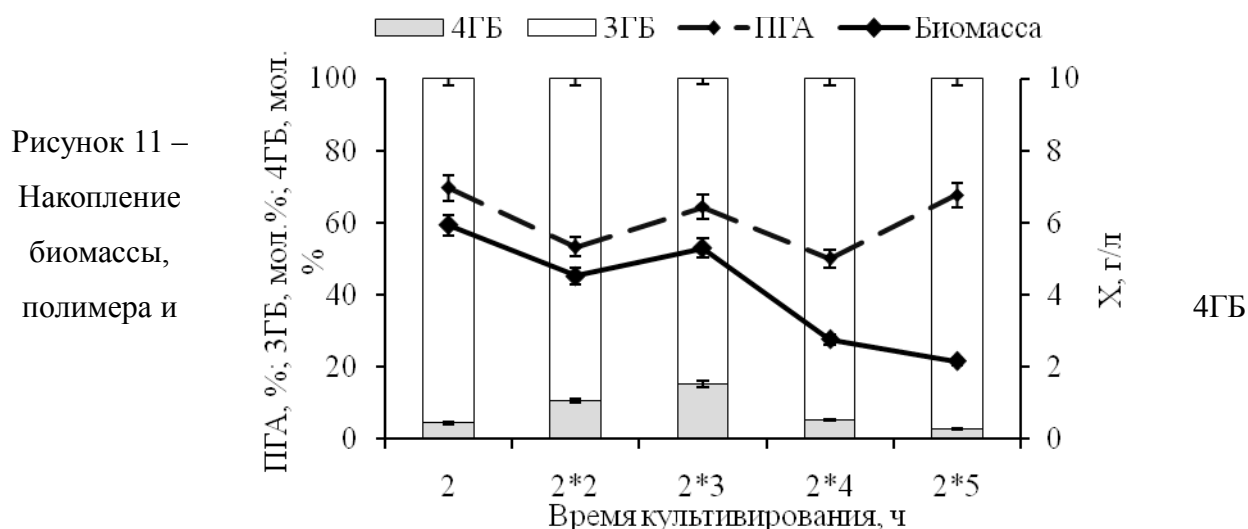
Рисунок 10– Накопление биомассы, полимера и 4ГБ штаммами *C.eutrophus* на масляной кислоте с 4-броммасляной кислотой в разных концентрациях на 48 час

Из графика (рисунок 10) видно, что увеличением концентрации 4-броммасляной кислоты доля 4-гидроксibuтирата в полимере возрастает с 0,626 до 12,708 мол.%, при этом содержание полимера также как и биомасса практически не коррелирует с концентрацией прекурсора и держится на уровне 60-80% и 3,7-4,1 г/л соответственно.

3.6. Дробные добавки 4-броммасляной кислоты

Для максимального процентного содержания 4-гидроксибутирата в полимере, 4-броммасляная кислота добавлялась дробными добавками в концентрациях 2 г/л единожды, дважды, трижды и так далее через 24 часа. Как видно из графиков на рисунке 11, максимальное содержание 4ГБ (15,3 мол.%) было при трехкратном добавлении 4-броммасляной кислоты, минимальные значения 4,4 и 2,9 мол.% были при однократном добавлении и пятикратном добавлении прекурсора, так же видна закономерность, что биомасса клеток имела зависимость от количества добавок, то есть разовой подаче прекурсора (6 г/л), при пятиразовой соответственно 2,2 г/л, можно сделать вывод о том, что четырехразовая и пятиразовая подача субстрата-предшественника ингибировала рост клеток в 2 и 2,5 раза. Что касается ПГА, то количество добавок не влияло на содержание полимера в клетке, так в образце, где единожды добавлялась 4-броммасляная кислота полимера в клетке 70%, трижды – 68% и при пятикратной добавке тоже порядка 70%.

Подводя итог, можно сказать, что трехкратная добавка 4-броммасляной кислоты в концентрации 2 г/л является оптимальной, так как содержание 4ГБ и содержание полимера было максимальным.



штаммами *C.eutrophus* на масляной кислоте в разных количествах добавок 4-броммасляной кислотой

3.7. Свойства сополимеров 3-и 4-гидроксимасляной кислоты

В результате выполненных экспериментов получены образцы сополимера (поли(3ГБ/4ГБ)) с различным содержанием фракции 4ГБ в нём и изучены их физические свойства.

С использованием гельпроникающей хроматографии исследована молекулярная масса серии синтезированных образцов сополимеров поли(3ГБ/4ГБ) (табл. 4). В исследованном диапазоне включение 4ГБ варьировало от 2,9 до 15,3 мол.% и было обнаружено, что с увеличением процентного содержания 4ГБ полидисперсность сополимера росла от 2,78 до 3,9, а величина M_w у серии образцов изменялась в диапазоне 547 – 759 кДа без четкой связи с содержанием 4ГБ. Это подтверждает ранее полученные результаты об отсутствии связи между составом ПГА и молекулярной массой [52].

Влияние соотношения 3ГБ и 4ГБ в сополимере на температурные свойства сополимера предоставлены в таблице 3, из которого следует, что температура плавления полученных образцов сополимера поли(3ГБ/4ГБ) составляла 167 – 169°C. Показано отсутствие зависимости между содержанием 4ГБ в диапазоне 2,91 до 15,226 мол.% и температурой плавления, однако температура деградации падает на 20°C при содержании 4ГБ 15,226 мол.%, а при включении 4ГБ от 10 и меньше мол.% температура деградации не коррелирует.

Четко видна зависимость кристалличности от включения 4ГБ, так при содержании 4ГБ 2,91 мол.%, кристалличность составляла 61%, при 5.23 мол.% - 55%, а при максимальном включении 15, 226% - 42%. Если сравнивать полученные образцы сополимера с ПЗГБ, то можно заметить, что мономер 4ГБ

уменьшает кристалличность, так без включения 4ГБ показатель кристалличности составляет 70%, а при содержании 4ГБ 15,3 мол.%, показатель 42%.

Таблица 4 – Показатели молекулярной массы, температуры плавления и деградации, кристалличность сополимеров поли(3ГБ/4ГБ), содержащих различное включение 4ГБ

Кол-во добавок	3ГБ, мол, %	4ГБ, мол, %	Мч, кДа	Мв, кДа	ПД	T _{пл} , °С	T _{дегрд} , °С	Сх, %
1	95,6	4,4	183	559	3,05	169,4	284,9	56
2	89,3	10,7	170	655	3,86	167,2	285,4	52
3	84,7	15,3	169	655	3,90	169,2	265,8	42
4	94,8	5,2	166	547	3,28	168,2	284,3	55
5	97,1	2,9	272	760	2,78	168,4	283,8	61
ПЗГБ	100,0	-	148	640	4,32	179,2	262,2	70

Если сравнивать полученные образцы сополимера с ПЗГБ, то можно заметить, что мономер 4ГБ уменьшает кристалличность, так без включения 4ГБ показатель кристалличности составляет 70%, а при содержании 4ГБ 15,3 мол.%, показатель 42%.

ВЫВОДЫ

1. Исследован рост и выход полимера у бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646 на глюкозе и масляной кислоте в сочетании с тремя прекурсорами: 4-бутандиол, 1,6-гександиол и 4-броммасляная кислота. 4-броммасляная кислота дает показатель процентного содержания мономера 4ГБ в 2-2,5 раза выше, чем 1,4-бутандиол и 1,6-гександиол, тогда как выход биомассы и содержание ПГА примерно равны. Максимальные выходы биомассы 6 г/л и сополимера (до 95 % от веса сухой биомассы) получены в условиях роста бактерий на среде с масляной кислотой и 4-броммасляной кислотой в качестве субстрата-предшественника.

2. Рассчитаны оптимальные концентрации масляной кислоты (2 г/л) и 4-броммасляной кислоты (2 г/л) для продуктивной синтеза сополимера 3ГБ/4ГБ, было рассчитано, что максимальное содержание 4ГБ 12,7 мол.% достигается на 48 час после добавки прекурсора. А также был организован и исследован дробный режим подачи 4-броммасляной кислоты в культуру. Установлено, что в таком режиме при трехкратной подачи прекурсора в концентрации 2 г/л возможно увеличение содержания 4ГБ до 15,3 мол.%.

3. Установлено, что режимом углеродного питания, заключающегося в варьировании соотношения в среде прекурсор/основной субстрат и режима дозирования 4-броммасляной кислоты в культуру, можно обеспечить условия для синтеза штаммом *Cupriavidus eutrophus* В10646 сополимера [поли(3ГБ/4ГБ)] с различным содержанием 4ГБ от 2,9 до 15,3 мол.%, которое влияет на физико-химические свойства сополимера, а так же было показано, что молекулярно-массовые характеристики не зависят от соотношения мономеров, полидисперсность имела зависимость от 2,8 до 3,9 от содержания 4ГБ, а величина значения M_w находятся в широких пределах от 547 – 759 кДа. Включение 4ГБ до 15,3 мол.% приводит к снижению степени кристалличности (до 42%), не влияя на температуру плавления.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Volova, T.G, Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., Brigham C. J., Anthony J. Sinskey, A.J., Effects of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) reserves on physiological–biochemical properties and growth of *Ralstonia eutropha*// Research in Microbiology . – 2013. – Pp. 164-171
2. Hui-Ling Chai, Rahayu Ahmad, A. R. M. Yahya, M. I. A. Majid, Microbial synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4- hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 through a two step cultivation process. – 2009.
3. Amirul Al Ashraf, S. N. Syairah, Ahmad R. M. Yahya, M. N. M. Azizan, M. I. A. Majid, Synthesis of biodegradable polyesters by Gram negative bacterium isolated from Malaysian environment. – 2008.
4. Volova, T.G., Kiselev, E.G., Shishatskaya, I.S., Zhila, N.O., Boyandin, A.N., Syrvacheva, D.A., Vinogradova, O.N., Peterson, I. V., Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646– 2010.
5. Cavalheiro João M.B.T., Rodrigo S. Raposo, M. Catarina M.D., de Almeida, M. Teresa Cesário, Chantal Sevrin, Christian Grandfils, M.M.R. da Fonseca, Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. – 2012.
6. Zhila, N.O., Volova, T.G, Nikolaeva, E.D., Syrvacheva, D.A., Microbial synthesis and characterization of poly (3-Hydroxybutyrate-co- 4-Hydroxybutyrate) copolymer. – 2011.
7. Muzaiyanah, A. R., Amirul, A. A., Studies on the microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates containing 4-Hydroxyvalerate using γ -valerolactone. – 2013.
8. Amirur, A. A., Ahmad R. M. Yahya, K. Sudesh, M. N. M. Azizan, M. I. A. Majid, Isolation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) producer from Malaysian environment using *c*-butyrolactone as carbon source. – 2009.

9. Fahima, T. M., Azira, A. A., Nursolehah Y. Norhayati, M. I. A. Majid, Amirul, A. A, Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 through two-step cultivation process. – 2011.
10. ChanprateepSuchada, Yoshio Katakura, Characterization of new isolated *Ralstoniaeutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyesterpoly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. – 2008.
11. ChanprateepSuchada, KetsuneeBuasri, AuntigaMuangwong, PhonpisitUtiswannakul, Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). – 2010.
12. Fukui Toshiaki, Suzuki Mamie, TakeharuTsuge, Satoshi Nakamura, Microbial synthesis of Poly((*R*)-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from unrelated carbon sources by engineered *Cupriavidusnecator*. –2009.
13. Hsieh Wen-Chuan, Yuki Wada, Chih-Pong Chang, Fermentation, biodegradation and tensile strength of poly(3-hydroxybutyrateco-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Delftiaacidovorans*. – 2009.
14. KimJinSeol, Lee Bong Hee, KimBeom Soo, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstoniaeutropha*. –2005.
15. LauNyok-Sean, Kumar Sudesh, Revelation of the ability of *Burkholderia sp.* USM(JCM 15050) PHA synthase to polymerize 4-hydroxybutyrate monomer. –2012.
16. Lee Wing-Hin, AzizanMohd N.M, Sudesh Kumar, Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonasacidovorans*. – 2004.
17. Li Zheng-Jun, Shi Zhen-Yu, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*. – 2010.
18. Martin David P., Williams Simon F., Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. – 2003.
19. Masood F, Chen P, Yasin T, Hasan F, Ahmad B, Hameed A. Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-12 mol % 3-hydroxyvalerate) by *Bacillus cereus*

FB11: its characterization and application as a drug carrier // J Mater Sci Mater Med. – 2013. – 24(8). – Pp. 1927-1937.

20. MengDe-Chuan, Shi Zhen-Yu, Production and characterization of poly(3-hydroxypropionate-co hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. – 2012.

21. Vigneswari S. Vijaya, M. I. A. Majid, K. Sudesh, C. S. Sipaut, M. N. M. Azizan, A. A. Amirul Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties. – 2009.

22. Волова, Т.Г. Регуляция синтеза микробного полиоксибутирата параметрами среды / Т.Г. Волова, Г.С. Калачева, Я.В. Федорова // В сб.: Микробная биоконверсия. Рига. – 1990. – С. 119-129.

23. Жила, Н.О., Волова, Т.Г., Калачева, Т.Г. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* В-10646 синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах. – 2014.

24. Волова, Т.Г. Получение и исследование физико-химических свойств микробных полиоксиалканоатов / Т.Г. Волова, С.Г. Луковенко, А.Д. Васильев // Биотехнология. – 1992. – № 1. – С. 19-22.

25. Волова, Т.Г., Миронов, П.В., Васильев, А.Д. Синтез и исследование многокомпонентных полигидроксиалканоатов. – 2006.

26. Волова, Т.Г., Шишацкая, Е.И., Жила, Н.О., Киселев, Е.Г., Миронов, П.В., Васильев, А.Д., Петерсон, И.В., Сински, Э.Д. Фундаментальные основы производства и применения биodeградируемых полигидроксиалканоатов. – 2012.

27. Киселев, Е.Г., Шишацкий, О.Н., Сински, Э.Дж. Технико-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов. – 2012 г.

28. Киселев, Е.Г., Демиденко, А.В. Сравнительное исследование методов экстракции полигидроксиалканоатов из биомассы бактерий. – 2014 г.

29. Мышкина, В.Л., Иванов, Е.А., Николаева, Д.А., Махина, Т.К., Биосинтез сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б. – 2009.

30. Шишацкая, Е.И., Волова, Т.Г. Штамм бактерий *Cupriaviduseutrophus* В10646 – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения. – 2012.
31. Шишацкая, Е.И., Волова, Т.Г. Полигидроксиалканоаты как матрикс в клеточных технологиях. – 2010. – С. 55-56
32. Волова, Т.Г. Влияние условий роста на накопление полиоксибутирата водородными бактериями / Т.Г. Волова, Г.С. Калачева, В.М. Константинова, А.П. Пузырь // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28. – С. 221-222.
33. Волова, Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Красноярск.: СО РАН. – 2002. – 267 с.
34. Волова, Т.Г. Влияние лимитирования роста на накопление полиоксибутирата у водородокисляющих бактерий / Т.Г., Волова, Я.В., Федорова, Г.С., Калачева // В кн.: Материалы Всес. конф. Лимитирование и ингибирование роста микроорганизмов. – 1989. – С. 16-24.
35. Волова, Т.Г. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие для самостоят. работы [для студентов программы подг. 020400.68 «Биология»] / Сиб. федерал. ун-т ; сост.: Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск : СФУ. – 2013. – 73 с.
36. Kim I.S., Beaudette L.A., Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T. Alterations in fatty acid composition and fluidity of cell membranes affect the accumulation of PCB congener 2,2',5,5'-tetrachlorbiphenyl by *Ralstoniaeutropha* H850 // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2002. – 77. – Pp. 793–799.
37. M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, G. Braunegg. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resources // Mater. Technol.– 2012. –Pp. 23-30.
38. Martin, D. Medical applications of poly-4- hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial / D. Martin, S. Williams // Biochem. Eng. J., 2003.
39. Васнев, В. А. Биоразлагаемые полимеры. Высокомолекулярные соединения / В. А. Васнев. – Сер. Б. М., 1997. Т. 39. № 12. С. 2073 – 2086.
40. Doi Y., Abe H. Structural effects on biodegradation of aliphatic polyesters// Macromol. Symp. 1997. -V. 118. - P. 725-731.

41. Doi Y., Kanesawa Y., Tanahashi N. et al. Biodegradation of microbial poly(hydroxyalkanoates) // Makromol. Chem. Rapid. Commun. 1989. - V.10. -P. 227-230.
42. Doi Y., Segawa A., Kawaguchi Y. et al. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus* II FEMS Microbiol. Lett. 1990. - V. 67. - P. 165-170.
43. Doi Y., Kanesawa Y., Kawaguchi Y. et al. Hydrolytic degradation of microbial polyesters in the marine environment // Polym. Degrad. Stub. 1992a. -V.36.-P.173-177.
44. Doi Y., Kawaguchi Y., Nakamura S. et al. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates //FEMS Microbiol.Rev. 1992b. - V. 1-3. - P. 103-108.
45. Doi Y., Mukai K., Kasuya K. et al. Biodegradation of biosynthetic and chemosynthetic polyhydroxyalkanoates.// In: Y.Doï and K. Fukuda K. (Eds). Biodegradable plastics and polymers. Elsevier, Amsterdam. 1994. - P. 39-51.
46. Bourne, R.B. Fractures of the patella after total knee replacement// OrthopClin North Am. -1999.-V. 2.-P.287-291.
47. Brandl H., Gross R., Lenz R. et al. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(γ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters // Adv. Biochem. Eng.Biotechnol. 1990. - V. 41. - P. 77-93.
48. Е. И. Степановских, Ю. Н. Макурин, Л. Н. Маскаева, И. М. Морозова Определение параметров кинетических уравнений: учебное пособие / . Екатеринбург: УГТУ – УПИ, 2008. 73 с.
49. Kessler, B.,Witholt, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism // Biotechnol., 2001. – V. 86. – P. 97–104.
50. Timm, A., Steinbüchel, A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads // Appl. Environ. Microbiol., 1990. – V. 56. – P. 3360–3367.
51. Rahayu, A. Production of copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) through a one-step cultivation process / A. Rahayu, Z. Zaleha, A.

R. M. Yahaya, M. I. A. Majid, A. A. Amirul // J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2008 – V. 24. – P. 2403 – 2409.

52. Волова Т.Г., Калачёва Г.С. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С. 63–69.

53. M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, G. Braunegg. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resources. Mater. Technol., 46 , 2012, pp. 23–30.

54. De Koning, G.J.M. Biosynthesis of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate: an emulsion polymerization / G.J.M. De Koning, I.A. Maxwell // Environ Polym. Degrad., 1993. – V. 1. – P. 223-226.

55. Kunioka, M. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* / M. Kunioka, Y. Kawaguchi, Y. Doi // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989a. - V. 30. - P. 569-573.

56. T. M. Fahima Azira. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through two-step cultivation process // 2011

57. Song, J. Y. Characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 and ATCC 17699 / J. Y. Song, B. S. Kim // Biotechnol. AndBiopro. Eng., 2005. – V. 10. – P. 603 – 606.