

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« 18» июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез и свойства полимеров, содержащих 4-гидроксивалерат.

Руководитель _____18.06.2018

д.б.н. Н. О. Жила

Выпускник _____18.06.2018

М. Д. Косенок

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Синтез и свойства сополимеров, содержащих 4-гидроксивалерат» содержит 29 с. и включает в себя 14 рис., 2 табл., 4 формулы, 21 источник.

СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-4-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ), γ -ВАЛЕРОЛАКТОН, *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS*, 4-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ.

Цель: исследовать влияние γ -валеролактона на рост *Cupriavidus eutrophus* В-10646, состав и свойства синтезированного полимера.

Актуальность данной работы заключается в высокоэластичных свойствах 4-гидроксивалератсодержащих сополимеров, имеющих высокую температуру стеклования.

В результате проведённых экспериментов исследована динамика накопления биомассы клеток и ПГА штаммом В-10646 в гетеротрофном режиме выращивания. Максимальное содержание 4ГВ было получено на среде с фруктозой в качестве основного ростового субстрата и γ -валеролактоном в качестве прекурсора. Исследовано влияние содержания мономеров 4-гидроксивалерата в сополимере на физико-химические свойства и установлено, что при увеличении содержания 4ГВ уменьшается температура плавления и молекулярная масса полимера.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
1. Обзор литературы	5
1.1. Культивирование микроорганизмов, синтезирующих полигидроксиалканоаты	5
1.2. Синтез полигидроксиалканоатов	5
1.3. Основные виды полигидроксиалканоатов	6
1.4. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов	8
1.5. Влияние различных источников углерода на синтез ПГА, содержащих 4ГВ	10
2. Материалы и методы	13
2.1. Бактериальный штамм, среда и условия роста	13
2.2. Измерение параметров культивирования	13
2.3. Измерение содержания полимера	14
2.4. Измерение молекулярной массы	14
2.5. Измерение краевого угла смачивания	15
2.6. Измерение температуры плавления	15
3. Результаты и обсуждения	Ошибка! Закладка не определена.
3.1. Синтез сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) в присутствии γ -валеролактона, который добавлялся в начале культивирования	Ошибка! Закладка не определена.
3.2. Синтез сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) в присутствии γ -валеролактона, который добавлялся на 24 час.	Ошибка! Закладка не определена.
3.3. Синтез сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) в присутствии γ -валеролактона, поступающего по частям с 24 часа выращивания	Ошибка! Закладка не определена.
3.4. Свойства сополимеров, содержащих 4-гидроксивалерат	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ	16
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	17

ВВЕДЕНИЕ

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются биополимерами, которые синтезируются многими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста, при избытке углеродного и энергетического субстрата в среде и дефиците минеральных элементов (азота, серы, фосфатов и др.), а также кислорода. В последние годы изучению ПГА уделяется огромное внимание благодаря их потенциальному применению в различных областях, так как по сравнению с обычными пластиками ПГА разрушаются в аэробных/анаэробных условиях и являются биосовместимыми материалами, поэтому интерес к ним увеличивается [1].

Сополимерные ПГА различного химического состава более перспективны, чем гомополимер П(ЗГБ), однако их получение – весьма сложная технологическая задача [2]. В питательную среду можно добавлять предшественники различных мономеров, таких как ЗГБ, 4ГБ и 4ГВ. Добавление данных предшественников (как показано в работах Huong et al., 2014, Muzaiyanah and Amirul, 2013, Ramachandran et al., 2011) значительно влияет на состав полимера и его физико-химические свойства. В этих работах была продемонстрирована возможность получения сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) при росте штамма *Cupriavidus sp.* USMAA1020 (DSM 19416) на олеиновой кислоте с предшественниками 4ГБ: γ -бутиролактоном, 1,4-бутандиолом, 1,6 – гександиолом с высокими выходами биомассы и полимера и трехкомпонентных полимеров П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) бактериями *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 при росте на олеиновой кислоте с предшественниками 4ГВ, ЗГВ и 4ГБ, соответственно, γ -валеролактоне, 1-пентаноле и 1,4-бутандиоле [3]. 4-гидроксивалератсодержащие полимеры принадлежат к классу термопластичных эластомеров. Это свидетельствует о том, что они обладают высокоэластичными свойствами и вязкостью и, следовательно, могут растягиваться до размеров, во много раз превышающих его начальную длину (эластомерная нить), и, что существенно, возвращаться к исходному размеру, когда нагрузка снята. К тому же, сополимеры, содержащие 4ГВ, являются термопластами. Это значит, что они имеют высокую температуру стеклования [4]. 4-гидроксивалератсодержащие сополимеры являются очень перспективными и могут широко использоваться в промышленности и регенеративной медицине. Из них можно производить различные упаковочные материалы, тару, бутылки и т. д. В медицине – это шовная нить, системы доставки лекарственных средств, скэффолды и т. д.

Цель: исследовать влияние γ -валеролактона на рост *Cupriavidus eutrophus* В-10646, состав и свойства синтезированного полимера.

Задачи:

1. Исследовать влияние различных концентраций γ -валеролактона на рост *Cupriavidus eutrophus* В-10646 и синтез полимера.
2. Изучить физико-химические свойства синтезированных полимеров с различными включениями мономеров.

1. Обзор литературы

1.1. Культивирование микроорганизмов, синтезирующих полигидроксиалканоаты

ПГА - это полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот различной химической структуры. Сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смесь CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, и т. д. Биотехнологический процесс получения полимеров этого класса заключается в культивировании штамма-продуцента в жидкой питательной среде при постоянной аэрации стерильным воздухом и перемешивании. Для производства ПГА необходимы избыток углеродного субстрата и ограничение синтеза основных (азотсодержащих) соединений каким-либо компонентом субстрата или питательной среды [5]. В качестве продуцента используются штаммы бактерий различных таксономических групп, характеризующиеся способностью синтезировать полимеры различной химической структуры и позволяющие использовать разнообразные субстраты. К таким бактериям относятся *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Methylomonas*, *Methylobacterium organophilum* (Воинов, Н. А., Волова Т. Г., 2015), но наиболее перспективным продуцентом является *Cupriavidus eutrophus* [6]. Данный штамм обладает широким органотрофным потенциалом и может применять в качестве источников углерода различные вещества. Данный штамм устойчив к концентрациям 3-5 г/л в культуральной среде следующих органических субстратов: валериановая кислота, гексановая кислота, γ -бутиролактон – и способен использовать их для синтеза сополимеров ПГА, содержащих коротко- и среднецепочечные мономеры (Волова, Шишацкая, 2012) [7]. Бактерии выращивают в периодическом двустадийном режиме, разработанном ранее для синтеза ПГА (Волова и др., 1996) [8].

1.2. Синтез полигидроксиалканоатов

В биосинтезе полигидроксиалканоатов ключевыми являются три фермента: кетотиолаза, ацетоацетил-КоА-редуктаза и ПГА-синтаза, которые кодируются соответственно генами *phbA*, *phbB*, *phbC*. Регуляция процесса синтеза ПГА может осуществляться на нескольких уровнях: на уровне экспрессии генов специфическими факторами среды (например, недостаток питательных элементов) или на уровне регуляции активности ферментов специфическими клеточными компонентами, являющимися их субстратами или

ингибиторами. Возможен смешанный тип регуляции активности ферментов, участвующих в метаболизме ПГА. Установлено, что синтез ПГА стимулируется высокой внутриклеточной концентрацией НАДФН и высоким соотношением НАДФН/НАДФ [9].

Последовательность реакций биосинтеза ПГА следующая: 2 молекулы ацетил-СоА взаимодействуют между собой с помощью фермента кетотиолазы, в результате чего образуется ацетоацетил-СоА и свободный HS-СоА. Затем ацетоацетил-СоА восстанавливается NADPH+H⁺, взаимодействуя с ферментом ацетоацетил-СоА-редуктазой. Образуется окисленная форма NADP⁺ и (R)-3-гидроксибутирил-СоА, из которого, благодаря ферменту ПГА-синтазе, получается П(ЗГБ).

Таким образом, в синтезе полигидроксиалканоатов участвуют три фермента. Первые два отвечают за синтез субстратов, причем кетотиолаза включает синтез полимера. ПГА - синтаза определяет количество и качество синтезированного ПГА.

1.3. Основные виды полигидроксиалканоатов

Бактериальные ПГА подразделяются на 3 группы: ПГА с короткой цепью (3-5 атомов углерода), со средней длиной цепи (6-14 атомов углерода) и длинноцепочечные ПГА (более 14 атомов углерода). Данное разделение полимеров на группы базируется на существующем представлении о субстратной специфичности ПГА-синтаз, акцептирующих определенные гидроксикислоты при строительстве полимерной цепи в процессе полимеризации [10]. Важнейшими характеристиками полимеров служат величина молекулярной массы (ММ) и степень полимеризуемости. Полидисперсность позволяет оценить, каково соотношение в полимере фрагментов с различной степени полимеризуемости. Корректная регистрация данных параметров возможна только с применением гелепроникающей хроматографии, которая позволяет определить молекулярную массу и полидисперсность полимера [11]. Чистый поли(3-гидроксибутират) весьма хрупок и мало устойчив к растяжению. Недостаточные эластичность и термостабильность П(ЗГБ) затрудняют процессы его переработки, что ограничивает возможные области применения [12]. Поэтому ведутся исследования по созданию полигидроксиалканоатов с различным качественным и количественным составом мономеров. К таким мономерам относятся 3-гидроксимасляная кислота, 4-гидроксимасляная кислота, 3-гидроксивалериановая кислота, 4-гидроксивалериановая кислота, а также 3-гидроксиоктановая и 3-гидроксигексановая кислоты. Изменение соотношения мономеров в ПГА сопровождается существенными изменениями термических, механических и волоконных свойств материала [13].

Первым среди выделенных и наиболее полно к настоящему времени охарактеризованным полигидроксиалканоатом является поли(3-гидроксибутират) (ПГБ). Поли-3-гидроксибутират (C₄H₆O₂) – гомополимер D(-)-3-β-гидроксимасляной кислоты, представляет собой изотактический

полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами. Полигидроксибутират – это стереорегулярный оптически активный полимер, обладающий высокой степенью кристаллизации. В живых клетках П(ЗГБ) в гранулах находится в мобильном состоянии, но не в растворенном. Поли(3-гидроксибутират) один из наиболее изученных и широко применяемых полигидроксиалканоатов (Lietal., 2009) [14].

Одним из перспективных, но трудно синтезируемых ПГА является сополимер 3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата П(ЗГБ-со-4ГБ). Для этого типа ПГА характерны высокие скорости биодеградации *in vivo* и в окружающей среде, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства общеизвестных полимеров этого класса. Установлено, что включение 4ГБ резко влияет на соотношение кристаллической и аморфной зон в сополимере, значительно снижая кристалличность последнего. В последние годы изучение этого представителя ПГА активизировалось. В качестве новых продуцентов сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ) описаны рекомбинантные и природные штаммы. П(ЗГБ-со-4ГБ) в настоящее время разрабатывается в качестве нового биоматериала для медицинских и фармацевтических применений. Наличие 4ГБ в сополимере снижает кристалличность и, как правило, обеспечивает гибкие и эластичные свойства. Химическая структура П(4ГБ) похожа на нынешние рассасывающиеся полиэферы, используемые в имплантируемых медицинских изделиях. Кроме того, П(ЗГБ-со-4ГБ) может быть изменен разными способами, чтобы преодолеть или свести к минимуму главные недостатки в их свойствах, такие как отсутствие гидрофильности и биоактивности. П(ЗГБ-со-4ГБ) можно использовать в различных областях медицины, таких как сердечно-сосудистые, ранозаживляющее, ортопедические, доставки лекарств и тканевой инженерии [15].

Еще одним полимером, который также является достаточно перспективным, является П(ЗГБ-со-3ГВ-со-4ГВ). Было показано, что он принадлежит к классу термопластичных эластомеров. Также, исследования показали, что данный трехкомпонентный полимер более эластичный, чем описанные выше полиэферы, за счёт присутствия мономера 4ГВ. Низкая температура плавления и степень кристаллизации этого полиэфера являются причиной липкости и затрудненной переработки, хотя они обеспечивают очень высокую термическую стабильность по сравнению с полиэферами, содержащими 3ГГ и 3ГО. Поэтому данный полимер имеет свойства схожие со свойствами латекса и может в дальнейшем использоваться на тех же производствах. А. R. Muzaiyana, и А. А. Amirul показали, что полимер П(ЗГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) с содержанием мономеров 4ГВ 2-4% имеет низкую средневесовую молекулярную массу и высокий индекс полидисперсности по сравнению с гомополимером П(ЗГБ) [16]. П(ЗГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) также является очень эластичным, и показано, что присутствие мономеров 4ГВ в полимере увеличило его механические свойства. Полимер стал более пластичный. Также данный полимер более термоустойчив, так как значения

температуры деструкции у него выше, хотя кристалличность у него ниже (Gorenflo, 2001; Nartin and Prather, 2009; Schmaketal, 1998; Valentin and Steinbuchel, 1995) [4], [17], [18], [19].

1.4. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов

Переход полимеров в кристаллическое состояние – кристаллизация – происходит при охлаждении расплавов полимеров или в процессе осаждения их из растворов, а также при одноосном растяжении эластомеров. Кристаллизация – фазовый переход первого рода с присущими каждому полимеру значениями температуры и теплоты перехода; эти характеристики определяют калориметрическими методами. Кристаллизация из расплавов осуществляется в широком диапазоне температур – от температуры стеклования до равновесной температуры плавления; зависимость скорости кристаллизации из расплава от температуры выражается кривой с максимумом. При кристаллизации полимеров всегда сохраняются области с неупорядоченной (аморфной) структурой, поэтому для характеристики полимеров используют понятие степени кристалличности. Степень кристалличности показывает объемное отношение неразделяемых аморфной и кристаллической фаз, зависит от природы полимера и строения его цепи, условий кристаллизации и внешних воздействий [20]. Значения кристалличности для трехкомпонентного полимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) составляли всего лишь 20,8%. Отсюда можно сделать вывод о том, что самой высокой кристалличностью обладает гомополимер П(3ГБ), а самой низкой - П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ). Температура кристаллизации – важный параметр, характеризующий физико-химические свойства полимера. Muzaiyanah and Amirul сравнивали температуру кристаллизации П(3ГВ-со-10%3ГБ) и П(3ГБ-со-9%3ГВ-со-1%4ГВ), а также П(3ГБ-со-27 %3ГВ) и П(3ГБ-со-27%3ГВ-со-2%4ГВ) [16]. Для первой пары температура кристаллизации снизилась с 2,4 до -12,8°C и степень кристалличности снизилась с 29 до 20,8%. Для второй пары значения температуры кристаллизации снизились с -2,8 до -13,2°C. Отсюда можно сделать вывод, что при увеличении в составе полимера содержания мономеров 3ГВ и 4ГВ, значения температуры кристаллизации снижаются. В статье Schemas et. al. 1998 года П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) имеет низкую температуру кристаллизации и, следовательно, он очень липкий [18].

Следующий параметр – прочность на растяжение. Как известно из предыдущих исследований, сополимеры П(3ГБ – 4ГВ), П(3ГБ—3ГВ) и трехкомпонентный полимер П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) обладают очень высокой эластичностью, в отличие от гомополимера П(3ГБ). Удлинение при разрыве у них составляет до 1000%, т.е. на два порядка выше, чем у П(3ГБ). У трехкомпонентного полимера удлинение при разрыве может достигать до 2000%. В статье Schemas et. al. полученный трехкомпонентный полимер был прочнее гомополимера П(3ГВ), и сила растяжения достигала 1000% [18]. У П(3ГВ) сила растяжения составляла всего лишь 1,4%. Отсюда можно сделать вывод, что полимер очень эластичен. Команда Gorenflo в 2001 году получила

трехкомпонентный полимер П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ), сила растяжения которого составляет 200% [4].

Значимым показателем, характеризующим гидрофильно/гидрофобный баланс поверхности, служит величина краевого угла смачивания водой. Измерение этой величины позволяет вычислить также такие важные характеристики поверхности, как величину сил сцепления, поверхностное натяжение и свободную энергию межфазовой поверхности. Самое высокое значение краевого угла имели мембраны, полученные из ПЗГБ ($70.0 \pm 0.4^\circ$) [2].

Молекулярная масса является одним из базовых свойств полигидроксиалканоатов. Микроорганизмы в различных условиях роста синтезируют полимеры, имеющие молекулярную массу от сотен до миллиона дальтон. Регулирование молекулярной массы полимера в процессе синтеза является важным фактором влияния на его механические свойства. Существует 3 вида молекулярных масс: среднечисловая (M_n), средневесовая (M_w) и средневязкостная (M_v). Отношение средневесовой и среднечисловой молекулярной массы дает величину, характеризующую полидисперсность соответствующего полимера:

$$ПД = M_w / M_n$$

Средневесовая молекулярная масса представляет собой сумму масс отдельных фракций. Среднечисловая молекулярная масса определяется делением массы образца полимера на число молекул. Полидисперсность (молекулярно-массовое распределение) – соотношение макромолекул различной молекулярной массы в данном образце полимера. Молекулярно-массовое распределение – фундаментальная характеристика полимера – наряду с химической и топологической структурой цепи макромолекулы, определяет весь комплекс физико-химических и механических свойств не только самого полимера, но и получаемого на его основе материала. Отношение $ПД = M_w / M_n$ может служить мерой полидисперсности полимера. Нередко требуется более полная характеристика полидисперсности, чем указанное выше отношение. Одному и тому же M_w / M_n могут соответствовать различные типы молекулярно-массового распределения (ММР) [21].

Согласно исследованиям Muzaiyanah и Amirul, молекулярная масса трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) была меньше, чем гомополимера П(ЗГБ) и сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ) и была равна от 1,1 до $5,7 * 10^5$ Да), в то время как масса П(ЗГБ) составляла $14,1 * 10^5$ Да) и масса П(ЗГБ-со-ЗГВ) находилась в пределах от 5,1 до $18,4 * 10^5$ Да) [16]. Однако, значения полидисперсности трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ) были выше, чем гомополимера П(ЗГБ) и составляли от 2,6 до 3,8. В работах Huong, 2017, было показано, что смесь субстратов, где много 1,4-бутандиола и мало 1,6-гександиола, производит серию сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) с более высокими значениями средневесовой молекулярной массы от 703 до 923 кДа, по сравнению со смесями, где мало γ -бутиролактона и много 1,4-бутандиола и мало γ -бутиролактона и много 1,6-гександиола [15]. Согласно данным Schemac et. al. значения полидисперсности для трехкомпонентного полимера П(ЗГБ-со-

3ГВ-со-4ГВ) колебались в пределах от 2.5 до 3.6 [18]. Команда Gorenflo в 2001 году получила полимер П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГВ) со значениями молекулярной массы $2.0 \cdot 10^5$ и $3.3 \cdot 10^5$ г/моль. Это показывает, что 4-гидроксивалератсодержащие полимеры принадлежат к классу термопластичных эластомеров [4].

1.5. Влияние различных источников углерода на синтез ПГА, содержащих 4ГВ

В доступной литературе, посвященной синтезу сополимеров с 4ГВ, крайне мало работ. Самой ранней из них (1995 г.) является статья Valentin и Steinbuchel. Они исследовали накопление трехкомпонентного полимера, содержащего 3ГБ, 3ГВ и 4ГВ, штаммом *Alcaligenes eutrophus* в присутствии валериановой кислоты в качестве источника углерода. Молярная доля 4ГВ в полимере составляла 5%. При использовании рекомбинантного штамма *Alcaligenes eutrophus* молярная доля 4ГВ выросла до 22,7%. Доля 3ГБ и 3ГВ были равны [19].

Одной из ранних является статья Schemas et. al. 1998 года. В ней синтезировали полиэферы в присутствии леулиновой кислоты при использовании бактерии *P. Putida*. Полимер имел в своем составе 3ГБ, 3ГВ и 4ГВ и содержание полимера составляло 50% [18].

Команда Gorenflo в 2001 году двустадийно культивировали штаммы *Pseudomonas putida* и *Ralstonia eutropha*, и содержание ПГА составляло 52%. Содержание 4ГВ составляло 15,4%. Было использовано 2 субстрата: октановая кислота – субстрат для роста и леулиновая кислота – прекурсор для накопления 4ГВ. Помимо 4ГВ полимер имел в своем составе 3ГБ, 3ГВ и следы 3ГГ и 3ГО. Также данные ученые культивировали *Pseudomonas putida* и *Ralstonia eutropha* в присутствии глюконовой и леулиновой кислоты. Был накоплен полимер, содержащий, в основном, 3ГВ и 4ГВ, и немного 3ГБ. Кроме того, содержание 4ГВ было выше, чем в клетках, культивированных на октановой кислоте. *P. Putida* используемая в данном исследовании синтезировала лишь незначительные количества ПГА на глюконовой кислоте. Когда глюкоза была добавлена в фазу накопления при добавлении леулиновой кислоты, содержание полиэфера увеличилось с 31,6 до 50,8%, поэтому соотношение 4ГВ и 3ГБ уменьшилось в пользу 3ГВ. Одновременно, выход ПГА на леулиновой кислоте значительно увеличился с 16,9 до 27,3%. Состав полимера был таков: 15,1 моль % 4ГВ, 82,3 моль % 3ГВ и 2,6 моль % 3ГБ. Молекулярная масса и индекс полидисперсности - $(528 \pm 26) \cdot 10^3$ и 3.1 ± 0.2 , соответственно. Температура кристаллизации - -12°C . Сила растяжения полимера составляла 1000% [4].

Nartin et. al. в 2009 году установили, что *Pseudomonas putida* запасает сополимеры ПГА, содержащие 4-гидроксивалерат и 3-гидроксивалерат при культивировании на леулиновой кислоте. Молярный выход 4-гидроксивалерата и 3-гидроксивалерата на леулинате составлял 15,3% и 4,2% на 72 час, соответственно. Самый высокий титр 4-гидроксивалерата

($13.9 \pm 1.2 \text{ г/л}^{-1}$) наблюдался при температуре 32°C с добавлением глюкозы в среде ЛБ. Молярный выход 4-гидроксивалерата на леулините был $25 \pm 1\%$. Самый высокий титр 3-гидроксивалерата в этом эксперименте наблюдался при 30°C без добавления глюкозы и составлял $3.1 \pm 0.4 \text{ г/л}^{-1}$, соответствующий выходу на леулините $7 \pm 1\%$. В бедной среде самый высокий титр 4-гидроксивалерата и 3-гидроксивалерата составлял $2.1 \pm 0.0 \text{ г/л}^{-1}$ [17].

Muzaiyanah и Amirul в 2013 году показали, что накопление ПГА составляло от 15 до 55 моль.% при повышении концентрации γ -валеролактона. Значения свободной клеточной биомассы составляли от 1,1 до 1,7 г/л. ЗГВ оказался основной мономерной единицей, значения которой варьировались от 91 до 94 мол.% по сравнению с ЗГБ (4-5 моль%) и 4ГВ (2-4 моль%). Самая высокая концентрация ПГА - 1.0 г/л, а самая большая биомасса - 1.7 г/л. В виду того, что γ -бутиролактон может использоваться *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 для синтеза П(ЗГБ-со-4ГВ), можно предположить, что γ -валеролактон можно использовать точно также, так как он относится к той же группе лактонов.

Также эти же ученые (Muzaiyanah и Amirul) исследовали эффект γ -валеролактона в комбинации с различными жирными кислотами в качестве источников углерода на бактериальный рост и накопление ПГА, содержащих 4ГВ. Они показали, что количество ПГА значительно увеличилось при использовании γ -валеролактона вместе с жирными кислотами. Lo et al. установил, что добавление жирных кислот в качестве пищевых добавок в питательную среду помогает улучшить клеточный рост и накопление ПГА. Была получена клеточная биомасса, равная 3-5,7 г/л в комбинации олеиновой кислоты и γ -валеролактона. Наблюдались небольшие различия в содержании ПГА при использовании различных комбинаций жирных кислот и γ -валеролактона. Комбинация олеиновой кислоты и γ -валеролактона дала самую высокую клеточную биомассу (5,7 г/л), за ней следует миристиновая кислота, стеариновая кислота и пальмитиновая кислота. Кроме того, эти сочетания также показали большие значения биомассы (3,3 г/л) и концентрации ПГА (2,5 г/л). Наиболее существенные изменения можно увидеть в содержании ЗГБ и ЗГВ в полимере. Увеличение ЗГБ в составе трехкомпонентного полимера, соответственно, привело к снижению ЗГВ. При использовании γ -валеролактона в качестве единственного источника углерода, в составе полимера наблюдалось около 4-5% ЗГБ с высоким содержанием ЗГВ около 94 и 91%. Затем, когда жирные кислоты были добавлены совместно с γ -валеролактоном, содержание ЗГБ возросло от 11 до 57%, поэтому содержание ЗГВ уменьшилось до 41-68%. Однако, здесь не было значительных различий в содержании 4ГВ, его значения колебались от 2 до 4%, когда γ -валеролактон был использован как единственный источник углерода. Такая же ситуация наблюдалась при совмещении жирных кислот и γ -валеролактона в качестве источников углерода, где содержание 4ГВ было около 1 и 2 моль%.

Кроме того, был исследован эффект различных концентраций олеиновой кислоты на бактериальный рост и накопление П(ЗГБ-со-ЗГВ-со-4ГВ). Клеточная биомасса была равна 4,1 - 5,9 г/л и содержание ПГА составляло от

30 до 44% при повышении концентрации олеиновой кислоты. Остаточная биомасса увеличилась с 2,8 до 4,2 г/л вместе с увеличением концентрации олеиновой кислоты. В составе ПГА произошло увеличение содержания ЗГБ от 15 до 70%, поэтому состав ЗГВ снизился с 83 до 27%. С другой стороны, состав 4ГВ оставался на уровне 1-2 моль%. Когда концентрация γ -валеролактона уменьшилась и концентрация олеиновой кислоты увеличилась, клеточная биомасса увеличилась от 3,2 г/л до 7,2 г /л. Таким образом, остаточная биомасса была от 2,3 до 3,6 г/л. Содержание ПГА - от 29 до 63% и концентрация ПГА - от 0,9 до 4,5 г/л [16].

2. Материалы и методы

2.1. Бактериальный штамм, среда и условия роста

В работе использовали штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646. Посевной материал исследуемого штамма получали ресуспендированием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Далее музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде в стеклянных колбах объемом от 0,5 л при коэффициенте заполнения 0,4 с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova»®серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при 30 °С и 200 rpm. Для выращивания бактерий использовали среду Шлегеля (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025; NH_4Cl – 1. Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который вводили из расчета 5 мл/л; микроэлементы вводили по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л. среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0,288; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,050; NiCl_2 – 0,008 г/л. В качестве источника углерода использовали фруктозу. Динамика накопления биомассы клеток и ПГА штаммом В-10646 исследована в гетеротрофном режиме выращивания. Продолжительность культивирования составляла 72 часа. В качестве дополнительного источника углерода использовали γ -валеролактон. Начальная концентрация фруктозы составляла 10 г/л, γ -валеролактона – 0,5-3 г/л. По ходу роста культуры и исчерпания субстрата делали добавки соответствующих субстратов в культуру в концентрациях, аналогичных исходным.

2.2. Измерение параметров культивирования

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры.

Определение оптической плотности культуры: к 5 мл дистиллированной воды добавляли 1 мл культуры. Измеряли полученную пробу на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 440 нм в кювете диаметром 1 мм.

Для определения веса сухой биомассы 20-25 мл культуры центрифугировали на центрифуге «Eppendorf Centrifuge 58 10 R®» при 6000 об/мин в течение 7 минут. Далее надосадочную жидкость сливали, биомассу промывали дистиллированной водой и снова центрифугировали. Данный процесс повторяли дважды. Полученный осадок переносили в предварительно взвешенные бюксы, помещали в сушильной шкаф «ШС-80-01 СПУ» и высушивали при температуре 105 °С в течение 24 часов. По истечении этого

времени бюксы переносили в эксикатор для охлаждения, затем взвешивали и рассчитывали сухую биомассу (г/л).

Определение концентрации фруктозы проводили следующим образом: супернатант разводили в 50 раз. 1 мл полученной пробы наливали в пробирку и добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина + 3 мл 80%-ного раствора соляной кислоты. Пробирки помещали на водяную баню на 20 мин. Далее контроль и пробы охлаждали и измеряли на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 540 нм. Концентрацию фруктозы смотрели по калибровочному графику.

Для определения концентрации γ -валеролактона 20 мл культуры центрифугировали на центрифуге «Eppendorf Centrifuge 58 10 R®» при 6000 об/мин в течение 7 минут. По завершении центрифугирования отбирали 1 мл надосадочной жидкости, подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения pH=2-3, добавляли 3 мл хлороформа, перемешивали. Далее из нижнего слоя отбирали 1 мкл пробы для анализа на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A/5975C (США).

2.3.Измерение содержания полимера

Внутриклеточную концентрацию ПГА определяли в разные интервалы времени, анализируя образцы сухой клеточной биомассы. Содержание внутриклеточного ПГА и состав выделенных образцов полимера анализировали с помощью GC-MS (7890/5975C, Agilent Technologies, США). Содержание и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра Agilent Technologies 7890A/5975C (США). Для этого сухая биомасса бактерий и полимер были подвержены метанолизу в присутствии серной кислоты и метанола при 80°C в течение 2 часов 40 минут. Бензойная кислота была использована в качестве внутреннего стандарта для определения общего внутриклеточного ПГА. Мономерные звенья идентифицировали в выделенных и очищенных ПГА образцах на основе их масс-спектров и времени удерживания. Спектры ¹H-ЯМР растворов ПГА в CDCl₃ получены с использованием ЯМР-спектрометра Avance III 600 “Bruker” (Германия).

2.4.Измерение молекулярной массы

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исходных образцов полимеров и в составе форм исследовали с использованием хроматографа для гелепроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов Agilent PS-N EasiVial. Растворяли образцы сополимерных ПГА навеской 10-12 мг в 2 мл хлороформа с дальнейшей их фильтрацией. Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность (ПД). Значение среднечисловой молекулярной массы определяли по формуле:

$M_c = \sum(N_i \times M_i / N)$, где N_i — количество молекул массы I ; N — общее количество молекул; M_i — масса молекул длины I .

Средневесовую молекулярную массу определяли как:

$M_w = \sum(w_i \times M_i)$, 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:

$ПД = M_w / M_c$.

2.5. Измерение краевого угла смачивания

Для изучения физико-химических свойств ПГА использовали образцы в виде пленок. Пленки получали методом полива разогретого до 35°C раствора ПГА в дихлорметане на обезжиренную поверхность предварительно нагретых до такой же температуры маленьких чашек Петри (100 мг ПГА растворяли в 5 мл дихлорметана). Чашки Петри оставляли под стеклянным колпаком на сутки. Свойства поверхности рассчитывали на базе измерения контактного краевого угла смачивания водой и диодметаном (θ , град) с использованием оборудования KRUSS (Германия). К свойствам поверхности относятся: свободная поверхностная энергия γ_s , свободная энергия межфазовой поверхности γ_{SL} и величина сил сцепления W_{SL} (эрг/см²). Полученные пленки нарезали ровными полосками, закрепляли их на подложке. Далее с помощью оборудования KRUSS наносили поочередно капли воды и диодметана. Нанесение капель регистрировала видеокамера. Полученные кадры обрабатывались при помощи программного обеспечения КРУСС, в котором использовался метод Юнга-Лапласа для определения динамики краевого угла смачивания, а именно величины краевого угла, общей поверхностной энергии, дисперсионной составляющей и полярной составляющей.

2.6. Измерение температуры плавления

Комплексный термический анализ полигидроксиалканоатов проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 («Mettler Toledo», Швейцария). Образцы в виде порошка массой 4,0±0,2 мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью 5 °С/мин до 200 °С. Далее образцы охлаждали до - 20 °С, выдерживали в течении 20 минут и повторно нагревали до 320 °С. Температуры стеклования, кристаллизации, плавления и термической деградации определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE».

[изъято 11 стр.]

ВЫВОДЫ

1. Исследован рост бактерий *Cupriavidus eutrophus B-10646* и накопление полимера в периодической культуре при росте на фруктозе с добавлением γ -валеролактона в концентрациях 1-3 г/л в начале культивирования и в фазу активного роста бактерий (24 час культивирования). Показано отсутствие ингибирующего влияния исследуемых концентраций добавленного на 24 ч культивирования γ -валеролактона на рост бактерий и накопление полимера. Установлено, что полимер, синтезируемый бактериями помимо 3ГВ, содержит включения 3ГВ и 4ГВ.
2. Исследован рост бактерий *Cupriavidus eutrophus B-10646* и накопление полимера в периодической культуре при росте на фруктозе с периодичностью добавления γ -валеролактона 8-16 ч. Показано увеличение включения 3ГВ и 4ГВ с увеличением концентрации γ -валеролактона. Максимальные включения 3ГВ и 4ГВ получены при концентрации γ -валеролактона 5 г/л и составляли соответственно 5,56 и 1.85 мол.%.
3. Исследованы молекулярно-массовые характеристики и поверхностные свойства пленок, изготовленных из синтезированных полимеров различного состава. Отмечено снижение средневесовой и среднечисловой молекулярной массы у полимеров, содержащих 4ГВ. Показано, что с увеличением содержания 3ГВ и 4ГВ происходило значительное снижение дисперсионной составляющей по сравнению с пленками из П(3ГВ).
4. Показано, что при небольших (минорных) включениях 4ГВ (1,85%) значительно изменяются физико-химические свойства сополимеров, а именно, происходит снижение температуры плавления до 158°C по сравнению с П(3ГВ) - 178°C. Изменений в температуре деградации не обнаружено.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Воинов, Н. А. Полигидроксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот: синтез, свойства, области применения / Волова, Т. Г. // Journal of Siberian Federal University. Biology 2 (2015 8) 131-151.
2. Волова, Т. Г. Высокмолекулярные соединения / Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения / Структура и свойства / Жила, Н. О., Шишацкая, Е. И., Миронов, П. В. / Серия А / 2013 / том 55 / №7 / С. 775-786.
3. Жила, Н. О. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus B-10646*, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Волова Т. Г., Калачева Г. С. / Journal of Siberian Federal University. Biology 2 (2014 7) 161-173.
4. Gorenflo, V.; Schmack, G.; Vogel, R.; Steinbüchel, A. Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4-Hydroxyvalerate-Containing Polyesters and Characterization of Their Physical and Mechanical Properties. Biomacromolecules 2001, 2, 45-57.
5. Волова Т. Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов / Journal of Siberian Federal University. Biology 2 (2015 8) 131-151.
6. 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. - С. 73.
7. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Штамм бактерий ВКПМ В-10646 – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения. Патент РФ №. 2439143. Зарегистрирован 10.01.2012.
8. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Константинова В.М. (1996) Способ получения гетерополимера β-оксимасляной и β-оксивалериановой кислот. Патент № 2051968.
9. Volova T. G., Kalacheva G.S., A. Steinbüchel. Biosynthesis of MultiComponent Polyhydroxyalkanoates by the Bateriaium Wautersia eutropha/ Macromol. Symp. /2008, 269, 1–7.
10. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh., H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. - 2000. - 1503-1555 с.
11. Тагер А. А. Физико-химия полимеров/Тагер А.А. – Москва: Издательство «Химия». – 1968.-500с.


12. Barham P. J. et al. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate // *Journal of Materials Science*. – 1984. – Т. 19. – №. 9. – С. 2781-2794;
13. Volova T.G. (2004) Polyhydroxyalkanoates – Plastic Materials of the 21st Century: production, properties, application. New York: Nova Science Pub., 282 p.
14. Senior, P. G. Polyhydroxybutyrate, a speciality polymer of microbial origin In / P. G. Senior, A. Dean, D. Ellwood, C. Evans, E. Horwood // eds. *Continuous culture*. – 1984. – V. 8. – P. 266–271.
15. Huong, K. H. Microbial-based synthesis of highly elastomeric biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thermoplastic / C. H. Teh, A. A. Amirul // *Int J Biol Macromol*. 2017 Aug;101:983-995.
16. Muzaiyanah, A. R. Studies on the Microbial Synthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Containing 4-Hydroxyvalerate Using γ -Valerolactone / A. A. Amirul // *Biochem Biotechnol* (2013) 170:1194–1215.
17. Martin, C. H. High-titer production of monomeric hydroxyvalerates from levulinic acid in *Pseudomonas putida* / K. L. J. Prather // *Journal of Biotechnology* 139 (2009) 61–67.
18. Schmac, G. Biotechnological Production and Characterization of Polyesters Containing 4-Hydroxyvaleric Acid and Medium-Chain-length Hydroxyalkanoic Acids / V. Gorenflo, A. Steinbüchel // *Macromolecules* 1998, 31, 644-649.
19. Valentin, H. E. Accumulation of Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by Mutants and Recombinant Strains of *Alcaligenes eutrophus* / A. Steinbüchel // *Journal of Environmental Polymer Degradation*, Vol. 3, No. 3, 1995.
20. Жирнов, А.Е. Структура полимеров [Электронный ресурс]: Методическая разработка для теоретического курса и лабораторных работ по высокомолекулярным соединениям / Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений; сост.: Жирнов А.Е., Аржаков М.С. – Москва, 2013. – С. 41.
21. Рафигов, С. Р. Методы определения молекулярных весов и полидисперсности высокомолекулярных соединений / Павлова, С. А., Твердохлебова, И. И./ М. – 1963. - С. 335.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 М. Г. Волова
«18» июня 2018г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Синтез и свойства полимеров, содержащих 4-гидроксивалерат

Руководитель  18.06.2018

к.б.н. Н. О. Жила

Выпускник  18.06.2018

М. Д. Косенок

Красноярск 2018