

На правах рукописи



**Зубков Илья Николаевич**

**Получение полигидроксиалканоата с помощью детергент-  
устойчивого штамма *Pseudomonas helmanticensis* P1**

1.5.6. Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте пищевых добавок – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН

**Научный руководитель:**

**Шишлянников Сергей Михайлович**, кандидат биологических наук, доцент Высшей школы биомедицинских систем и технологий ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

**Официальные оппоненты:**

**Нарыжный Станислав Николаевич**, доктор биологических наук, руководитель группы протеомики ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (г. Гатчина)

**Шамцян Марк Маркович**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой технологии микробиологического синтеза ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)" (г. Санкт-Петербург)

**Ведущая организация:**

**ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»** (г. Москва)

Защита состоится «29» ноября 2023 года в 14-00 ч. на заседании диссертационного совета У.1.5.6.15 федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Новороссийская, 48, аудитория 201).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» [www.spbstu.ru](http://www.spbstu.ru)

Автореферат разослан «\_\_» октября 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета У.1.5.6.15  
доцент, кандидат технических наук



Аронова Екатерина Борисовна

## РЕФЕРАТ

**Актуальность темы.** Поли-3-гидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой полиэфиры, получаемые биосинтетическим путем с помощью бактерий *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* и т.д. Они обладают рядом преимуществ по сравнению с традиционными полимерами, получаемыми путем переработки нефти. В частности, они быстро разлагаются как в природных экосистемах, так и в организме человека без образования токсичных продуктов. Полигидроксиалканоаты обладают множеством применений как в качестве упаковочных материалов, так и при производстве изделий медицинского назначения (например, протезов костной ткани, помогающих при восстановлении после переломов или средств доставки лекарственных препаратов). Однако высокая стоимость производства ПГА значительно ограничивает их использование. Большие производственные издержки связаны, среди прочего, с высокими энергозатратами. Неотъемлемой стадией большинства процессов производства ПГА служит паровая стерилизация сред. Для получения нескольких килограмм полимера требуется не менее тонны стерильной среды. Очевидно, что при стерилизации культуральных сред в промышленных масштабах расходуется значительное количество электроэнергии, стоимость которой постоянно возрастает. Избежать паровой стерилизации можно при использовании селективных сред, которые способны метаболизировать исключительно продуцент ПГА. Повысить селективность среды можно добавлением в нее какого-либо антимикробного агента, к которому у продуцента имеется толерантность. Таким агентом может быть поверхностно-активное вещество (ПАВ), например, додецилсульфат натрия (SDS). SDS предотвращает рост большинства микроорганизмов, однако некоторые продуцирующие полигидроксиалканоаты бактерии *Pseudomonas* устойчивы к действию этого ПАВ. Таким образом, добавление додецилсульфата в среду позволяет проводить культивирование в неаксеничных условиях и, тем самым, снизить стоимость производства ПГА.

**Степень разработанности темы.** С момента открытия полигидроксиалканоатов прошло около века. Множество ученых подробно исследовали процессы биосинтеза ПГА, их биоразложение и метаболизм штаммов-продуцентов. Наибольший вклад в изучение этой тематики внесли Justyna Mozejko-Ciesielska, Warren Blunt, Jose Manuel Borrero-de Acuna и др. Устойчивость бактерий *Pseudomonas* к додецилсульфату натрия также хорошо изучена. Исследования Janosch Klebensberger, Brendan Colley, John

Fitzgerald позволили существенно улучшить понимание процесса адаптации бактерий *Pseudomonas* к SDS-содержащим средам. Однако культивирование бактерий *Pseudomonas* в нестерильных средах, содержащих додецилсульфат, для получения полигидроксиалканоатов изучается автором диссертации впервые.

**Цель и задачи работы.** Цель работы – изучить процессы адаптации и накопления полигидроксиалканоатов почвенными бактериями *Pseudomonas* в средах, содержащих додецилсульфат натрия, при периодическом культивировании.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

- выделить устойчивый к SDS изолят из образца почвы;
- провести генотипирование выделенной культуры по гену 16S рПНК;
- изучить адаптацию изолята к средам, содержащим помимо субстрата (углевода, липида или глицерина) додецилсульфат натрия;
- оптимизировать условия проведения анализа мономеров ПГА в биомассе методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии;
- оптимизировать условия получения полигидроксиалканоатов путем периодического культивирования в неаксеничных условиях;
- выделить и охарактеризовать готовый полимер (установить его мономерный состав и молекулярно-массовое распределение).

**Методология и методы исследования.** Механизмы адаптации *Pseudomonas helmanticensis* P1 к SDS-содержащим средам изучались с помощью современных методов, таких как эпифлуоресцентная микроскопия и газовая хроматография – масс-спектрометрия. Анализ содержания мономеров ПГА в биомассе методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии проводился с помощью методики, разработанной автором и его коллегами. Оптимизация параметров культивирования проводилась с помощью эксперимента, составленного по центральному композиционному ротатабельному плану, и построения функции отклика в среде программирования R.

**Положения, выносимые на защиту:**

- механизмы адаптации *P. helmanticensis* P1 к средам, содержащим додецилсульфат натрия;
- модифицированная методика количественного определения остатков гидроксигирных кислот в сухой биомассе;

- методика препаративного получения полигидроксиалканоатов путем ферментации нестерильной SDS-содержащей среды *P. helmanticensis* P1;
- видовой состав культуры, получаемой при ферментации среды, содержащей 0,5 г/л додецилсульфата натрия и не прошедшей паровую стерилизацию;
- свойства готового полимера;
- методика синтеза наночастиц ПГА, стабилизированных Tween 80 – перспективной матрицы для внутриклеточной доставки некоторых гидрофобных лекарственных препаратов.

**Научная новизна работы.** Для бактерий рода *Pseudomonas* впервые определена роль жирнокислотного состава мембран клеток в адаптации к воздействию додецилсульфата натрия. Установлено, что природа субстрата оказывает значительное влияние на способность *P. helmanticensis* P1 адаптироваться к высоким (более 0,1 г/л) концентрациям додецилсульфата, добавленного к среде для культивирования.

Показана возможность накопления полигидроксиалканоата SDS-устойчивым изолятом *P. helmanticensis* P1. Подтверждено, что ограничение количества источника азота в среде является эффективной стратегией максимизации выхода ПГА. Определены оптимальные условия культивирования *P. helmanticensis* P1 на глицерине в присутствии додецилсульфата. Доказано, что при ферментации нестерильной среды, содержащей глицерин и 0,5 г/л SDS, не наблюдается рост посторонней микрофлоры и не уменьшается выход полигидроксиалканоата.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Установлено, что устойчивость *P. helmanticensis* P1 к додецилсульфату натрия обусловлена наличием трех защитных механизмов: образованием агрегатов, окруженных внеклеточным матриксом, который затрудняет диффузию SDS к клетке, изменением состава мембранных липидов и расщеплением додецилсульфата. Показано, что существующие данные об адаптации к SDS, полученные в первую очередь для синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*, также применимы и для *P. helmanticensis* P1. Доказано, что в присутствии SDS цис-изомеры ненасыщенных жирных кислот, находящихся преимущественно в мембранных структурах клеток, замещаются на насыщенные аналоги. При этом текучесть мембран, напрямую связанная с их растворимостью в гидрофобных ядрах мицелл ПАВ, значительно снижается. Таким образом, модификация мембранных липидов является важным механизмом адаптации к додецилсульфату натрия. Доказано, что добавление

глюкозы к среде для культивирования значительно снижает толерантность *P. helmanticensis* P1 к SDS. Исходя из имеющихся литературных данных можно сделать вывод, что это связано с угнетением синтеза сульфатаз. Глицерин, напротив, снижает устойчивость к додецилсульфату в меньшей мере. Показано, что среды, содержащие глицерин и SDS, можно использовать для получения ПГА с помощью *P. helmanticensis* P1. Установлено, что додецилсульфат натрия с концентрацией 0,5 г/л предотвращает рост посторонней микрофлоры при культивировании в нестерильных средах, содержащих глицерин.

Разработан процесс препаративного получения полигидроксиалканоата путем культивирования *P. helmanticensis* P1 в нестерильных SDS-содержащих средах. Показано, что этот процесс можно использовать для получения ПГА с характеристиками, сравнимыми с описанными в литературе аналогами.

Оптимизирована методика анализа мономеров ПГА в сухой массе клеток методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии. В частности, показано, что 2-гидроксibenзойная кислота может использоваться как внутренний стандарт, а дихлорметан обеспечивает высокую степень экстракции аналитов из образцов.

Предложена методика синтеза наночастиц ПГА, способных доставлять внутрь клетки некоторые гидрофобные лекарственные средства.

Исследования по диссертационной работе выполнялись в рамках государственного задания «Исследовать биотехнологический потенциал микроорганизмов, выделенных из микробных сообществ побочного сельскохозяйственного, пищевого и природного сырья в процессах его переработки и синтеза в целях создания ингредиентов функционального назначения, продуктов «зеленого бренда» и снижения экологической нагрузки и повышения устойчивости экосистем» (проект FGUS 2022-0003). Результаты исследований внедрены в работу федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

**Степень достоверности.** Обоснованность и достоверность результатов проведенных исследований базируется на анализе большого количества литературных источников. Большая часть приведенных в диссертации измерений и анализов проводились с использованием трех параллельных экспериментов. Статистическая значимость измеренных величин и построенных моделей оценена с использованием t-

критерия и F-критерия. Ключевые характеристики культур клеток (жирнокислотный состав липидов и содержание мономеров ПГА) рассматривались только в сочетании с их доверительными интервалами, рассчитанными для p-уровня значимости 0,95.

**Апробация работы.** Результаты исследований были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях: XIX International scientific and practical conference "Current trends of agricultural industry in global economy" (Кемерово, 2020), X, XI и XII Конгрессы молодых ученых НИУ ИТМО (Санкт-Петербург, 2021-2023), Международная научно-практическая конференция «Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности» (Казань, 2021), Международная конференция «Микробиология: вчера, сегодня, завтра» (Казань, 2021).

**Публикация результатов исследований.** Результаты исследований опубликованы в 2 статьях в журналах международной базы данных Web of Science и 1 статье из списка ВАК РФ. Опубликовано 1 патент РФ (№ 2802498).

**Личный вклад автора работы** заключается в проведении и обсуждении экспериментов. Кроме того, автор самостоятельно планировал работу, интерпретировал и представлял результаты исследования на конференциях. Опубликованные статьи были подготовлены при непосредственном участии автора.

**Объём и структура работы.** Диссертация изложена на 132 страницах, содержит 12 таблиц, 29 рисунков и 5 приложений. Работа содержит три содержательные части. В первой части приводится систематический обзор литературы, во второй описаны методики проведения экспериментов. В третьей части работы приводятся результаты и их обсуждение. Завершается работа списком цитируемой литературы (178 наименований, в том числе 178 на иностранном языке).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** описывается текущее состояние проблемы получения поли-3-гидроксиалканоатов в промышленном масштабе и перспективы, которые открывает культивирование продуцента ПГА в присутствии додецилсульфата натрия. Сформулированы цели и задачи исследования, описана методология работы, ее теоретическая и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту. Приведены данные об апробации и публикации результатов исследования.

**В первой главе (Литературный обзор)** приводится общая характеристика ПГА, их области применения и требования, предъявляемые к полимеру. Описаны возможные пути биосинтеза ПГА (*de novo* сборка из остатков ацетилкофермента А и неполное окисление остатков жирных кислот). Приведены данные об известных на сегодняшний день продуцентах ПГА, в том числе о детергент-устойчивых бактериях *Pseudomonas*. Проанализированы механизмы, обеспечивающие устойчивость бактерий *Pseudomonas* к линейным алкилсульфатам (в том числе к SDS). Эти механизмы разделены на три группы: образование окруженных защитным матриксом клеточных агрегатов, модификации мембранных структур и выработка расщепляющих алкилсульфаты ферментов. Обобщены имеющиеся литературные данные о регуляции механизмов устойчивости к SDS, их стимуляции и подавлении. Описаны используемые в работе методы оценки метаболического состояния бактериальных клеток в присутствии детергента (оценка кинетики роста, расщепления SDS и накопления ПГА, анализ жирнокислотного состава биомассы и изучение морфологии клеток методами флуоресцентной микроскопии). Проанализированы литературные данные об оптимизации условий культивирования бактерий *Pseudomonas* для получения ПГА. Рассмотрены наиболее часто используемые источники углерода: углеводы, триацилглицериды, карбоновые кислоты, глицерин, углеводороды и субстраты сложного состава. Приведены данные о влиянии источников азота, фосфора, аэрации и прочих параметров на выход ПГА. Проанализированы применяемые стратегии культивирования и известные на сегодняшний день неаксеничные процессы. Рассмотрены методы построения функции отклика (зависимости выхода ПГА от параметров культивирования). Описаны методики выделения и очистки полимера (лабораторный и промышленные), а также методы анализа ПГА в биомассе.

**Во второй главе (Экспериментальная часть)** перечислено используемое оборудование и реактивы, а также методики проведения экспериментов.

Выделение культуры бактерий *Pseudomonas*, устойчивой к SDS, проводилось путем культивирования образца суспензии загрязненной почвы на агаризованной среде, содержащей SDS в качестве единственного источника углерода. Полученную культуру несколько раз пересеивали до получения отдельных визуально схожих колоний.

Молекулярно-генетический анализ образца геномной ДНК, выделенной из полученной культуры клеток, осуществлялся путем секвенирования варибельного

участка V3 - V4 гена 16S рРНК. Культура может быть отнесена к виду *Pseudomonas helmanticensis*. Полученному штамму присвоено обозначение *Pseudomonas helmanticensis* P1 (депонирован в Сетевой биоресурсной коллекции в области генетических технологий для сельского хозяйства (RCAM) под номером RCAM05967).

*P. helmanticensis* P1 хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  в присутствии криопротектора (20% глицерина). Культивирование *P. helmanticensis* P1 проводилось в колбах Эрленмейера при  $28^{\circ}\text{C}$  в шейкере-инкубаторе.

Содержание SDS и активность эстераз в культуральной жидкости измерялись фотометрически с использованием стандартных методик.

Эпифлуоресцентная микроскопия культур клеток, окрашенных акридиновым оранжевым или нильским красным, проводилась на микроскопе Leica DM 1000 LED.

Жирнокислотный состав биомассы *P. helmanticensis* P1, полученной культивированием на различных субстратах, анализировали методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ/МС) с помощью стандартной методики. Методика включает экстракцию липидов из биомассы смесью метанола и хлороформа 1:2, их метилирование в 2% растворе  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в метаноле ( $65^{\circ}\text{C}$ , 2 ч) и анализ на газовом хроматографе Varian 450-GC, снабженном масс-спектрометрическим детектором Varian 240-MS (колонка WCOT fused silica 50m  $\times$  0,25mm ID Coating CP-Wax 58 (FFAP-CB Df=0,2)). Объем вводимого в колонку образца составлял 1 мкл, газ-носитель – гелий, скорость потока 1 мл/мин. Хроматографическое разделение начинали при постоянной температуре (3 мин,  $50^{\circ}\text{C}$ ), затем температуру колонки линейно повышали до  $250^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут. Завершали разделение при постоянной температуре ( $250^{\circ}\text{C}$ ) в течение 40 минут.

Методика анализа мономеров ПГА в биомассе была оптимизирована: подобран наилучший экстрагент, температура и время проведения реакции. Оптимизированная методика состоит из стадий экстракции ПГА из сухой биомассы с одновременным метилированием мономеров в кислой среде, извлечения метиловых эфиров гидроксигирных кислот в органическую фазу и их анализа методом ГХ/МС (применялось оборудование, указанное выше для анализа жирных кислот). Элюирование начинали при постоянной температуре  $100^{\circ}\text{C}$  (5 мин), затем температуру линейно повышали до  $200^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин, выдерживали постоянной  $15$  мин, линейно

повышали до 250°C в течение 5 мин, и завершали разделение при постоянной температуре 250°C (15 мин).

Параметры культивирования *P. helmanticensis* P1 в нестерильной среде, содержащей глицерин и SDS, были оптимизированы путем проведения серии экспериментов по центральному композиционному ротатабельному плану.

Метабаркодинговый анализ культуры, полученной культивированием *P. helmanticensis* P1 в нестерильной среде, содержащей глицерин и SDS, проводился на основе ампликона фрагмента V3 – V4 гена 16S рПНК на генетическом анализаторе MiSeq. Ампликоны были проанализированы с помощью программы «Mothur v.1.47.0» по стандартной рекомендованной схеме MiSeq SOP.

Молекулярно-массовое распределение выделенного с помощью стандартной методики образца ПГА изучено методом эксклюзионной хроматографии на приборе Shimadzu Prominence.

Полученный образец ПГА был протестирован на образование наночастиц с модельным лекарственным веществом (пальмитатом ретинола) в присутствии Tween 80. Размер частиц был оценен методом динамического рассеяния света. Токсичность наночастиц и их трансфекция были проанализированы с помощью клеточной линии ВНК-21.

**В третьей главе** приводятся результаты проведенных экспериментов и их обсуждение.

#### **Адаптация *P. helmanticensis* P1 к различным средам**

Исследование адаптации *P. helmanticensis* P1 к различным средам, в том числе содержащим SDS, позволило показать наличие у изучаемой культуры всех описанных в литературе механизмов устойчивости к линейным алкилсульфатам. Результаты проведенных экспериментов приведены в Таблице 1.

Общее содержание жирных кислот (ЖК) характеризует степень конверсии субстрата в мембранные липиды и свободные ЖК. Соотношение между содержанием ненасыщенных и насыщенных ЖК может считаться оценкой текучести (а значит и проницаемости) мембран клетки. Выходы биомассы и ПГА, в свою очередь, характеризуют общую эффективность адаптации *P. helmanticensis* P1 к используемым средам. Морфология культур изучалась методом эпифлуоресцентной микроскопии. Окрашивание акридиновым оранжевым (связывается с нуклеиновыми кислотами)

использовали для поиска клеточных агрегатов (Рисунок 1). Окрашивание нильским красным применялось для визуализации эндогенных липидов (Рисунок 2). Флуоресценция клеток в присутствии нильского красного свидетельствовала о наличии немембранных липидов (например, ПГА).

Таблица 1. Отдельные физиологические и кинетические параметры культур *P. helmanticensis* P1, выращенных на разных средах

| Субстрат               | 5 г/л<br>SDS | 10 г/л<br>глюкоза | 10 г/л<br>глюкоза +<br>0,05 г/л SDS | 10 г/л<br>глицерин | 10 г/л<br>глицерин +<br>0,5 г/л SDS |
|------------------------|--------------|-------------------|-------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| Анализ жирных кислот   |              |                   |                                     |                    |                                     |
| Общее содержание, %    | 6,0          | 1,2               | 15,6                                | 5,2                | 6,0                                 |
| Ненасыщ/насыщ          | 0,10         | 1,68              | 1,30                                | 1,32               | 1,31                                |
| Кинетические параметры |              |                   |                                     |                    |                                     |
| Выход биомассы, г/л    | 0,15         | 2,7               | 2,1                                 | 2,7                | 2,5                                 |
| Выход ПГА, мг/л        | 12           | 54                | 42                                  | 680                | 630                                 |
| Морфология культур     |              |                   |                                     |                    |                                     |
| Агрегаты               | +            | -                 | +                                   | -                  | +                                   |
| Немембранные липиды    | +            | -                 | +                                   | +                  | +                                   |

Показано, что при воздействии SDS *P. helmanticensis* P1 образует агрегаты, окруженные полисахаридным матриксом, который содержит внеклеточные нуклеиновые кислоты. Можно также сделать вывод о выработке эндогенных сульфатаз *P. helmanticensis* P1: при добавлении додецилсульфата в среду для культивирования в ряде случаев происходит его полное расщепление. Соотношение между концентрацией ненасыщенных и насыщенных жирных кислот в биомассе не всегда напрямую коррелирует с наличием в среде SDS. Вероятно, часть ЖК находится в клетке в свободной форме, и соотношение концентраций ненасыщенных и насыщенных кислот не всегда соотносится только с текучестью мембранных липидов. Однако большая разница между данными, полученными для культивирования на 0,5% SDS и, например, культивированием на 1% глюкозе, позволяет сделать вывод о значительном уменьшении текучести мембранных липидов в присутствии нескольких г/л додецилсульфата.

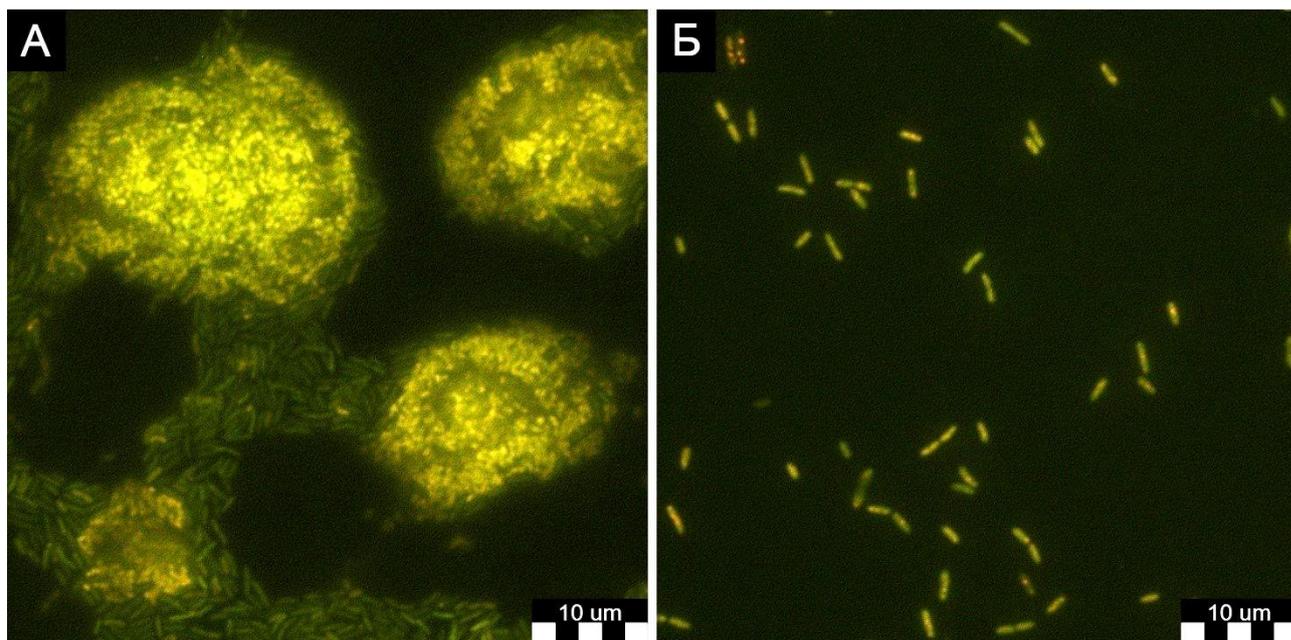


Рисунок 1. Эпифлуоресцентные микрофотографии окрашенных акридиновым оранжевым клеток *P. helmanticensis* P1 в агрегированной (А) и свободной (Б) форме

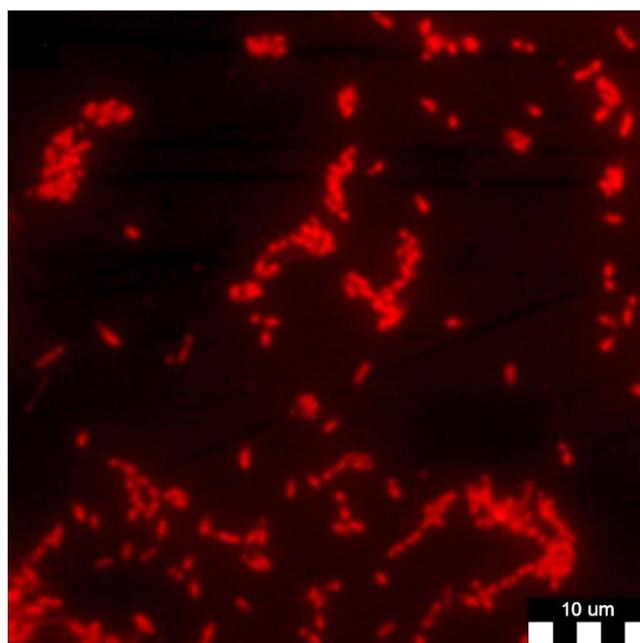


Рисунок 2. Эпифлуоресцентная микрофотография окрашенных нильским красным клеток *P. helmanticensis* P1, которые продуцируют немембранные липиды

Культивирование *P. helmanticensis* P1 на 0,5% SDS и среде, содержащей эмульсию растительного масла (10 г/л) в 0,5% SDS, не позволяет получить более нескольких десятых г/л сухой биомассы. Содержание ПГА при этом также не превышает 10%. Следовательно, эти субстраты не рационально использовать для препаративного получения ПГА.

Культивирование на средах, содержащих 1% глюкозы, также не позволяет добиться приемлемой степени конверсии субстрата в ПГА (во всех случаях она не

превышала 1%). Кроме того, добавление SDS в содержащую глюкозу среду для культивирования вызывает ингибирование роста *P. helmanticensis* P1. Лишь при концентрации додецилсульфата 0,05 г/л и менее количество биомассы (2,1 г/л) становится близким к значениям, полученным при культивировании на среде, содержащей 1% глюкозы без добавления SDS (2,7 г/л). Согласно литературным данным, простые углеводы угнетают синтез алкилсульфатаз, снижая устойчивость бактерий *Pseudomonas* к SDS. Подавление устойчивости *P. helmanticensis* P1 к додецилсульфату, а также низкое содержание ПГА в биомассе, не позволяет использовать содержащие SDS и глюкозу среды для получения полимера.

В случае сред, содержащих SDS и глицерин, подавление устойчивости к детергенту выражено в гораздо меньшей степени: при культивировании на 1% глицерине можно добавлять до 0,5 г/л додецилсульфата без значимого ингибирования роста *P. helmanticensis* P1. Кроме того, 0,5 г/л SDS подавляют рост посторонних микроорганизмов, что позволяет использовать содержащие глицерин среды без предварительной стерилизации. Кроме того, обеспечивается высокая (более 6%) степень конверсии субстрата в ПГА. Таким образом, среды, содержащие 0,5 г/л SDS и глицерин, являются наиболее подходящими для препаративного получения ПГА в неаксеничных условиях.

### **Оптимизация методики количественного определения мономеров ПГА**

#### **Подбор экстрагента**

В качестве экстрагентов были апробированы *n*-гексан, хлороформ и дихлорметан. Метилирование образца чистого полимера, выделенного из биомассы, проводилось в присутствии внутреннего стандарта (2-гидроксибензойной кислоты), метилирующей смеси (15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метаноле) и экстрагента при 100°C в течение 4 часов. Затем к реакционной смеси добавляли 2 мл воды, органический слой отбирали и анализировали методом ГХ/МС. Результаты анализа полученных экстрактов приведены в таблице 2. Наилучшую степень конверсии полимера в аналиты (смесь метиловых эфиров гидроксижирных кислот, МЭГЖК) обеспечивает дихлорметан: по-видимому, это связано с его высокой полярностью.

#### **Оптимизация температуры проведения реакции**

Диапазон изучаемых температур составлял от 35°C до 120°C. Для оценки степени конверсии ПГА в МЭГЖК реакцию проводили с чистым образцом полимера в присутствии дихлорметана и внутреннего стандарта. Время реакции составляло 4 часа.

Результаты экспериментов представлены на Рисунке 3 А. Было подтверждено, что оптимальная температура проведения реакции составляет 100°C. Снижение конверсии при более низких температурах объясняется меньшей скоростью переэтерификации, а при более высоких – протеканием побочных процессов.

Таблица 2. Степень конверсии ПГА в МЭГЖК при использовании различных экстрагентов

| Экстрагент       | Конверсия полимера в анализируемую форму, % |
|------------------|---|
| <i>n</i> -гексан | 5   |
| хлороформ        | 19  |
| дихлорметан      | 27  |

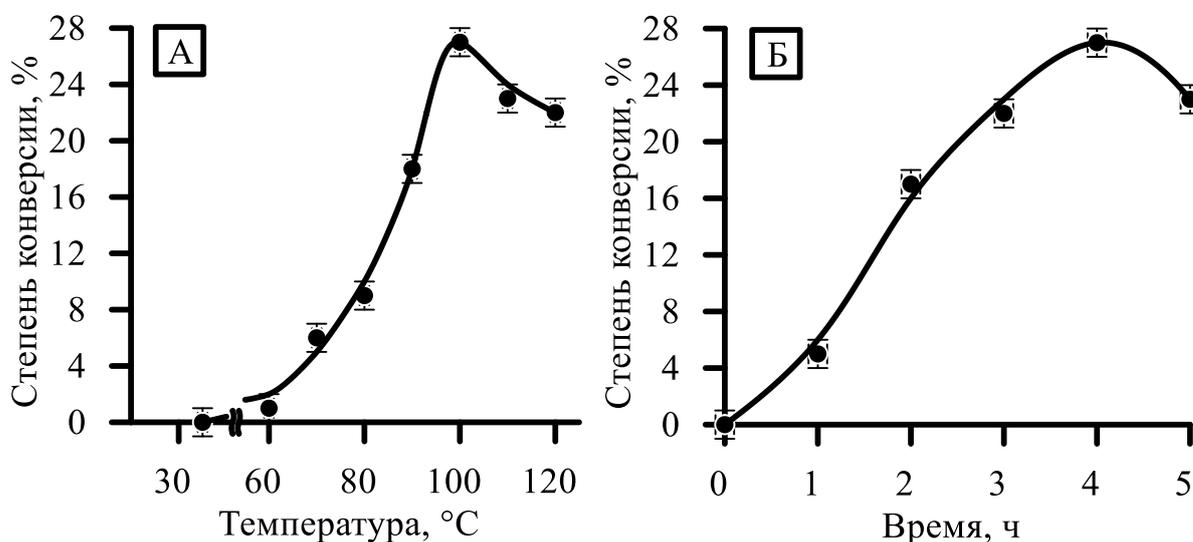


Рисунок 3 (А, Б). Степень конверсии мономеров ПГА в МЭГЖК при различных температурах (А, экстрагент – дихлорметан, время реакции 4 ч) и кинетика метилирования (Б, экстрагент – дихлорметан, температура 100°C)

### **Исследование кинетики метилирования остатков гидроксигирных кислот (оптимизация времени реакции)**

Зависимость степени конверсии ПГА в МЭГЖК изучали с помощью серии экспериментов, в которых использовался образец чистого полимера. В качестве растворителя использовался дихлорметан, температура составляла 100°C. Полученная кинетическая кривая приведена на Рисунке 3 Б. Доля МЭГЖК в реакционной смеси достигает максимума после 4 часов нагревания. Затем она снижается, по-видимому, также из-за побочных процессов.

Таким образом, оптимизированная методика включает в себя нагревание реакционной смеси до 100°C в течение 4 часов в присутствии дихлорметана.

## **Культивирование в неаксеничных условиях**

### **Видовой состав культуры**

Согласно данным проведенного молекулярно-генетического анализа 16S рНК, культура, выращенная на нестерильной среде, содержащей глицерин и 0,5 г/л SDS, состоит преимущественно из клеток *P. helmanticensis* P1 (их доля составляет примерно 98%). Находящийся в среде SDS препятствует росту посторонних микроорганизмов в течение лаг-фазы. После расщепления SDS на экспоненциальной фазе роста *P. helmanticensis* P1 роль антимикробного агента, по всей видимости, играют синтезируемые бактериями *Pseudomonas* биогенные ПАВ. Известно, что эти ПАВ подавляют рост ряда микроорганизмов. Таким образом, наличие додецилсульфата (0,5 г/л) и поверхностно-активных метаболитов продуцента обеспечивают возможность культивирования в неаксеничных условиях со значительно сниженным риском контаминации.

### **Оптимизация условий культивирования *P. helmanticensis* P1 на средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия**

Для определения оптимальных концентраций глицерина и источника азота (смесь  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1:1) проведена серия экспериментов по центральному композиционному ротатабельному плану. Концентрация SDS во всех культивированиях составляла 0,5 г/л, и среды не подвергались предварительной стерилизации. В качестве факторов оптимизации использовались концентрация глицерина (C) и отношение концентраций глицерина и источника азота (C/N).

Показано, что наилучшим образом имеющиеся данные описываются с помощью модели (1), не содержащей остатка и коэффициента взаимодействия.

$$q_{\text{РНА}}(\%) = 0,341 \cdot C + 0,781 \cdot C/N - 0,021 \cdot C^2 - 0,028 \cdot (C/N)^2, \quad (1)$$

Где  $q_{\text{РНА}}$  – степень конверсии глицерина в ПГА;

C – концентрация глицерина (г/л);

C/N – отношение концентраций глицерина и источника азота.

Контурная карта модели (1) представлена на Рисунке 4. Рассчитанное значение F-критерия (2,2) ниже табличного (6,3) для уровня значимости 0,05. Таким образом, представленная модель адекватно описывает наблюдаемые экспериментальные данные ( $R^2 = 0,99$ ). Согласно приведенной модели (1), наибольшая степень конверсии субстрата в ПГА (6,9 %) должна наблюдаться при концентрациях глицерина 8,1 г/л и источника

азота 0,58 г/л ( $C/N = 13,7$ ). Содержание додецилсульфата натрия при этом составляет 0,5 г/л. Действительно, в оптимальных условиях *P. helmanticensis* P1 конвертирует 7% глицерина в ПГА.

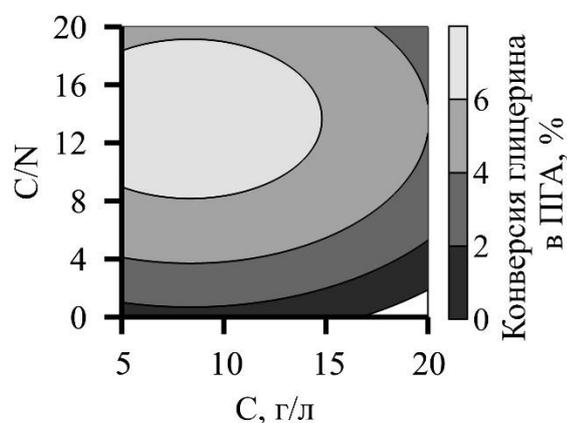


Рисунок 4. Зависимость степени конверсии глицерина в ПГА от концентрации глицерина (С) и соотношения C/N при культивировании *P. helmanticensis* P1 на нестерильной среде, содержащей 0,5 г/л додецилсульфата натрия

#### **Свойства полимера, полученного в оптимизированных условиях**

ПГА, продуцируемый *P. helmanticensis* P1 в оптимизированных условиях (8,1 г/л глицерина, 0,58 г/л источника азота, 0,5 г/л SDS), состоит из остатков гидроксигексаноата (7%), гидроксооктаноата (46%), гидроксидеканоата (25%) и гидроксидодеканоата (22%). Средневесовая и среднечисловая молекулярные массы полученного образца ПГА составляют 100 кДа и 68 кДа соответственно. Рассчитанные молекулярные массы и коэффициент полидисперсности (1,5) находятся в пределах значений, описанных для бактерий *Pseudomonas* в литературе.

#### **Свойства наночастиц ПГА, стабилизированных Tween 80**

Полученные в присутствии 1% Tween 80 наночастицы ПГА имели средний размер  $200 \pm 100$  нм. Показано, что наночастицы способны растворять до 20 мг модельного лекарственного вещества (пальмитата ретинола) в 1 г дисперсной фазы. Установлено, что полученные наночастицы хорошо проникают в клетки ВНК-21 (доля трансфицированных клеток в конце инкубирования близка к 100%) и нетоксичны во всем диапазоне исследуемых концентраций (3,125 – 400 мкг/мл).

Основные стадии процесса получения ПГА с помощью *P. helmanticensis* P1 на нестерильных SDS-содержащих средах приведены на Рисунке 5.

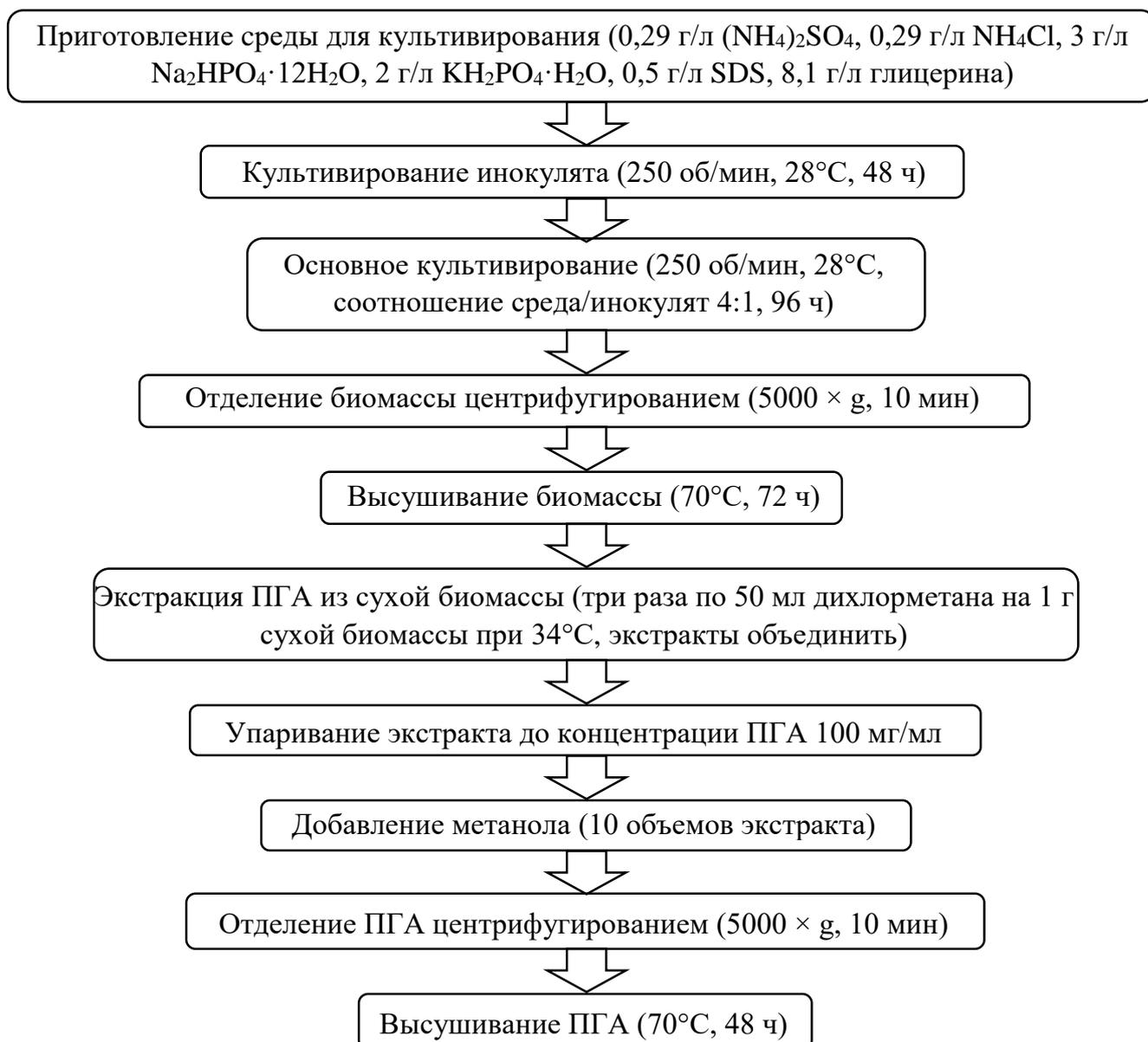


Рисунок 5. Процесс биосинтетического получения ПГА с помощью детергент-устойчивого штамма *P. helmanticensis* P1

### Заключение

В ходе выполнения данной диссертационной работы были получены следующие результаты:

1. Из образца загрязненной почвы впервые выделена устойчивая к додецилсульфату натрия (до 5 г/л) культура *P. helmanticensis* P1, обладающая биотехнологическим потенциалом.
2. Показано, что *P. helmanticensis* P1 адаптируется к присутствию додецилсульфата натрия подобно другим бактериям *Pseudomonas*. Эта устойчивость обусловлена тремя различными механизмами: образованием агрегатов, окруженных защитным матриксом,

модификацией мембранных липидов и продукцией эндогенных сульфатаз, расщепляющих SDS.

3. Наличие легко усваиваемого субстрата (глюкозы) в среде подавляет устойчивость *P. helmanticensis* P1 к додецилсульфату натрия. Это подавление характерно для других бактерий *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*) и объясняется снижением экспрессии сульфатаз в присутствии углеводов. Максимальная концентрация SDS, при которой не происходит ингибирования роста *P. helmanticensis* P1 в присутствии глюкозы, составляет 0,05 г/л.

4. Глицерин подавляет устойчивость *P. helmanticensis* P1 к додецилсульфату натрия в меньшей степени: SDS не ингибирует рост культуры при концентрации 0,5 г/л. Додецилсульфат натрия в сочетании с собственными биогенными ПАВ *P. Helmanticensis* P1 предотвращает рост посторонней микрофлоры, что позволяет проводить культивирование в неаксеничных условиях.

5. В оптимизированных условиях (8,1 г/л глицерина, 0,58 г/л источника азота, 0,5 г/л SDS, 96 ч культивирования) *P. helmanticensis* P1 конвертирует 7% глицерина в полигидроксиалканоат со средней длиной алкильных заместителей мономерных звеньев. Продуцируемый полимер обладает средневесовой молекулярной массой 100 кДа, узким молекулярно-массовым распределением (коэффициент полидисперсности 1,5) и состоит преимущественно из гидроксидекааноата, гидроксидекааноата и гидроксидодекааноата.

#### **Публикации по теме диссертационной работы**

В международных изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science:

1. **Zubkov, I.N.** Adaptation of *Pseudomonas helmanticensis* to fat hydrolysates and SDS: fatty acid response and aggregate formation / **I.N. Zubkov**, A.P. Nepomnyshchiy, V.D. Kondratyev, P.N. Sorokoumov, K.V. Sivak, E.S. Ramsay, S.M. Shishlyannikov // *Journal of Microbiology*. – 2021. – V. 59, N. 12. – P. 1104–1111.

2. Kondratyev, V.D. Quantitative analysis of medium-chain polyhydroxyalkanoates in bacterial cells via gas chromatography-mass spectrometry: classical method revision and optimization / V.D. Kondratyev, D.I. Goryacheva, A.P. Nepomnyaschiy, **I.N. Zubkov**, S.M. Shishlyannikov, P.N. Sorokoumov // *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. – 2022. – V. 27, N. 1. – P. 32-42.

Публикации в изданиях, входящих в список ВАК РФ:

1. **Зубков И.Н.** Получение полигидроксиалканоата с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия / **И.Н. Зубков**, Ю.С. Букин, П.Н. Сорокоумов, С.М. Шишлянников // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2022. – Т. 12, N. 3. – С. 479–484.

Патенты:

1. Патент РФ № 2802498, МПК C12N 1/20 (2006.01), C12P 7/62 (2006.01), C12R 1/38 (2006.01). Продуцент полигидроксиалканоата *Pseudomonas helmanticensis*, устойчивый к додецилсульфату натрия : заявл. 09.09.2022 : опубл. 29.08.2023 / **Зубков И.Н.**, Шишлянников С.М., Непомнящий А.П., Шарова Н.Ю. ; заявитель ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Публикации в других изданиях:

1. **Zubkov I.N.** Soil SDS-degrading bacterium *Pseudomonas helmanticensis* as a potential producer of polyhydroxyalkanoates // Proceedings of XIX International scientific and practical conference "Current trends of agricultural industry in global economy", Kemerovo, Russia. - 2021, P. 182-189.

2. **Зубков И.Н.** Агрегатообразование SDS-деградирующего штамма *Pseudomonas helmanticensis* как ключевой механизм устойчивости к детергентам // Тезисы юбилейной конференции «Микробиология: вчера, сегодня, завтра». – Казань, 2021. - С. 40.

3. **Зубков И.Н.** Деграция додецилсульфата натрия изолятом *Pseudomonas helmanticensis* в содержащих углеводы средах // Тезисы конференции «Инновационные решения актуальных вопросов биобезопасности». - Казань, 2021. – С. 28.

4. **Зубков И.Н.** Жирнокислотный состав *Pseudomonas helmanticensis* при культивировании на гидролизатах жиров и детергент-содержащих средах // Сборник тезисов X Конгресса молодых ученых НИУ ИТМО. Электронное издание. – СПб, 2021. - <https://kmu.itmo.ru/digests/article/5893>.

5. **Зубков И.Н.** Адаптация изолята *Pseudomonas helmanticensis* к средам, содержащим глицерин и додецилсульфат натрия // Сборник тезисов XI Конгресса молодых ученых НИУ ИТМО. Электронное издание. – СПб, 2022. - <https://kmu.itmo.ru/digests/article/7548>.

6. **Зубков И.Н.** Оптимизация процесса неаксеничной биоконверсии глицерина в полигидроксиалканоаты изолятом *Pseudomonas helmanticensis* в присутствии

додецилсульфата натрия // Сборник тезисов XI Конгресса молодых ученых НИУ ИТМО. Электронное издание. – СПб, 2022. - <https://kmu.itmo.ru/digests/article/7549>.

7. **Зубков И.Н.** Получение полигидроксиалканоатов из гидролизата отработанного масла с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* // Сборник тезисов XV Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы и современные решения в области пищевых систем». - 2022. - С. 128-131.

8. **Зубков И.Н.** Стабилизированные Tween 80 наночастицы полигидроксиаланоата как платформа для доставки лекарственных препаратов // Сборник тезисов XII Конгресса молодых ученых НИУ ИТМО. Электронное издание. – СПб, 2023. - <https://kmu.itmo.ru/digests/article/9949>.