








МРНТИ 34.27.19

<https://doi.org/10.26577/EJE.2024.v78.i1.012>

Л.В. Игнатова , Е.В. Бражникова , А.А. Омирбекова ,
С.Н. Омарова , Н.К. Туланова , Р.Ч. Шамсутдинов* ,
Ж.К. Уразова 

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
*e-mail: ruslanshamsutdinov13@gmail.com

ПОДБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ СИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТА

В связи с наблюдаемой тенденцией роста производства пластиковой продукции остро стоит вопрос о замене пластика на нефтехимической основе на биоразлагаемые полимеры микробного происхождения. Наиболее распространенными биополимерами микробного происхождения являются полигидроксиалканоаты. При проведении скрининга природных штаммов почвенных бактерий по способности синтезировать полигидроксибутират (ПГБ) в качестве наиболее продуктивного отобран штамм *Pseudomonas flavescens* Д5, обеспечивающий выход биомассы и полиэфира $9,15 \pm 0,37$ г/л и $1,61 \pm 0,06$ г/л, соответственно. Проведен сравнительный анализ способности отобранного штамма накапливать ПГБ на различных по составу питательных средах: MSM, глюкозо-пептонной, синтетической, модифицированной MSM, ацетатной, минимальной, лизин-ацетатной, среды Тарана и MSM с мочевиной. Максимальное количество ПГБ наблюдалось на среде MSM. Наиболее благоприятными источниками углерода и азота для увеличения выхода ПГБ являются глюкоза в концентрации 5% и нитрат аммония. Проведена адаптация штамма *Ps. flavescens* Д5 к побочному продукту пищевого производства – глицерину. Показано, что ферментация штамма-продуцента ПГБ на среде с использованием глицерина в течение 5 циклов культивирования увеличивает выход продукта в 1,3 раза, одновременно снижая затраты на источник углерода.

Ключевые слова: микробные полимеры, источники углерода, источники азота, оптимизация питательной среды, полигидроксиалканоат.

L.V. Ignatova, E.V. Brazhnikova, A.A. Omirbekova,
S.N. Omarova, N.K. Tulanova, R.Ch. Shamsutdinov*, Zh.K. Urazova
Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
*e-mail: ruslanshamsutdinov13@gmail.com

Selection of nutrient medium and conditions for cultivating microorganisms for the synthesis of polyhydroxyalkanoate

In connection with the observed growth trend in the production of plastic products, the issue of replacing petrochemical-based plastic with biodegradable polymers of microbial origin is urgent. The most common biopolymers of microbial origin are polyhydroxyalkanoates. When screening natural strains of soil bacteria for their ability to synthesize polyhydroxybutyrate (PHB), the strain *Pseudomonas flavescens* D5 was selected as the most productive, providing biomass and polyester yields of 9.15 ± 0.37 g/l and 1.61 ± 0.06 g/l, respectively. A comparative analysis of the ability of the selected strain to accumulate PHB on nutrient media of various compositions was carried out: MSM, glucose-peptone, synthetic, modified MSM, acetate, minimal, lysine-acetate, Taran's medium and MSM with urea. The maximum amount of PHB was observed in MSM medium. The most favorable sources of carbon and nitrogen for increasing the yield of PHB are glucose at a concentration of 5% and ammonium nitrate. Adaptation of the *Ps. flavescens* D5 strain was carried out to a by-product of food production – glycerol. It has been shown that fermentation of the PHB producer strain on a medium using glycerol for 5 cultivation cycles increases the product yield by 1.3 times, while simultaneously reducing the cost of the carbon source.

Key words: microbial polymers, carbon sources, nitrogen sources, optimization of nutrient medium, polyhydroxyalkanoate.

Л.В. Игнатова, Е.В. Бражникова, А.А. Омирбекова,
С.Н. Омарова, Н.К. Туланова, Р.Ч. Шамсутдинов*, Ж.К. Уразова
Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Қазақстан, Алматы қ.
*e-mail: ruslanshamsutdinov13@gmail.com

Қоректік ортаны таңдау және полигидроксиалканоат синтезі үшін микроорганизмдерді өсіру жағдайлары

Пластмасса бұйымдарын өндіруде байқалған өсу тенденциясына байланысты мұнай-химия негізіндегі пластмассаны микробтық текті биологиялық ыдырайтын полимерлермен ауыстыру мәселесі өзекті болып табылады. Микробтық текті ең көп таралған биополимерлер полигидроксиалканоаттар болып табылады. Топырақ бактерияларының табиғи штамдарын олардың полигидроксибутират (ПГБ) синтездеу қабілетіне скрининг кезінде *Pseudomonas flavescens* D5 штаммы сәйкесінше $9,15 \pm 0,37$ г/л және $1,61 \pm 0,06$ г/л биомасса және полиэфир шығымдылығын қамтамасыз ететін ең өнімді болып таңдалды. Таңдалған штаммның әртүрлі құрамды қоректік орталарда: МСМ, глюкоза-пептон, синтетикалық, модификацияланған МСМ, ацетат, минималды, лизин-ацетат, Таран ортасы және несепнәрмен МСМ қоректік ортада жинақтау қабілетіне салыстырмалы талдау жүргізілді. ПГБ максималды мөлшері MSM ортасында байқалды. ПГБ шығымдылығын арттыру үшін көміртегі мен азоттың ең қолайлы көздері 5% концентрациядағы глюкоза және аммоний нитраты болып табылады. Ps штаммының бейімделуі жүргізілді. *flavescens* D5 тағам өндірісінің жанама өнімі – глицеринге дейін. ПГБ продуцентінің штаммының глицеринді пайдаланатын ортада 5 культивация циклі үшін ашытуы бір мезгілде көміртегі көзінің құнын төмендеті отырып, өнім шығымын 1,3 есеге арттыратыны көрсетілген.

Түйін сөздер: микробтық полимерлер, көміртегі көздері, азот көздері, қоректік ортаны оңтайландыру, полигидроксиалканоат.

Введение

Повышение численности населения и массовая интенсификация производства продуктов потребления, а также увеличение производственных отходов привели к накоплению большого объема загрязнителей в окружающей среде. На сегодняшний день особенно проблематичными в контексте загрязнения экологии являются неразлагающиеся и слабо разлагающиеся пластиковые отходы. В 2021 году мировое производство пластиковой продукции достигло 390,7 млн тонн. Для сравнения, в 1976 году мировое производство пластика насчитывало около 50 млн тонн. Пластиковое загрязнение признается серьезной антропогенной проблемой. Постоянное увеличение производства пластиковой продукции ведет к ухудшению экологического состояния. Одним из очевидных негативных последствий является нарушение структуры и функций экосистем. Давно доказано, что избыток пластика обуславливает серьезные экологические катастрофы с растущей угрозой биоразнообразию и экономике [1].

В связи с наблюдаемой тенденцией роста производства пластиковой продукции остро стоит вопрос о замене пластика на нефтехимической основе на биоразлагаемые полимеры микробного происхождения [2]. Наиболее распространенными биополимерами микробного

происхождения являются полигидроксиалканоаты. Полигидроксиалканоаты (ПГА) – класс полиэфиров, синтезирующийся различными микроорганизмами в качестве запасного источника углерода в клетках в условиях с повышенным содержанием углерода и пониженным содержанием питательных веществ. Мономерные звенья ПГА классифицируются на две группы в зависимости от количества атомов углерода в цепи: с короткой и средней длиной цепи. Основным представителем данного класса биополимеров является поли-3-гидроксибутират (ПГБ), широко используемый для производства биоразлагающегося пластика. ПГБ имеет ряд преимуществ в сравнении с полимерами на нефтехимической основе. Барьерная проницаемость ПГБ превосходит полимеры на основе полиэтилена и полипропилена, в сравнении с полиэтилентерефталатом и поливинилхлоридом [3]. В естественной среде процесс биодеградации происходит в результате ферментации многими видами бактерий, грибов и других редуцентов и биодеструкторов [4]. Дегидрогеназы данных микроорганизмов способны разлагать ПГБ до олигомерных, димерных и мономерных остатков с последующим разложением до 3-гидроксимасляной кислоты [5].

Однако, на сегодняшний день биополимерные материалы на основе ПГБ не получили широкого распространения. Основным лимитирующим фактором промышленного синтеза

биополимеров микробного происхождения является дороговизна их производства. Активно разрабатываются стратегии применения новых доступных источников углерода. Для производства ПГБ используется глюкоза и другие сахара. Некоторые виды бактерий способны использовать отходы различных производств в качестве источника углерода [6]. Это позволяет сократить затраты на производство ПГБ, делая процесс производства биополимера более доступным, что в свою очередь способствует снижению степени загрязнения окружающей среды.

Материалы и методы

Объектами исследований были 3 штамма почвенных бактерий *Stenotrophomonas maltophilia* A1, *Bacillus megaterium* A2 и *Pseudomonas flavescens* Д5, ранее выделенные из темно-каштановой почвы города Алматы.

Методы исследований. Изучение влияния состава питательной среды на продукцию ПГБ

На этапе подбора питательных сред для культивирования бактерий-продуцентов ПГБ, использовали среды следующего состава (г/л) [8-13]:

1. минерально-солевая среда (MSM) (глюкоза 10,0; NH_4NO_3 1,0; K_2HPO_4 1,73; KH_2PO_4 0,68; MgSO_4 0,1; NaCl 4,0; FeSO_4 0,03; CaCl_2 0,02);

2. глюкозо-пептонная (глюкоза 1,0; пептон 0,25; дрожжевой экстракт 0,25; KH_2PO_4 0,05; NaCl 0,01; MgSO_4 0,02);

3. синтетическая среда (KH_2PO_4 – 0,0085, K_2HPO_4 – 0,0218, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0221, NH_4Cl – 0,19, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0364, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0225, FeCl_3 – 0,0025, в качестве источника углерода добавлялась сахароза – 1,0);

4. модифицированная минерально-солевая среда (сахароза – 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0, KH_2PO_4 – 2,0, Na_2HPO_4 – 1,8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5, FeSO_4 – 2,0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1);

5. ацетатная среда (CH_3COONa – 13,6, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,45, KH_2PO_4 – 1,31, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,68, FeSO_4 – 2,0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1);

6. минимальная среда (глюкоза – 30,0, NH_4Cl – 0,5, KH_2PO_4 – 2,8, Na_2HPO_4 – 3,32, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, ZnSO_4 – 1,3, FeSO_4 – 0,2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,2);

7. лизин-ацетатная среда (лизин – 3,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,02, CH_3COONa – 4,0, дрожжевой экстракт – 2,0, KH_2PO_4 – 0,5, K_2HPO_4 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,053, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,0012);

8. среда Тарана (глюкоза – 2,0, NH_4Cl – 0,2, K_2HPO_4 – 0,004);

9. MSM с мочевиной в качестве источника азота и дополнительного источника углерода. Среда содержала (г/л): мочевины – 1,0, дрожжевой экстракт – 0,16, глюкозу – 40,0, KH_2PO_4 – 1,52, Na_2HPO_4 – 4,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,52, CaCl_2 – 0,02, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,02, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,13.

Культуры выращивали в течение 2-х суток при 150 об/мин и 28°C.

Выделение полигидроксибутирата

Полиэфир выделяли из клеток бактерий с использованием гипохлорита натрия. Клетки микроорганизмов отделяли от культуральной жидкости центрифугированием в течение 15 минут при 6000 ×g. Экстракцию ПГБ из бактериальных клеток проводили путем обработки биомассы смесью горячего хлороформа и гипохлорита в соотношении 1:1. Затем биомассу, смешанную с детергентом, помещали в термостат на 60 минут при 30°C. Полученную смесь снова центрифугировали в течение 10 минут при 6000 ×g с получением трех фаз. Верхнюю и среднюю фазы аккуратно удаляли дозатором. ПГБ осаждали смесью ацетона и этанола в соотношении 1:1 при 40°C в течение 24 часов.

Вес биомассы определяли по формуле (1):

$$M = \frac{(A-B) \times 100}{V}, \quad (1)$$

где M – вес биомассы в г/л, A – вес бумажного фильтра с осадком в г, B – вес бумажного фильтра без осадка в г, V – объём культуральной жидкости, взятый для центрифугирования в л.

Подбор оптимальных источников углерода и азота

В качестве фоновой среды была взята среда MSM. В целях оценки влияния источников углерода и азота на накопление полиэфира в клетках бактерий изменяли компоненты среды и подбирали их оптимальные значения, при которых количество накопленного штаммом-продуцентом ПГБ было наибольшим:

1. для оценки влияния углерода на производство ПГБ использовали 3 источника углерода в концентрации 1, 3 и 5%: глюкозу, сахарозу, ацетат натрия;

2. для оценки влияния источника азота на накопление ПГБ подбирали 6 источников азота: пептон, дрожжевой экстракт, мочевины, NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

Исследование способности природных штаммов почвенных микроорганизмов синтезировать ПГБ на среде с глицерином. Культуру выращивали в ферментационных колбах объемом 250 мл на солевой среде Шлегеля следующего состава (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 – 1,0. Микроэлементы добавляли в среду по прописи Хоагганда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит (г/л): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; H_3BO_3 – 0,228; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; NiCl – 0,008. В качестве единственного источника углерода использовали глицерин в концентрации 15 г/л. В качестве основного источника азота добавляли мочевины в концентрации 0,7 г/л [14].

Для адаптации штамма к глицерину делали его пересев в течение 5 циклов. Бактерии культивировали в течение 48 часов. Наличие бактериального роста определяли измерением оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 460 нм и высевом на МПА с последующим подсчетом колоний.

Сбор и статистическая обработка данных

Достоверность полученных результатов проверяли с помощью статистических математических методов и расчетных формул. Рассчитывали средние арифметические значения и средние квадратичные отклонения

Результаты и их обсуждение

Продукция ПГБ в зависимости от состава питательной среды

ПГБ может быть синтезирован в качестве запасного питательного вещества многими микроорганизмами, в том числе почвенными бактериями. Молекулы ПГБ накапливаются внутри клеток бактерий в условиях избытка углеродного субстрата и ограничения питания по азоту [9]. Следовательно, условия роста играют первостепенную роль в достижении высокой продукции ПГБ.

Для изучения влияния состава питательной среды на выход ПГБ определяли накопление биомассы, количество образуемого полиэфира, количество утилизированного субстрата и рассчитывали биотехнологический показатель эффективности процесса – экономический коэффициент. Ферментацию проводили в течение 48 часов при температуре 28°C и начальном значении pH среды 7,5.

На первом этапе была проанализирована способность к продукции внутриклеточного полиэфира тремя штаммами почвенных бактерий *Stenotrophomonas maltophilia* A1, *Bacillus megaterium* A2 и *Pseudomonas flavescens* Д5. По результатам, приведенным в таблице 1, все испытываемые штаммы проявили способность к продукции ПГБ на среде с глюкозой в качестве источника углерода

Таблица 1 – Продукция ПГБ штаммами почвенных бактерий на среде с глюкозой

Штамм	Сухой вес клеток, г/л (X)	Сухой вес ПГБ, г/л (P)	Экономический коэффициент P/X, %
<i>S. maltophilia</i> A1	8,74±0,35	1,27±0,05	14,53
<i>B. megaterium</i> A2	9,42±0,38	1,55±0,06	16,45
<i>Ps. flavescens</i> Д5	9,15±0,37	1,61±0,06	17,60

Наибольшей продуктивностью обладал штамм *Ps. flavescens* Д5, синтезирующий за 2 суток ферментации 1,61±0,06 г/л внутриклеточного полиэфира. Наименее продуктивным штаммом оказался *S. maltophilia* A1, накапливающий 1,27±0,05 г/л ПГБ. В результате проведенных исследований был отобран штамм *Ps. flavescens* Д5 как активный продуцент ПГБ.

Следующим этапом работы являлся подбор оптимальной питательной среды для мак-

симального накопления ПГБ. Проводили сравнительную оценку традиционных питательных сред для культивирования почвенных бактерий-продуцентов ПГБ: MSM, глюкозо-пептонной, синтетической, модифицированной MSM, ацетатной, минимальной, лизин-ацетатной, среды Тарана и MSM с мочевиной.

Питательные среды являются одним из главных факторов, влияющих на рост бактериальных клеток и биосинтез в них молекул ПГБ.

Зависимость продукции полиэфира от состава питательной среды обусловлена тем, что селективными условиями запуска данного процесса являются избыточное количество в среде источника углерода и ограничение концентрации источников азота и фосфора. Поэтому изучение влияния компонентов питательной среды на производство ПГБ становится одним из первых этапов при увеличении его выхода.

Наибольшее количество накопленного внутриклеточного полиэфира штаммом *Ps. flavescens* Д5 наблюдалось на среде MSM с глюкозой в качестве источника углерода. Выход ПГБ составил $1,60 \pm 0,06$ г/л, при этом накопленная биомасса достигла $9,14 \pm 0,37$ г/л, а экономический коэффициент 17,51% показал эффективность использования данной среды для накопления биопластика (Таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность продукции ПГБ штаммом *Ps. flavescens* Д5 на различных питательных средах

№	Питательная среда	Сухой вес клеток, г/л (X)	Сухой вес ПГБ, г/л (P)	Экономический коэффициент, (%)
1.	MSM	$9,14 \pm 0,37$	$1,60 \pm 0,06$	17,51
2.	Глюкозо-пептонная	$14,69 \pm 0,79$	$1,48 \pm 0,06$	7,52
3.	Синтетическая	$7,51 \pm 0,31$	$0,46 \pm 0,02$	6,13
4.	Модифицированная MSM	$8,05 \pm 0,32$	$0,93 \pm 0,04$	11,55
5.	Ацетатная	$8,34 \pm 0,33$	$0,75 \pm 0,03$	8,99
6.	Минимальная	$7,92 \pm 0,32$	$0,64 \pm 0,03$	8,08
7.	Лизин-ацетатная	$9,87 \pm 0,39$	$0,57 \pm 0,02$	5,78
8.	Среда Тарана	$12,56 \pm 0,51$	$0,21 \pm 0,01$	1,67
9.	MSM с мочевиной	$8,96 \pm 0,36$	$0,97 \pm 0,04$	10,83

Можно отметить высокие значения накопленной биомассы ($14,69 \pm 0,79$ г/л) и выхода ПГБ ($1,48 \pm 0,06$ г/л) на глюкозо-пептонной среде, однако при вычислении экономического коэффициента был получен низкий показатель, что говорит о неэффективности биосинтеза на данной среде. Наименьшей эффективностью процесса получения полигидроксибутирата характеризовалась среда Тарана, на которой было выделено $0,21 \pm 0,01$ г/л полиэфира, при низком экономическом коэффициенте 1,67%. Такие результаты показывают, что максимальное накопление биомассы в процессе культивирования не всегда соответствует максимальному выходу ПГБ относительно экономичности и эффективности производства.

Аналогично полученным результатам, в ранее проведенных исследованиях показано влияние состава среды на накопление ПГБ. Так, Nygaard D. с соавторами получили максимальное количество ПГБ при культивировании штаммов-продуцентов на модифицированной MSM – 4,6 г/л, что в 2,5 раза выше по сравнению с ферментацией на MSM. В качестве источника углерода использовали техническую фруктозу,

а в качестве источника азота сульфат аммония [8]. В исследовании Getachew A. и Woldeesenbet F. выход ПГБ составлял 6,1–6,8 г/л при ферментации на среде MSM с глюкозой в качестве источника углерода [13].

Влияние источника углерода и азота на продукцию полигидроксибутирата

Поскольку углерод и азот являются жизненно важными питательными элементами в метаболизме бактерий, на следующем этапе проводили подбор оптимальных источников углерода и азота для максимального накопления ПГБ.

В качестве источника углерода рассматривали глюкозу, сахарозу и натриевую соль уксусной кислоты. Глюкоза и ацетат являются более доступным субстратом для бактериальных клеток, они способны быстро и легко включаться в метаболические пути [15]. Сахароза является дисахаридом и при ее гидролизе под действием бактериальных клеток она разлагается на глюкозу и фруктозу, включаясь также в клеточный метаболизм [16].

Результаты показали, что наибольшее накопление биомассы и выход ПГБ можно получить

при использовании глюкозы в качестве источника углерода. На среде MSM с глюкозой 5% было выделено $1,64 \pm 0,07$ г/л ПГБ, при этом достига-

лись максимальные показатели биомассы клеток ($10,01 \pm 0,40$ г/л) и экономического коэффициента (16,38%) (Таблица 3).

Таблица 3 – Эффективность продукции ПГБ штаммом *Ps. flavescens* Д5 на среде с различными источниками углерода

Источник углерода	Сухой вес клеток, г/л (X)	Сухой вес ПГБ, г/л (P)	Экономический коэффициент, (%)
Глюкоза 1%	$9,22 \pm 0,37$	$1,29 \pm 0,05$	13,99
Глюкоза 3%	$9,76 \pm 0,39$	$1,55 \pm 0,06$	15,88
Глюкоза 5%	$10,01 \pm 0,40$	$1,64 \pm 0,07$	16,38
Сахароза 1%	$7,35 \pm 0,29$	$0,83 \pm 0,03$	11,29
Сахароза 3%	$7,72 \pm 0,31$	$0,94 \pm 0,04$	12,18
Сахароза 5%	$7,94 \pm 0,32$	$1,02 \pm 0,04$	12,85
Ацетат 1%	$6,12 \pm 0,24$	$0,55 \pm 0,02$	8,97
Ацетат 3%	$6,49 \pm 0,26$	$0,64 \pm 0,03$	9,86
Ацетат 5%	$6,88 \pm 0,28$	$0,71 \pm 0,03$	10,32

Полученные данные согласуются с результатами других исследователей. Sriyaraи Т. с соавторами изучали влияние источников углерода на биосинтез ПГБ. По представленным данным было установлено, что концентрация ПГБ была максимальной ($2,63 \pm 0,06$ г/л) при использовании ими глюкозы в качестве источника углерода [14]. Согласно Laseti с соавторами, продукция ПГБ была максимальной при концентрации глюкозы 50 г/л, однако при увеличении ее до 60 г/л скорость потребления субстрата и рост клеток снизились. [17].

Наименьшая эффективность биосинтеза ПГБ штаммом *Ps. flavescens* Д5 отмечена на среде MSM с ацетатом натрия, взятого в количестве 1% от объема среды в качестве единственного источника углерода. Выход ПГБ составил $0,55 \pm 0,02$ г/л, при минимальном накоплении биомассы ($6,12 \pm 0,24$ г/л). Экономический коэффициент также имел наименьшее значение – 8,97% (Таблица 3). Согласно Zhou W. для некоторых штаммов-продуцентов ПГБ уксусная кислота или ее соли (например, ацетат натрия) являются оптимальными источниками углерода для максимального выхода ПГБ. Приведенные им результаты показали, что при концентрациях 0,5-1% ацетата в среде выход ПГБ достигал $4,50 \pm 0,09$ г/л, что не исключает возможность использования уксусной кислоты в качестве ис-

точника углерода для производства ПГБ другими штаммами [9].

Источник азота считается ограничивающим фактором в синтезе ПГБ. В условиях недостатка азота почвенные бактерии начинают преобразовывать различные источники углерода, включая их в синтез ПГБ. Также качество и количество получаемого ПГБ напрямую связано с доступностью азота (свободная форма или комплексная). [18]. Для поиска подходящего источника азота в среду поочередно добавляли пептон, дрожжевой экстракт, мочевины, NH_4NO_3 , NH_4Cl и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

По результатам, указанным в таблице 4, видно, что наилучшим источником азота для получения максимального количества ПГБ стал нитрат аммония. На среде с данным источником азота штамм продуцировал ПГБ в концентрации $1,55 \pm 0,06$ г/л при наивысшем экономическом показателе 16,09%.

Наименьшей эффективностью биосинтеза ПГБ штамм обладал на среде с дрожжевым экстрактом в качестве источника азота. При этом было выделено всего $0,56 \pm 0,02$ г/л полиэфира (Таблица 4).

Как показывают результаты опытов, наиболее благоприятными источниками углерода и азота для увеличения выхода ПГБ являются глюкоза в концентрации 5% и нитрат аммония. На среде с глюкозой и NH_4NO_3 было накоплено и выделено 1,62 г/л ПГБ.

Таблица 4 – Продукции ПГБ штаммом *Ps. flavescens* Д5 на среде с различными источниками азота

Источник азота	Сухой вес клеток, г/л (X)	Сухой вес ПГБ, г/л (P)	Экономический коэффициент, %
Пептон	16,54±0,66	1,48±0,06	8,95
Дрожжевой экстракт	10,33±0,41	0,56±0,02	5,42
Мочевина	8,97±0,36	0,85±0,03	9,48
NH ₄ NO ₃	9,63±0,39	1,55±0,06	16,09
NH ₄ Cl	7,31±0,29	0,60±0,02	8,21
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,82±0,35	0,73±0,03	8,28

Продукция ПГБ на среде с глицерином

Глицерин — один из основных компонентов органических отходов при производстве биотоплива, пищевой и косметической продукции. Для проверки гипотезы о возможности использования глицерина в качестве основного С-субстрата была проведена адаптация штамма *Ps. flavescens* Д5 к глицерину в течение 5 циклов культивирования. По окончании каждого цикла определяли показатели оптической плотности и количество жизнеспособных клеток на плотной питательной среде.

По данным таблицы 5 можно сделать вывод, что изначально культивируемый на среде с глюкозой штамм *Ps. flavescens* Д5 постепенно адаптировался к росту и синтезу ПГБ на среде с глицерином.

Таблица 5 – Адаптация штамма *Ps. flavescens* Д5 к глицерину

Пассаж	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/л
№ 1	24·10 ⁷
№ 2	26·10 ⁹
№ 3	42·10 ¹¹
№ 4	48·10 ¹²
№ 5	60·10 ¹²

Сравнивая характеристики культуральной жидкости первого пассажа и пятого видно, что спустя 5 пересевов, количество жизнеспособных клеток возросло с 24·10⁷ до 60·10¹² КОЕ/л.



Рисунок 1 – Рост бактерий, адаптированных к глицерину

Как видно из данных представленных в таблице 6, на среде с глицерином штаммом *Ps. flavescens* Д5 было накоплено 12,25±0,49 г/л биомассы и 2,15 г/л ПГБ, при этом экономический коэффициент имел значение 17,55 %, что превышает значения, полученные на среде MSM.

Таблица 6 – Эффективность продукции ПГБ штаммом *Ps. flavescens* Д5, адаптированным к глицерину

Сухой вес клеток, г/л	Сухой вес ПГБ, г/л	Экономический коэффициент, %
12,25±0,49	2,15±0,09	17,55

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что ферментацию штамма-продуцента ПГБ возможно проводить с использованием гли-

церина, тем самым увеличивая выход продукта и снижая затраты на источники углерода.

Заключение

Проведенные исследования по подбору компонентов питательной среды для увеличения продукции ПГБ почвенными бактериями позволяют выработать новые подходы, способствующие снижению затрат на его производство. Подобрана оптимальная среда MSM для продукции ПГБ. Показана эффективность адаптации штамма *Ps. flavescens* Д5 к среде с глицерином.

Работа выполнена в рамках проекта ГФ АР19679444 «Разработка биопрепарата пролонгированного действия на основе полимерной матрицы с эффективными микроорганизмами для стимулирования роста агрокультур».

Литература

1. Thushari GGN, Senevirathna JDM. Plastic pollution in the marine environment. *Heliyon*. 2020 Aug;6(8): e04709
2. Kunle Babaremu, Oluseyi P. Oladijo, Esther Akinlabi, Biopolymers: A suitable replacement for plastics in product packaging, *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, Volume 6, Issue 4, 2023, Pages 333-340
3. McAdam B, Brennan Fournet M, McDonald P, Mojicevic M. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers (Basel)*. 2020;12(12):2908. Published 2020 Dec 4.
4. Al-Khattaf, Fatimah S., Mysoon M. Al-Ansari, Murali Kannan Maruthamuthu, L. Dyona, and Paul Agastian. 2022. "Polyhydroxybutyrate Degradation by Biocatalyst of Municipal Sludge Water and Degradation Efficacy in Sequencing Batch Biofilm Reactor." *Environmental Research* 204 (March): 112336
5. Jendrossek, Dieter, and René Handrick. 2002. "Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates." *Annual Review of Microbiology* 56 (1): 403–32
6. Jung, Hee Ju, Sang Hyun Kim, Nara Shin, Seong-Hwan Oh, Jin Ho Hwang, Hyun Jin Kim, Yoon Jae Kim, et al. 2023. "Polyhydroxybutyrate (PHB) Production from Sugar Cane Molasses and Tap Water without Sterilization Using Novel Strain, Priestia Sp. YH4." *International Journal of Biological Macromolecules* 250 (October): 126152.
7. Akhlaq, S., Singh, D., Mittal, N. et al. Polyhydroxybutyrate biosynthesis from different waste materials, degradation, and analytic methods: a short review. *Polym. Bull.* 80, 5965–5997 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04406-9>
8. Nygaard, Daiana, Oxana Yashchuk, and Élide B. Hermida. 2019. "Evaluation of Culture Medium on Poly(3-Hydroxybutyrate) Production by *Cupriavidus Necator* ATCC 17697: Application of the Response Surface Methodology." *Heliyon* 5 (3): e01374.
9. Zhou, Wen, Dana I. Colpa, Bert Geurkink, Gert-Jan Euverink, and Janneke Krooneman. 2022. "The Impact of Carbon to Nitrogen Ratios and pH on the Microbial Prevalence and Polyhydroxybutyrate Production Levels Using a Mixed Microbial Starter Culture." *Science of the Total Environment* 811 (March): 152341.
10. Trakunjae, Chanaporn, Antika Boondaeng, Waraporn Apiwatanapiwat, Akihiko Kosugi, T. Arai, Kumar Sudesh, and Pilanee Vaithanomsat. 2021. "Enhanced Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Newly Isolated Rare Actinomycetes *Rhodococcus* Sp. Strain BSRT1-1 Using Response Surface Methodology." *Scientific Reports* 11 (1)
11. K. Sangkharak, P. Prasertsan. Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2008. – 11(3). – P. 1-12.
12. Mojtaba Taran, Homeira Amirkhani. Strategies of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by *Haloarcula* sp. IRU1 utilizing glucose as carbon source: Optimization of culture conditions by Taguchi methodology // *Int J Biol Macromol*. – 2010. – 47(5). – P. 632-63.
13. Anteneh Getachew, Fantahun Woldesenbet. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low-cost agricultural waste material // *BMC Research Notes*. – 2016. – 9. – P. 1-9. |
14. Демиденко А. В. Технология биосинтеза полигидроксиполымерных соединений на глицерине и реализация опытного производства: дис. канд. биол. наук. – Красноярск, 2018. – 142 с.
15. Khatami, Kasra, Mariel Pérez-Zabaleta, Isaac Owusu-Agyeman, and Zeynep Cetecioglu. 2021. "Waste to Bioplastics: How Close Are We to Sustainable Polyhydroxyalkanoates Production?" *Waste Management* 119 (January): 374–88. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.008>.

16. Jiang, Guozhan, David J. Hill, Marek Kowalczyk, Brian Johnston, Grażyna Adamus, Victor U. Irorere, and Iza Radecka. 2016. "Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (7): 1157.
17. Lasemi, Zahra, Ghasem Najafpour Darzi, and Mazyar Sharifzadeh Baei. 2013. "Media Optimization for Poly(β -Hydroxybutyrate) Production Using *Azotobacter Beijerinckii*." *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 62 (5): 265–69.
18. Xu, Zhangyang, Xiaolu Li, Naijia Hao, Chuang Pan, Luis De La Torre, Aftab Ahamed, John H. Miller, Arthur J. Ragauskas, Joshua S. Yuan, and Bin Yang. 2019. "Kinetic Understanding of Nitrogen Supply Condition on Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate from Benzoate by *Pseudomonas Putida* KT2440." *Bioresource Technology* 273 (February): 538–44

Авторлар туралы мәлімет:

Игнатова Людмила Викторовна – биология ғылымдарының кандидаты, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің биотехнология кафедрасының доценті (Алматы, Қазақстан, email: lyudmila.ignatova@kaznu.edu.kz)

Бражникова Елена Валерьевна – PhD, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан, email: pol_b@mail.ru)

Омирбекова Анель Адилевна – PhD, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің биотехнология кафедрасының аға оқытушысы (Алматы, Қазақстан, email: anel.omirbekova@kaznu.edu.kz)

Омарова Сабина Нурахунқызы – әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің, биотехнология кафедрасының магистранты (Алматы, Қазақстан, email: sabina.omarova.01@bk.ru)

Шамсутдинов Руслан Чингизұлы (корреспондент автор) – әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің, биотехнология кафедрасының магистранты (Алматы, Қазақстан, email: ruslanshamsutdinov13@gmail.com)

Туланова Нигара Құдратжанқызы – биотехнология кафедрасының магистранты (Алматы, Қазақстан, email: tulanova_nigara@mail.ru)

Уразова Жанат Канатқызы – әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің, биотехнология кафедрасының магистранты (Алматы, Қазақстан, email: kanatkyzhan7@gmail.com)

Information about authors:

Ignatova Lyudmila Viktorovna – candidate of biological sciences, associate professor at the Department of Biotechnology, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, email: lyudmila.ignatova@kaznu.edu.kz)

Brazhnikova Elena Valerievna – PhD, researcher of Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, email: pol_b@mail.ru)

Omirebekova Anel Adilevna – PhD, assistant professor at the Department of Biotechnology, Al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, email: anel.omirebekova@kaznu.edu.kz)

Omarova Sabina – master student at the Department of Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, email: sabina.omarova.01@bk.ru)

Shamsutdinov Ruslan Chingizovich (corresponding author) – master student at the Department of Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, email: ruslanshamsutdinov13@gmail.com)

Tulanova Nigara Kudratzhanovna (corresponding author) – master student at the Department of Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, email: tulanova_nigara@mail.ru)

Urazova Zhanat master student at the Department of Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University (Almaty, Kazakhstan, email: kanatkyzhan7@gmail.com)

Получена 07 ноября 2023 года

Принята 25 марта 2024 года