

УДК 579.

БИОСИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРОВАЛЕРАТА С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ ПРИ РОСТЕ *Methylobacterium extorquens* G-10 НА СМЕСИ МЕТАНОЛА И ПЕНТАНОЛА

© 2013 г. В. А. Ежов, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, Московская область 142290;

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 23.08.2012 г.

Изучено влияние концентрации и времени добавления косубстрата (пентанола) на молекулярную массу (Мм) сополимера полигидроксибутиривалерата (ПГБВ), синтезируемого *Methylobacterium extorquens* G-10 при выращивании на среде с метанолом. Показано, что увеличение концентрации пентанола до 20% в смеси с метанолом стимулировало биосинтез ПГБВ с Мм ~1500 кДа и содержанием валерата до 50%, особенно при добавлении пентанола в логарифмической фазе роста культуры. Высокие концентрации пентанола токсичны для продуцента и снижали общий выход ПГБВ. Увеличение Мм до 1500 кДа снижает температуру плавления биополимера (с 172 до 162°C) и степень кристалличности (с 63 до 8%), но повышает его эластичность. Обнаруженная вариабельность свойств ПГБВ значительно расширяет сферы потенциального применения синтезируемых биопластиков.

DOI: 10.7868/S0555109913020049

Открытие и изучение полигидроксиалканоев (ПГА) — полиэфиров микробного происхождения, явилось значительным событием для биотехнологии новых материалов. ПГА — термопластичные, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры, потенциальные области применения которых включают биомедицину, пищевую и косметическую промышленность, производство упаковочных материалов и сельское хозяйство [1, 2].

К настоящему времени описано более 300 продуцентов ПГА и около 150 различных полигидроксиалкановых кислот [3, 4]. Однако наибольшую коммерческую ценность представляют полигидроксибутират (ПГБ) и сополимер 3-гидроксибутирата (3-ГБ) с 3-гидроксивалератом (ПГБВ). Введение 3-гидроксивалерата (3-ГВ) в ПГБ существенно улучшает физико-химические свойства сополимера. ПГБВ обладает пониженной температурой плавления (увеличивается технологическое “окно перерабатываемости” между температурами плавления и началом термического разложения), большей эластичностью и прочностью [1–6]. Для биосинтеза ПГБВ необходимо добавлять в основную ростовую среду косубстраты. Наиболее эффективными косубстратами являются пентанол или пентановая кислота [7–10]. В качестве основных ростовых субстратов для биосинтеза полимеров чаще всего используют углеводы [11–17]. В России дешевым источником углерода является метанол, производство которого составляет около 3 млн т. ежегодно. Аэробные метиловобактерии с сериновым путем метаболизма

C1-соединений синтезируют из метанола 40–80% ПГБ от сухой биомассы [8, 10, 12, 15]. При добавлении к метанолу в качестве косубстрата пентанола или пентановой кислоты метиловобактерии синтезируют ПГБВ, однако характеристики процесса изучены недостаточно [7–10].

Цель работы — изучение условий биосинтеза ПГБВ при выращивании *Methylobacterium extorquens* G-10 на смеси метанола и пентанола, а также характеристика основных физико-химических свойств сополимера.

МЕТОДИКА

Объекты и условия культивирования. *Methylobacterium extorquens* G-10 выращивали на минеральной среде, следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 1.0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; 10 мл раствора микроэлементов. Раствор микроэлементов содержал (г/л): $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.2; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.5; NaMoO_4 — 0.02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1.0. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл среды и 0.5 мл метанола при 29°C на роторной качалке (180 об/мин) в течение 2 сут. Культуру в середине логарифмической фазы роста ($\text{ОП}_{600} = 1.0$) использовали в качестве посевного материала (инокулята) для ферментера. Периодическое культивирование в ферментере АНКУМ-2М (“Биоприбор”, Россия) проводили в режиме автоматического поддержа-

ния температуры 30°C и pH 6.85. В ферментер внесли 4.0 л минеральной среды и 200 мл посевного материала. pH поддерживали 25%-ным NH_4OH или 10%-ным раствором NaOH . При достижении культурой $\text{ОП}_{600} = 30$ добавляли 50 мл концентрата среды, содержащего (г/л): $\text{H}_3\text{PO}_4 - 270$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 80.0$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 2.3$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.6$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.3$; $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.5$; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.6$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.4$. Метанол добавляли дробно (порциями от 5 до 20 мл) по мере потребления растущей культурой, о чем судили по резкому увеличению уровня растворенного кислорода (pO_2) в момент полного потребления метанола. pO_2 поддерживали на уровне 20–30% от насыщения посредством увеличения числа оборотов мешалки до 1000 об/мин и расхода воздуха до 6 л/мин.

Пентанол добавляли в смеси с метанолом при достижении культурой разных фаз роста и до конца культивирования. Использовали 2, 10, 15 и 20% (по объему) концентрации пентанола в метаноле. Постепенное (дробное) внесение пентанола в среду позволяло снизить его токсическое влияние на растущую культуру.

Содержание биомассы определяли, измеряя оптическую плотность (ОП_{600}) в 0.5 см кювете на спектрофотометре Specol 221 (“Carl Zeiss”, Германия) и пересчитывали на сухую биомассу по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой отбирали по 50 мл суспензии клеток с известной ОП, центрифугировали (10000 g, 20 мин), полученный осадок сушили при 105°C до постоянной массы и взвешивали.

Содержание NH_4^+ в культуральной среде анализировали иономером MA-130 (“Mettler Toledo GmbH”, Швейцария) с аммонийным датчиком.

Для выделения ПГБ и ПГБВ из биомассы культуральную жидкость центрифугировали (10000 g, 30 мин), осадок сушили лиофильно. Навеску высушенной биомассы перемешивали с 6 об. метанола в течение 1 ч и центрифугировали при 5000 g 20 мин. Полученный осадок при перемешивании экстрагировали 6 об. хлороформа в течение 3 ч. Суспензию фильтровали через обеззоленную фильтровальную бумагу. Хлороформенный экстракт осветляли активированным углем марки А, который отделяли затем на воронке Бюхнера под вакуумом. Осветленный экстракт упаривали на роторном испарителе в 5–6 раз (до состояния жидкого киселя). Концентрат при энергичном перемешивании выливали в 6-кратный об. метанола. Выпавший осадок ПГБ или ПГБВ отделяли на воронке Бюхнера и сушили при 105°C.

Содержание ПГБ в биомассе и соотношение 3-ГБ и 3-ГВ в ПГБВ определяли обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой C18 [16]. Для этого образцы ПГБ гидролизуют концентрированной серной кислотой, а образцы

ПГБВ гидролизуют щелочью до кротоновой и метилкротоновой кислот, гидролизаты наносят на колонку. Через колонку пропускают элюент (смесь метанол–вода 1 : 1) со скоростью 0.4 мл/мин и элюаты анализируют при 228 нм на УФ-детекторе UVIS 200 (“Linear”, США). По калибровочной кривой определяют количество ПГБ и количество 3-ГБ и 3-ГВ в сополимере.

Мм полимеров определяют вискозиметрическим методом, измеряя вязкость растворов ПГБ и ПГБВ в хлороформе при 30°C [13]. Мм рассчитывают по уравнению Марка-Хаувинка-Куна, используя коэффициент $[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} \text{ M}^{0.82}$ [17]. Температуру плавления (t , °C) ПГБ и ПГБВ, теплоту плавления (Дж/г), степень кристалличности и удлинения (%) при разрыве определяют методами дифференциального термического анализа на приборе STA 449 (“Jupiter NETZSCH”, Германия) и рентгеноструктурного анализа (рентгеноспектрометр D8 ADVANCE “Bruker”, Германия) соответственно [18]. Все опыты проводили в трех повторностях. В таблицах приведены средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

M. extorquens G-10 – аэробная метиловая бактерия с сериновым типом C1-метаболизма, синтезирующая при выращивании на минеральной среде с метанолом ПГБ или ПГБВ при использовании смеси метанола с пентанолом. Данные по биосинтезу ПГБВ при дробном внесении 15%-ной смеси пентанола в метаноле на различных стадиях роста культуры представлены в табл. 1. Переход на поддержание pH посредством подачи в ферментер 10%-ного раствора NaOH для создания лимита по азоту осуществляли при достижении культурой $\text{ОП}_{600} = 70$. Чем раньше добавляли пентанол к культуре, растущей на метаноле, тем быстрее начиналось угнетение роста продуцента. При этом резко снижалось количество синтезируемого ПГБВ, но увеличивалась доля валерата и Мм сополимера. Добавление пентанола в конце логарифмической фазы в меньшей степени угнетало рост продуцента, при этом увеличивался биосинтез полимера, но уменьшалась его Мм. Из этого следовало, что добавлять пентанол целесообразно до перехода к поддержанию pH с помощью NaOH , особенно, если ставится задача получения биополимера с высокой Мм.

Во второй серии опытов исследовали влияние концентрации пентанола на рост культуры и биосинтез ПГБВ. Смесь пентанола с метанолом различной концентрации начинали подавать в ферментер при достижении $\text{ОП}_{600} = 70$, т.е. в середине логарифмической фазы роста культуры. Как видно из табл. 2, с увеличением концентрации пентанола значительно возрастало содержание валера-

Таблица 1. Влияние косубстрата (15%-ный пентанол в метаноле) на рост *M. extorquens* G-10 и биосинтез ПГБВ

Условия роста			Конечное содержание полимера в биомассе, %	Содержание валерата в ПГБВ, %	Мм ПГБВ, кДа
ОП ₆₀₀ в момент внесения пентанола	конечные значения				
		ОП ₆₀₀	АСБ, г/л		
30	50	15	30	45	1200
50	95	27	38	36	930
70	110	38	41	13	425
90	130	52	45	0	250

Таблица 2. Влияние концентрации пентанола на рост *M. extorquens* G-10 и биосинтез ПГБВ с различной Мм

Концентрация пентанола в метаноле, % (об./об.)	Биомасса, г/л	Содержание, %		Мм полимера, кДа
		полимера в биомассе	валерата в полимере	
0	48	53	0	196
2	40	45	13.6	305
10	31	40	36.0	800
15	28	38	41.0	1150
20	25	30	50.0	1500

та, а также Мм сополимера. При содержании 20% (об.) пентанола в смеси с метанолом доля валерата в сополимере достигала 50%. Увеличение концентрации пентанола в смеси значительно снижало скорость роста культуры и выход ПГБВ, что может быть связано с его токсичностью. Токсичность для клеток бактерий пентанола и пентановой кислоты была показана и другими авторами [5, 9, 14].

Некоторые физико-химические свойства полученных биополимеров приведены в табл. 3, из которой следует, что с увеличением Мм ПГБВ резко снижалась кристалличность (с 63 до 8%) сополимера, который становился более аморфным и эластичным. Снижалась также температура плавления ПГБВ с 172 до 162°C, что важно при переработке пластика, так как увеличивается разрыв между температурами плавления и температурой разложения полимера. Большая степень эластичности сополимера подтверждается значительным удлинением пластика при разрыве (с 4

до 230%), что особенно предпочтительно при использовании ПГБВ в биомедицине.

Таким образом, *M. extorquens* G-10 при росте на метаноле в присутствии пентанола способен синтезировать ПГБВ с большим диапазоном Мм в зависимости от концентрации и плотности биомассы в момент внесения косубстрата. Вариабельность Мм получаемых сополимеров расширяет перспективы их применения для различных сфер биомедицины и нанобиотехнологии. Ранее влияние источника углерода и его концентрации на Мм ПГБ исследовали у другого штамма *M. extorquens* [19]. Обнаружено, что при выращивании метиловых бактерий на избытке метанола (1.5 об./об.) Мм ПГБ снижалась до 2×10^5 Да. Напротив, при низких концентрациях метанола (0.5 об./об.) Мм возрастала до 6.0×10^5 Да. В то же время при использовании метиловых бактериями сукцината был получен ПГБ с Мм 1.7×10^6 Да. Следовательно, Мм синтезируемого метиловыми бактериями ПГБ зависела от источника углерода и его концентрации. Представляет

Таблица 3. Зависимость физико-химических свойств биополимера от его Мм и содержания валерата

Содержание валерата в полимере, %	Мм полимера, кДа	Температура плавления, °С	Теплота плавления, Дж/г	Степень кристалличности, %	Удлинение при разрыве, %
0	196	172	92.6	63.0	4.0
13.6	305	171	79.6	55.0	5.0
36.0	800	165	28.0	19.0	40.0
50.0	1500	162	11.1	8.0	230.0

интерес дальнейшее изучение причин и механизмов, обуславливающих синтез биополимеров с различными Мм.

Работа выполнялась в рамках ГК 14.740.11.0111.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anderson A.J., Dawes E.A. // *Microbiol. Rev.* 1990. V. 54. № 4. P. 450–472.
2. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. Красноярск: Красноярский писатель, 2011. 392 с.
3. Steinbuechel A., Valentin Y.E. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. V. 128. № 3. P. 219–228.
4. Steinbuechel A., Wiese S.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992. V. 37. № 1. P. 691–697.
5. Byron D. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1995. V. 103. P. 247–250.
6. De Koning G. // *Can. J. Microbiol.* 1995. V. 41. P. 303–309.
7. Dawes E.A. // *Biosci. Reports.* 1988. V. 8. № 6. P. 537–547.
8. Ueda S., Matsumoto S., Takagi A., Yamane T. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 98. P. 57–60.
9. Gross R.A. // *Biomedical Polymers: Designed-to-degrade Systems* / Ed. S. Shalaby. N.-Y.: Hanser Publishers, 1994. P. 173–188.
10. Короткова Н.А., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // *Микробиология.* 1999. Т. 68. № 3. С. 347–355.
11. Page W.J., Manchak J. // *Can. J. Microbiol.* 1995. V. 41. № 1. P. 106–114.
12. Taidi B., Anderson A.J., Dawes E.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. V. 40. P. 786–790.
13. Мышкина В.А., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 3. С. 315–323.
14. Lee I.T., Kim M.K., Kim G.J., Chang H.O., Park Y.H. // *Biotechnol. Lett.* 1995. V. 17. P. 571–574.
15. Bourque D., Pomerleau Y., Groleau D. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. V. 44. P. 367–376.
16. Короткова Н.А., Ашин В.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1997. Т. 33. № 3. С. 339–343.
17. Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H. // *Macromol.* 1976. V. 9. № 2. P. 774–780.
18. Ребров А.В., Дубинский В.А., Некрасов Ю.П., Бонарцева Г.А., Штамм В.А., Антипов Е.М. // *Высокомолекулярные соединения.* 2002. Т. 44. № 2. С. 347–351.
19. Anderson A.J., Williams D.R., Taidi B., Dawes E.A., Ewing D.F. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1992. V. 103. P. 93–102.

Biosynthesis of Polyhydroxybutyrate/Valerate with Different Molecular Weights during the Growth of *Methylobacterium extorquens* G-10 on a Methanol–Pentanol Mixture

V. A. Ezhov, N. V. Doronina, and Yu. A. Trotsenko

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received August 23, 2012

Abstract—The influence of the concentration and time of addition of cosubstrate (pentanol) on the molecular weight (MW) of the polyhydroxybutyrate/valerate (PHBV) copolymer synthesized by *Methylobacterium extorquens* G-10 during cultivation in a methanol-containing medium has been studied. It was shown that an increase in the pentanol concentration to 20% in a mixture with methanol stimulated the biosynthesis of PHBV with a MW of ~1500 kDa and increased the content of valerate up to 50%, especially when pentanol was added to the log phase culture. High pentanol concentrations are toxic for the producer and reduce the total yield of PHBV. An MW increase to 1500 kDa lowers the melting temperature (from 172 to 162°C) and the crystallinity degree (from 63 to 8%) of the biopolymer but increases its elasticity. The revealed variability of PHBV properties extends considerably the potential application areas of synthetic bioplastics.