

УДК: 576.8:678:66.0:620.1

Original Article

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО СИНТЕЗА ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА ШТАММОМ *BACILLUS ARYABHATAI* RAF 5 И АНАЛИЗ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННОЙ МЕМБРАНЫРысбек А.*^{id}, Шамухан А.^{id}, Абельденов С.^{id}

Национальный центр биотехнологии, 010000, Казахстан, г. Астана, Кургальжинское шоссе 13/5

*Автор для корреспонденции: rysbek@biocenter.kz

АБСТРАКТ

Метод периодического обновления (ПО) или периодического добавления (ПД) свежей среды рассматривается как перспективный метод долгосрочного и эффективного получения полигидроксибутирата (ПГБ), синтезируемого различными почвенными бактериями. В наших предыдущих исследованиях мы сообщали о потенциале продуцирования ПГБ штаммом *Bacillus aryabhatai* RAF 5 IMD B - 462, выделенного из каштановых почв в городе Астана, Казахстан. В текущем исследовании сообщается об оптимизации метода культивирования RAF 5 с использованием технологии ПО для получения высокого выхода ПГБ и биомассы, а также об исследовании мембраны, полученной на основе ПГБ. Накопление плотных гранул ПГБ в цитозоле клеток было подтверждено с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ); в цитозоле RAF 5 было обнаружено более 10 гранул на клетку. ПГБ был выделен методом экстракции растворителем. При применении метода периодического обновления, наибольший выход ПГБ и биомассы, полученные после 72-часовой инкубации, составили 18,03 г/л и 20,04 г/л, соответственно. Наибольший выход ПГБ после 120-часовой инкубации составил 3,76 г/л, когда штамм RAF 5 выращивался в стандартной питательной среде МПБ. Полученный ПГБ был в дальнейшем использован для изготовления мембраны, которая была подвергнута анализу на проницаемость для водяного пара, кислорода и углекислого газа. Тесты показали низкую проницаемость для кислорода и углекислого газа при умеренной проницаемости для водяного пара, что свидетельствует о хороших барьерных свойствах материала. Эти данные указывают на потенциал ПГБ как эффективного материала для производства мембран, пригодных для упаковки или биомедицинских приложений, где требуется контроль газообмена.

Ключевые слова: *Bacillus aryabhatai*; Полигидроксибутират; Проницаемость мембран; Периодическое обновление (ПО); Трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ); Почвенные бактерий Казахстана.

ВВЕДЕНИЕ

Полигидроксибутират — это биоразлагаемый полимер, привлекающий внимание как альтернатива пластику на основе нефти. Его уникальные свойства делают его востребованным для различных применений: производство биоразлагаемых пленок, мембран, упаковки, медицинских нитей и т.д. Благодаря своей биоразлагаемости и биосовместимости с тканями организма, ПГБ перспективен для медицинских целей. В наномедицине он используется как основа для систем доставки лекарств, особенно на базе полиэфирных наночастиц, включая сополимеры на основе ПГБ [1]. В наномедицине наблюдается стремительный рост внимания к полимерным носителям лекарств, при этом значительные усилия были направлены на разработку средств противодействия различным инфекциям и онкологическим заболеваниям. Среди систем доставки особое место занимают наночастицы на основе полиэфиров, включая полимер-лекарственные конъюгаты и амфифильные блок-сополимеры, которые демонстрируют перспективные свойства, особенно в случае материалов, изготовленных на основе ПГБ [2]. Коммерческие продукты П(ЗГБ) предлагаются несколькими компаниями, такими как ТЕРНА, Metabolix и P & G, в форме швов, штифтов, пленок, винтов и других изделий [3]. В медицине в качестве рассасывающихся шовных нитей, повязок, тампонов, и стержней в ортопедии, также возможно получение гибких пленок, полупроницаемых мембран, различных полых форм (бутыли, контейнеры, коробки и пр.), также гелей и клеев, а также как полимерная матрица для медикаментов длительного высвобождения [4-

6]. Потенциальная возможность синтеза бактериями разнообразных по составу полимеров дает основания для направленного получения материалов с заданными свойствами.

Бактерии способны синтезировать ПГБ, что делает их перспективными кандидатами для биосинтеза. Более 500 видов бактерий, включая роды *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Ralstonia* и другие, могут производить ПГБ на недорогих субстратах (ацетат, глицерин, патока, метанол, глюкоза) и в условиях дефицита питательных элементов, таких как азот и кислород. У ряда бактерий, в том числе *Bacillus*, гены, ответственные за синтез полиэфиров, были клонированы, и были созданы рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*. Эти микроорганизмы способны продуцировать сложные полиэферы, используя широкий спектр углеродных источников включая недорогие и легко доступные субстраты, такие как ацетат, глицерин, меласса, метанол и глюкоза. Биосинтез ПГБ активируется при ограничении определенных минеральных питательных веществ, в частности азота, фосфора и кислорода, что позволяет управлять направлением метаболизма в сторону накопления резервных полимеров. Кроме того, перечисленные бактериальные виды отличаются генетической пластичностью, что делает возможным клонирование и гетерологичную экспрессию генов, ответственных за биосинтез полигидроксиалканоев. В частности, были выделены и клонированы гены, кодирующие ключевые ферменты данного биосинтетического пути, что позволило получить рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, способные эффективно синтезировать ПГА-полимеры с

использованием встроенного метаболического аппарата [7,8].

При воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как резкие колебания температуры, ультрафиолетовое излучение, дефицит микроэлементов и других стрессовых условий, некоторые виды бактерий, включая штаммы рода *Bacillus*, способны накапливать полигидроксibuтират (ПГБ) в клетке. Этот биополимер служит не только резервным источником углерода, но и формой хранения энергии, обеспечивая выживание микроорганизмов в условиях дефицита ресурсов [9, 10].

Штамм *Bacillus aryabhatai* ZDY2 был идентифицирован как перспективный продуцент биосурфактантов, при этом уровень их синтеза удалось увеличить в 2,51 раза благодаря оптимизированному процессу, основанному на методологии отклика поверхности [11]. Несмотря на высокий потенциал *B. aryabhatai* в продукции биосурфактантов, включая липопептиды и поли-3-гидроксibuтират (ПГБ), в настоящее время опубликовано ограниченное число исследований, посвящённых оптимизации этих процессов и изучению характеристик данных соединений.

Для расширения возможностей промышленного применения биосурфактантов, включая ПГБ, необходимы дальнейшие исследования, направленные на оптимизацию их производства с целью повышения выхода продукта. В связи с этим настоящая работа была посвящена изучению и оптимизации условий синтеза ПГБ, продуцируемого штаммом *B. aryabhatai* RAF 5, ранее выделенным из каштановых почв Северного Казахстана [12]. Целью исследования является всестороннее изучение эффективности накопления ПГБ штаммом *B. aryabhatai* RAF 5, оценка его роста в условиях периодической культивации, а также анализ свойств мембран, полученных из бактериального ПГБ, в частности их паро- и газопроницаемости.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Микроорганизмы

Штамм *Bacillus aryabhatai* RAF 5 был выделен из каштановых почв в городе Астана, Казахстан, в Национальном центре биотехнологии, Лаборатории экологической биотехнологии. Штамм выращивали в условиях ограничения азота до биомассы 3–4 г/л ($A_{600} < 0,2$). Клетки центрифугировали, дважды промывали 0,1 М $MgSO_4$ и ресуспендировали в том же растворе. Полученную суспензию облучали (лампа ВИО-2, Россия, «Фимет» на длине волны 200–400 нм) на расстоянии 10 см в течение 2–10 мин. Облучённые и контрольные клетки после десятикратных разведений высевали на минеральную среду, инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. Анализировали чашки с выживаемостью менее 1% и подсчитывали количество колоний. Для скрининга накопления ПГБ мазки окрашивали Суданом В и сравнивали с контролем под микроскопом. Ультрафиолетовое облучение использовалось в качестве стресс-фактора для увеличения продукции ПГБ штаммом *B. aryabhatai* RAF 5. Штамм обычно выращивали на среде Лурия-Бертани (LB: 10 г/л пептона, 10 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта, 17 г/л агара) и хранили при температуре -80 °С в растворе глицерина (50% глицерина и 50 % дистиллированной воды).

Физико-биохимическую характеристику (тесты на зависимость от температуры и pH), а также физические характеристики проводили, как описано ранее [12].

Все исследования, если не указано иначе, проводились при температуре 25 °С.

2.2. Оптимизация питательной среды и условий выращивания

Для реализации более длительного и стабильного процесса биосинтеза поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ) был применён метод периодического культивирования. В данном подходе клетки частично отбирались и собирались через определённые интервалы времени, после чего в колбу с оставшейся культуральной жидкостью добавлялась свежая питательная среда, содержащая все необходимые компоненты, включая азот, в количестве, достаточном для возобновления роста клеток. В настоящей работе проводилось периодическое культивирование мутантного штамма RAF 5 в минеральной среде, содержащей бобовый отвар в качестве источника белка, с концентрацией азота 0,3 г/л и 1 г/л соответственно, в объёме по 2 литра.

В ходе экспериментов варьировались объём заменяемой среды и длительность циклов, каждый из которых включал периодическое культивирование. В частности, исследовался вариант замены 50% культуральной жидкости. Объёмы подбирались таким образом, чтобы обеспечить достаточное поступление компонентов свежей питательной среды для роста новых клеток, а также сохранить рабочую биомассу, способную к синтезу ПГБ. Накопление ПГБ в клетках определялось с использованием окрашивания Суданом чёрным В.

Доступность питательных веществ играет ключевую роль в синтезе поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ). Основными питательными веществами, необходимыми для синтеза ПГБ, являются углерод, азот и фосфор. Оптимальная концентрация этих элементов должна быть определена для каждого конкретного штамма *Bacillus* для достижения максимального выхода ПГБ. Штамм *B. aryabhatai* культивировался при 30 °С в 150-мл колбах Эрленмейера с 150 мл среды при 150 об/мин в течение 120 часов в модифицированной минеральной среде Лоу и Слеппеки (LS: 20 г/л глюкозы, 1,0 г/л $(NH_4)_2SO_4$, 4,35 г/л Na_2HPO_4 , 1,3 г/л KH_2PO_4 , 0,2 г/л KCl, 0,02 г/л $MgCl_2$, 0,001 г/л $CaCl_2$, 0,01 г/л $FeCl_3$, 0,001 г/л $MnCl_2$, 0,1 г/л Na_2SO_4 ; pH 7,0) [9]. Колбы закрывались пробками, обернутыми парафильмом, для ограничения доступа кислорода, что способствует повышенному накоплению ПГБ [13]. Для сбалансированного роста и продукции ПГБ оптимальная концентрация $(NH_4)_2SO_4$ была снижена до 0,3 г/л по сравнению с исходным составом LS. Более длительный и стабильный процесс биосинтеза ПГБ был реализован с использованием режима периодического культивирования, при котором каждые 24 часа отбиралась часть культуральной жидкости, а в колбу добавлялась свежая питательная среда, содержащая все компоненты, включая азот в концентрации 0,3 г/л, достаточной для возобновления роста клеток. По сравнению с традиционным периодическим процессом, использование метода культивирования в периодическом режиме повышает эффективность процесса. Данный подход успешно применялся для производства лимонной кислоты из этанола [14], глюкозы [15, 16], отходов, со-

держат глицин [17], а также с глюкозой в качестве единственного источника углерода [18, 19].

2.3. Морфологический анализ отобранных изолятов бактерий, продуцирующих ПГБ, с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ)

Морфология образцов (микрофотографии) была получена с использованием трансмиссионного электронного микроскопа (JEM 1400 Plus, Япония) в Лаборатории сверхвысокого разрешения Назарбаев Университета (г. Астана). Изображения фиксировались в режиме тёмного поля при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от $\times 1\,000$ до $\times 50\,000$.

2.4. Экстракция ПГБ химическим методом

Бактериальная культура выращивалась в течение 5 дней методом периодического культивирования (ПО) в среде Лоу и Слеппеки (LS) с использованием шейкера (Innova R43, New Brunswick Scientific, США). Затем культура центрифугировалась при $5752 \times g$ в течение 20 минут для получения осадка, который промывался и лиофилизировался. Лиофилизированные клетки переносились в коническую колбу и смешивались со 100 мл 5%-ного раствора гипохлорита натрия и 100 мл хлороформа. В результате осадок полигидроксиалканоев (ПГА) высушивался путём испарения при $30\text{ }^\circ\text{C}$ в течение ночи, что приводило к образованию белых хлопьев или порошка. Сухая масса извлечённого ПГБ определялась гравиметрически.

2.5. Подготовка мембраны из ПГБ

Исследуемая мембрана была изготовлена методом литья раствора. ПГБ растворяли в хлороформе для получения 3%-ного (м/об) раствора полимера. Для формирования мембраны 50 мл приготовленной смеси разливали в стеклянные чашки Петри (диаметром 14,5 см) и оставляли на 3 дня для образования полимерной плёнки [20-22]. Толщина полученных плёнок измерялась с помощью электронного толщиномера с диапазоном 0,001/0–12,7 мм и составляла от 0,075 до 0,080 мм.

2.6. Проницаемость водяного пара и газов через мембраны

2.6.1. Проницаемость водяного пара

Проницаемость водяного пара (ПВП) определялась в соответствии со стандартом (PN-EN ISO 15106-1:2007) с использованием прибора L80-5000 (PBI Dansensor, США). Данный тест заключается в определении количества водяного пара [г], проходящего через заданную площадь образца за единицу времени при постоянной температуре. Для каждого образца проводилось пять измерений, а среднее арифметическое этих измерений принималось за результат испытания. Тестирование выполнялось при температуре $38\text{ }^\circ\text{C}$ [23].

2.6.2. Проницаемость кислорода

Определение проницаемости кислорода (ПК) проводилось в соответствии со стандартом ASTM F 1927-98 «Стандартный метод испытаний для определения скорости передачи кислорода, проницаемости и пермеации при контролируемой относительной влажности через барьерные материалы с использованием кулонометрического детектора». Использовался испытательный стенд MultiPerm O_2 - CO_2 DC (PermTech srl, № B02Y0, Велико-

британия). Для каждого образца выполнялось три измерения, а среднее арифметическое этих измерений принималось за результат испытания. Тестирование проводилось с использованием маски с площадью измерения $2,01\text{ cm}^2$. Полученный результат измерения коррелировал с толщиной тестируемого образца [24].

2.6.3. Проницаемость углекислого газа

Проницаемость углекислого газа (ПУГ) определялась в соответствии со стандартом ASTM F2476-20 «Стандартный метод испытаний для определения скорости передачи углекислого газа (CO_2 TR) через барьерные материалы с использованием инфракрасного детектора». Использовался испытательный стенд MultiPerm O_2 - CO_2 DC (PermTech srl, № B02Y0, Великобритания). Полученные результаты измерений коррелировали с толщиной тестируемого образца [25].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Оптимизация питательной среды и условий выращивания

Штамм *B. aryabhatai* RAF 5, ранее идентифицированный как продуцент ПГБ, успешно растёт в мясо-пептонных средах. На МПА он образует круглые бежевые колонии диаметром около 2 мм со слегка выпуклым профилем и гладкой поверхностью. Оптимальные условия роста: $37\text{ }^\circ\text{C}$ и pH 7,2; пигменты в среду не выделяются, биологический титр достигает 10^9 КОЕ/мл. В ходе экспериментов варьировались частота обновления среды и длительность циклов культивирования, при этом каждый цикл проводился в периодическом режиме. Был протестирован следующий подход: удаление и замена 50% среды свежим питательным раствором. Выбранные объёмы обеспечивали поступление необходимых питательных веществ для роста новых клеток, сохраняя при этом достаточное количество активной биомассы, способной синтезировать поли-3-гидроксибутират (ПГБ). Процесс биосинтеза в данной модели оставался интенсивным в течение 120 часов (5 дней), при этом концентрация ПГБ достигала высоких значений и составила 18,03 г/л к 72 часам (см. рисунок 1).

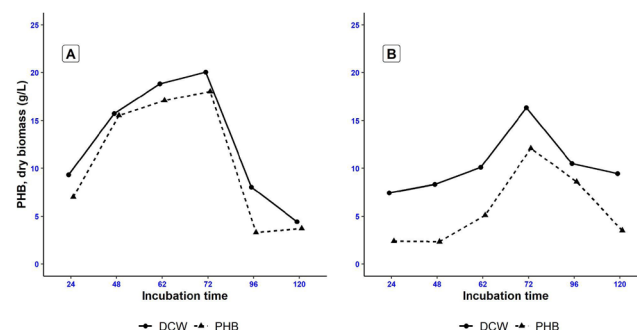


Рисунок 1. Содержание биомассы и концентрация ПГБ в периодическом режиме (А) и в стандартном режиме культивирования (В) в среде питательного бульона (NB), штамм *B. aryabhatai* RAF 5. DCW — сухая масса клеток; PHB — полигидроксибутират.

Метод периодического обновления (ПО) или периодического добавления (ПД) свежей питательной среды рассматривается как перспективная технология для длительного и эффективного производства поли-3-гидрок-

сibuтирата (ПГБ), синтезируемого различными почвенными бактериями. Данный метод обеспечивает высокую биосинтетическую активность штамма RAF 5 в течение 120 часов, что связано с непрерывным обновлением культуры. Кроме того, метод ПО снижает затраты на сырьё, тепло и электроэнергию за счёт уменьшения потребности в посевном материале и увеличения интервалов между циклами подготовки.

3.2. Анализ с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) выделенных штаммов бактерий, продуцирующих ПГБ

Анализ с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) выявил накопление плотных гранул ПГБ в цитозоле всех исследованных изолятов. Было отмечено, что цитозоль заполнен крупными гранулами, присутствующими либо поодиночке, либо в зарождающейся форме (см. рисунок 2). Таким образом, ТЭМ-изображения подтверждают результаты количественных исследований и свидетельствуют о том, что штамм RAF 5 является эффективным продуцентом ПГБ.

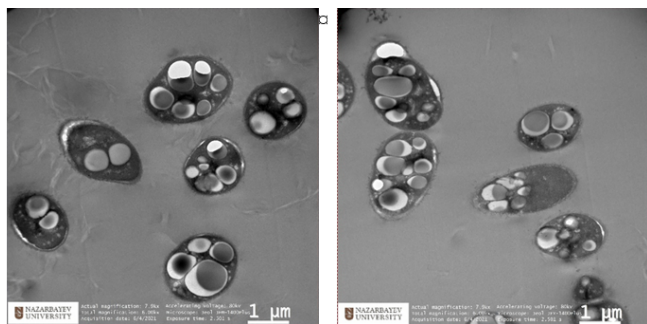


Рисунок 2. Изображения ТЭМ изолята RAF 5 с высоким содержанием ПГБ после 20 часов инкубации. Белые гранулы внутри бактериальных клеток представляют собой накопленные гранулы ПГБ.

Размер и количество клеток варьируются, при этом каждая клетка содержит примерно от 4 до 13 гранул ПГБ диаметром от 0,2 до 1,0 мкм. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными исследованиями [26, 27]. В начале 1960-х годов было установлено, что ПГБ и другие полигидроксиалканоаты синтезируются и накапливаются в виде внутриклеточных гранул, которые могут составлять до 90% сухой массы клетки [28].

3.3 Плёнка ПГБ, полученная из штамма *Bacillus aryabhattai* RAF 5

В результате проведённой работы с бактериальным штаммом *B. aryabhattai* RAF 5 была получена плёнка из ПГБ, что продемонстрировано на рисунке 3.

Раствор полимера наносили на чистые стеклянные чашки Петри и высушивали в течение ночи при 60 °С, что позволяло легко отделить полученную плёнку.

В ходе исследования температура плавления ПГБ, синтезированного штаммом *B. aryabhattai* RAF 5, определялась с использованием прибора для измерения температуры плавления (Fisher – Johns, Melting Point Apparatus, США). Температура плавления образцов ПГБ, полученных от Sigma-Aldrich, и выделенной бактериальной плёнки оказалась схожей и составила 175 °С, что может



Рисунок 3. Плёнка ПГБ, экстрагированная из штамма *B. aryabhattai* RAF 5.

указывать на высокую молекулярную массу изолированного полимера.

Аналогично нашим результатам, температура плавления ПГБ, синтезированного штаммом *Hydrogenophaga sp.* УМ1-18, также составляла 175 °С, при этом температура стеклования (T_g) была равна 4 °С, а средняя молекулярная масса достигала 860 кДа [29].

3.4 Проницаемость водяного пара и газов через полученную мембрану

Результаты исследования проницаемости водяного пара и газов — кислорода и углекислого газа — представлены в таблице 1.

Таблица 1. Проницаемость водяного пара и газов через мембрану

Образец	ПВП, г/м ² *24ч	ПК, мл/м ² *24ч	ПУГ, мл/м ² *24ч
ПГБ	56±0.45	135±0.28	679±0.25

Проницаемость водяного пара и газов через изготовленную мембрану близка к результатам, полученным другими исследователями, изучавшими барьерные свойства мембран. Полученные параметры подтверждают высокие барьерные характеристики мембраны из ПГБ [30]. Поверхностные свойства биоматериала, в частности гидрофильность, влияют на адгезию клеток к материалам. Эти механические характеристики свидетельствуют о высоком потенциале использования ПГБ в композиции с другими полимерами в тканевой инженерии [31, 32].

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день различные штаммы бактерий продемонстрировали потенциал к продукции поли-3-гидроксибутирата (ПГБ), однако оптимальные условия их культивирования существенно различаются в зависимости от вида и штамма. Физико-химические параметры, такие как pH и температура, играют критическую роль в обеспечении эффективного синтеза ПГБ, влияя как на рост бактерий, так и на накопление полимера.

Например, для штамма *Bacillus cereus* SH-02 была установлена температурная зависимость синтеза ПГБ: минимальное количество полимера наблюдалось при 25

°С, максимальное — при 35 °С, тогда как при 40 °С выход снижался, а при 45 °С синтез полностью отсутствовал [33]. В то же время исследования штамма *Bacillus paramycooides* МССС 1А04098 показали, что среди протестированных значений рН (3,0, 7,0 и 8,0) оптимальным для максимального выхода ПГБ является рН 7,0 [34]. В отличие от этого, штамм *Bacillus megaterium* демонстрировал устойчивость к колебаниям рН в диапазоне 5,12–6,9, которые не влияли ни на его рост, ни на синтез алканоатов [30]. Для этого же штамма минимальный выход ПГБ был зафиксирован при рН 5,0 и температуре 45 °С, а максимальный — при рН 7,0 и температуре 30 °С. Аналогично, штаммы *Bacillus spp.*, выделенные в работе [31], достигали наибольшего выхода ПГБ при рН 7,0, как и в [35], но требовали более высокой температуры — 37 °С. В других исследованиях, проведённых в диапазоне рН 6,5–9,0 и температур 25–45 °С, максимальный выход ПГБ был достигнут при рН 8,0 и 35 °С [36].

Таким образом, эколого-физиологические условия, включая рН и температуру, являются определяющими факторами не только для поддержания роста бактерий, но и для оптимизации синтеза ПГБ. Изучение этих параметров имеет ключевое значение для повышения выхода полимера как в лабораторных, так и в промышленных условиях.

Экспериментально установлено, что при применении метода ПО штамм *B. aryabhatai* RAF 5 демонстрировал высокую биосинтетическую активность, достигнув концентрации ПГБ 18,70 г/л через 120 ч, при этом биомасса составила 21,44 г/л за тот же период. В условиях стандартной среды МПБ концентрация ПГБ составила 12,09 г/л за 120 ч. Для сравнения, в работе Aneesh Balakrishna Pillai и соавт. (2017) сообщалось, что у штамма *B. aryabhatai* ПГБ 10 максимальное накопление полимера составляло 3,264 г/л при добавлении 20 г/л глюкозы в среду [37]. В исследовании того же автора (2020) отмечено, что штамм *B. aryabhatai* продуцировал 2,8 г/л П(ЗГБ), что эквивалентно 71,15% сухой массы клеток в среде с пропиононовой кислотой после 48 ч инкубации [38]. Аналогичные результаты были представлены Chonasi и соавт. (2014), где штамм *B. aryabhatai* ST1C достигал максимального содержания ПГБ (72,31% сухой массы клеток) и концентрации биомассы 7,24 г/л при 24-часовом культивировании методом периодического сбрасывания [39]. Таким образом, предложенный метод является простым в реализации и экономически целесообразным, что повышает перспективность его использования в промышленном производстве биополимеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведена оптимизация метода культивирования штамма *Bacillus aryabhatai* RAF 5 с использованием периодического обновления среды, что позволило достичь высокого выхода биомассы и полигидроксибутирата (ПГБ) при одновременном снижении затрат на сырьё и энергоресурсы. Оптимизация условий роста (температура, рН, подача кислорода, состав питательной среды) обеспечила максимальную продуктивность штамма, что подтверждено трансмиссионной электронной микроскопией и физико-химическими анализами. Модификация

среды добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в концентрации 0,3 г/л способствовала эффективному накоплению ПГБ. Из выделенного полимера была изготовлена мембрана с высокими барьерными свойствами, что подтверждает потенциал метода для масштабирования и использования ПГБ в производстве биоразлагаемой упаковки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового проекта No AP19680504 «Поиск и получение эффективного продуцента экологически чистого биоразлагаемого пластика (полигидроксибутират) из почвенных бактерий».

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация, А.Р.; методология, А.Р., А.Ш.; статистический анализ, А.Ш., А.Р.; дизайн исследования, А.Р.; интерпретация данных, А.Ш.; подготовка первоначального варианта текста, А.Р.; рецензирование и редактирование текста, А.Ш., А.С.; научное руководство, А.Р. Все авторы ознакомились с опубликованной версией рукописи и согласились с ней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mohapatra S. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by Bacillus Strain Isolated from Waste Water and Its Biochemical Characterization // Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci. – 2017. – Vol.87, №2. – P.459–466. doi: 10.1007/s40011-015-0626-6
2. Brigham C. J., Sinskey A. J. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry // International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. – 2012. – Vol.1, №1. – P.53–60. doi.org/10.6000/1927-3037.2012.01.01.03
3. Misra S. K. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications // Biomacromolecules. – 2006. – Vol.7, №8. – P.2249–2258. doi: 10.1021/bm060317c
4. Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А., Босхонджиев А.П., Заиков Г.Е. // Пластические массы. – 2010. – №3. – P.6–23. [In Russian].
5. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Воинова В.В., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2018. – №6. – P.130–134. [In Russian].
6. Bonartsev A.P., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Bonartseva G.A. // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry – 2011. – Vol. 5. № 1. – P. 10–21.
7. Halami P. M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06 // World J Microbiol Biotechnol. – 2008. – Vol.24, – № 6. – P.805–812. https://doi.org/10.1007/s11274-007-9543-z
8. Korneli C. et al. High yield production of extracellular recombinant levansucrase by *Bacillus megaterium* // Appl Microbiol Biotechnol. – 2013. – Vol.97, – №8. – P.3343–3353. doi: 10.1007/s00253-012-4567-1

9. Schubert P., Steinbuchel A., Schlegel H.G. // J. Bacteriol. – 1988. – Vol.170, – №.12. – P.5837–5847.
10. Wu Q. et al. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2001. – Vol.80, – №2. – C.111–118. <https://doi.org/10.1023/A:1012222625201>
11. Yaraguppi D. A. et al. Response surface methodology-based optimization of biosurfactant production from isolated *Bacillus aryabhatai* strain ZDY2 // J Petrol Explor Prod Technol. – 2020. – Vol.10, – №6. – P.2483–2498. <https://doi.org/10.1007/s13202-020-00866-9>
12. Rysbek A. et al. Comparative Characterization and Identification of Poly-3-hydroxybutyrate Producing Bacteria with Subsequent Optimization of Polymer Yield // Polymers. – 2022. – Vol.14, – № 2. <https://doi.org/10.3390/polym14020335>
13. Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y. Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol.69, №6. – P.3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>
14. Arzumanov T. E., Shishkanova N. V., Finogenova T. V. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol // Appl Microbiol Biotechnol. – 2000. – Vol.53, №5. – P.525–529. doi.org/10.1007/s002530051651
15. Moresi M. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica* // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 1994. – Vol.60, №4. – P.387–395. <https://doi.org/10.1002/jctb.280600409>
16. Anastassiadis S., Rehm H.-J. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation // Electronic Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol.9, №1. – P.26–39.
17. Fatyhova A.R. Biosynthesis of citric acid by yeast *Yarrowia lipolytica* from glycerine-containing waste of biodiesel production: // diss. cand. biol. sciences: 03.01.06. 2011. Pushchino: IBFM RAS. P.139. [In Russian].
18. Rywińska A. et al. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica* // World J Microbiol Biotechnol. – 2010. – Vol.26, №7. – P.1217–1224. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0291-0>
19. Aslim B. et al. Poly-beta-hydroxybutyrate production by lactic acid bacteria // FEMS Microbiol Lett. – 1998. – Vol.159, №2. – P.293–297. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12874.x>
20. Richert A. et al. The Role of Birch Tar in Changing the Physicochemical and Biocidal Properties of Polylactide-Based Films // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol.23, №1. – P.268 <https://doi.org/10.3390/ijms23010268>
21. Olewnik-Kruszkowska E. Influence of the type of buffer solution on thermal and structural properties of polylactide-based composites // Polymer Degradation and Stability. – 2016. – Vol.129. – P.87–95. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.04.009>
22. Tarach I. et al. Influence of Tea Tree Essential Oil and Poly(ethylene glycol) on Antibacterial and Physicochemical Properties of Polylactide-Based Films // Materials. – 2020. – Vol.13, №21. <https://doi.org/10.3390/ma13214953>
23. ISO 15106-1:2007. Plastics - Films and boards - Determination of water vapor transmission rate - Part 1: Moisture sensor method, International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
24. ASTM F 1927-98. Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using coulometric detector, ASTM International, USA, 2004.
25. ASTM F2476-20. Standard Test Method for the Determination of Carbon Dioxide Gas Transmission Rate (CO₂TR) Through Barrier Materials Using an Infrared Detector, ASTM International, USA, 2020.
26. Sun Z. et al. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 // Appl Microbiol Biotechnol. – 2006. – Vol.71, №4. – P.423–431. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0191-7>
27. Muhammadi et al. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications // Green Chemistry Letters and Reviews. – 2015. – Vol.8, №3–4. – P.56–77. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
28. Schlegel H. G., Gottschalk G., Von Bartha R. Formation and Utilization of Poly- β -Hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria (*Hydrogenomonas*) // Nature. – 1961. – Vol.191, №4787. – P.463–465. <https://doi.org/10.1038/191463a0>
29. Yamaguchi T. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by a novel alginate-producing bacterium *Hydrogenophaga* sp. strain UMI-18 using alginate as a sole carbon source // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2019. – Vol.128, №2. – P.203–208. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.02.008>
30. Gouda M. K., Swellam A. E., Omar S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources // Microbiological Research. – 2001. – Vol.156, №3. – P.201–207. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00104>
31. Getachew A., Woldesenbet F. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material // BMC Res Notes. – 2016. – Vol.9, №1. – P.509. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
32. Labuzek S., Radecka I. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85 // J Appl Microbiol. – 2001. – Vol.90, №3. – P.353–357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01253.x>
33. Hamdy S. M. et al. Production and optimization of bioplastic (Polyhydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* strain SH-02 using response surface methodology // BMC Microbiol. – 2022. – Vol.22, №1. – P.183. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02593-z>
34. Djerrab L. et al. Potential use of *Bacillus paramycoides* for the production of the biopolymer

polyhydroxybutyrate from leftover carob fruit agro-waste // AIMS MICRO. – 2022. – Vol.8, №3. – P.318–337. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022023>

35. Amiri Kojuri S. et al. Production of Bioplastic (Polyhydroxybutyrate) with Local *Bacillus megaterium* Isolated from Petrochemical Wastewater // Iran J Biotechnol. – 2021. – Vol.19, №3. – P.e2849. <https://doi.org/10.30498/ijb.2021.244756.2849>

36. Adnan M. et al. Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization // Polymers. – 2022. – Vol.14, №19. <https://doi.org/10.3390/polym14193982>

37. Balakrishna Pillai A. et al. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhattai* // Brazilian Journal of Microbiology. – 2017. – Vol.48, №3. – P.451–460. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.005>

38. Balakrishna Pillai A., Jaya Kumar A., Kumarapillai H. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) in *Bacillus aryabhattai* and cytotoxicity evaluation of PHBV/poly(ethylene glycol) blends // 3 Biotech. – 2020. – Vol.10, №2. – P.32. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2017-9>

39. Chanasit W. et al. The production of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by a newly isolated *Bacillus* sp. ST1C using liquid waste from biodiesel production // Ann Microbiol. – 2014. – Vol.64, №3. – P.1157–1166. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0755-1>

REFERENCES

1. Mohapatra, Mohapatra S. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus* Strain Isolated from Waste Water and Its Biochemical Characterization // Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci. – 2017. – Vol.87, №2. – P.459–466. doi: 10.1007/s40011-015-0626-6

2. Brigham C. J., Sinskey A. J. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry // International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. – 2012. – Vol.1, №1. – P.53–60. doi.org/10.6000/1927-3037.2012.01.01.03

3. Misra S. K. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications // Biomacromolecules. – 2006. – Vol.7, №8. – P.2249–2258. doi: 10.1021/bm060317c

4. Bonarcev A.P., Iordanskij A.L., Bonarceva G.A., Boshomdzhev A.P., Zaikov G.E. // *Plasticheskie massy*. – 2010. – №3. – P.6–23. [In Russian].

5. Bonarcev A.P., Bonarceva G.A., Voinova V.V., Kirpichnikov M.P., Shajtan K.V. // *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. – 2018. – №6. – P.130–134. [In Russian].

6. Bonartsev A.P., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Bonartseva G.A. // *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry* – 2011. – Vol. 5. № 1. – P. 10–21.

7. Halami P. M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06 // World J Microbiol Biotechnol. – 2008. – Vol.24, – № 6. –

P.805–812. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9543-z>

8. Korneli C. et al. High yield production of extracellular recombinant levansucrase by *Bacillus megaterium* // Appl Microbiol Biotechnol. – 2013. – Vol.97, – №8. – P.3343–3353. doi: 10.1007/s00253-012-4567-1

9. Schubert P., Steinbuchel A., Schlegel H.G. // J. Bacteriol. – 1988. – Vol.170, – №.12. – P.5837–5847.

10. Wu Q. et al. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2001. – Vol.80, – №2. – C.111–118. <https://doi.org/10.1023/A:1012222625201>

11. Yaraguppi D. A. et al. Response surface methodology-based optimization of biosurfactant production from isolated *Bacillus aryabhattai* strain ZDY2 // J Petrol Explor Prod Technol. – 2020. – Vol.10, – №6. – P.2483–2498. <https://doi.org/10.1007/s13202-020-00866-9>

12. Rysbek A. et al. Comparative Characterization and Identification of Poly-3-hydroxybutyrate Producing Bacteria with Subsequent Optimization of Polymer Yield // Polymers. – 2022. – Vol.14, – № 2. <https://doi.org/10.3390/polym14020335>

13. Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y. Involvement of the Reserve Material Poly-β-Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol.69, №6. – P.3244–3250. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3244-3250.2003>

14. Arzumanov T. E., Shishkanova N. V., Finogenova T. V. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol // Appl Microbiol Biotechnol. – 2000. – Vol.53, №5. – P.525–529. doi.org/10.1007/s002530051651

15. Moresi M. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica* // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 1994. – Vol.60, №4. – P.387–395. <https://doi.org/10.1002/jctb.280600409>

16. Anastasiadis S., Rehm H.-J. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation // Electronic Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol.9, №1. – P.26–39.

17. Fatyhova A.R. Biosynthesis of citric acid by yeast *Yarrowia lipolytica* from glycerine-containing waste of biodiesel production: // diss. cand. biol. sciences: 03.01.06. 2011. Pushchino: IBFM RAS. P.139. [In Russian].

18. Rywińska A. et al. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica* // World J Microbiol Biotechnol. – 2010. – Vol.26, №7. – P.1217–1224. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0291-0>

19. Aslim B. et al. Poly-beta-hydroxybutyrate production by lactic acid bacteria // FEMS Microbiol Lett. – 1998. – Vol.159, №2. – P.293–297. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12874.x>

20. Richert A. et al. The Role of Birch Tar in Changing the Physicochemical and Biocidal Properties of Polylactide-Based Films // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol.23, №1. – P.268 <https://doi.org/10.3390/ijms23010268>

21. Olewnik-Kruszkowska E. Influence of the type

- of buffer solution on thermal and structural properties of polylactide-based composites // *Polymer Degradation and Stability*. – 2016. – Vol.129. – P.87–95. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.04.009>
22. Tarach I. et al. Influence of Tea Tree Essential Oil and Poly(ethylene glycol) on Antibacterial and Physicochemical Properties of Polylactide-Based Films // *Materials*. – 2020. – Vol.13, №21. <https://doi.org/10.3390/ma13214953>
23. ISO 15106-1:2007. Plastics - Films and boards - Determination of water vapor transmission rate - Part 1: Moisture sensor method, International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2007.
24. ASTM F 1927-98. Standard test method for determination of oxygen gas transmission rate, permeability and permeance at controlled relative humidity through barrier materials using coulometric detector, ASTM International, USA, 2004.
25. ASTM F2476-20. Standard Test Method for the Determination of Carbon Dioxide Gas Transmission Rate (CO₂TR) Through Barrier Materials Using an Infrared Detector, ASTM International, USA, 2020.
26. Sun Z. et al. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2006. – Vol.71, №4. – P.423–431. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0191-7>
27. Mohammadi et al. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications // *Green Chemistry Letters and Reviews*. – 2015. – Vol.8, №3–4. – P.56–77. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
28. Schlegel H. G., Gottschalk G., Von Bartha R. Formation and Utilization of Poly- β -Hydroxybutyric Acid by Knallgas Bacteria (*Hydrogenomonas*) // *Nature*. – 1961. – Vol.191, №4787. – P.463–465. <https://doi.org/10.1038/191463a0>
29. Yamaguchi T. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by a novel alginate-degrading bacterium *Hydrogenophaga* sp. strain UMI-18 using alginate as a sole carbon source // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2019. – Vol.128, №2. – P.203–208. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.02.008>
30. Gouda M. K., Swellam A. E., Omar S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources // *Microbiological Research*. – 2001. – Vol.156, №3. – P.201–207. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00104>
31. Getachew A., Woldesenbet F. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material // *BMC Res Notes*. – 2016. – Vol.9, №1. – P.509. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
32. Labuzek S., Radecka I. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85 // *J Appl Microbiol*. – 2001. – Vol.90, №3. – P.353–357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01253.x>
33. Hamdy S. M. et al. Production and optimization of bioplastic (Polyhydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* strain SH-02 using response surface methodology // *BMC Microbiol*. – 2022. – Vol.22, №1. – P.183. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02593-z>
34. Djerrab L. et al. Potential use of *Bacillus paramycoides* for the production of the biopolymer polyhydroxybutyrate from leftover carob fruit agro-waste // *AIMSMICRO*. – 2022. – Vol.8, №3. – P.318–337. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022023>
35. Amiri Kojuri S. et al. Production of Bioplastic (Polyhydroxybutyrate) with Local *Bacillus megaterium* Isolated from Petrochemical Wastewater // *Iran J Biotechnol*. – 2021. – Vol.19, №3. – P.e2849. <https://doi.org/10.30498/ijb.2021.244756.2849>
36. Adnan M. et al. Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization // *Polymers*. – 2022. – Vol.14, №19. <https://doi.org/10.3390/polym14193982>
37. Balakrishna Pillai A. et al. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai* // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2017. – Vol.48, №3. – P.451–460. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.005>
38. Balakrishna Pillai A., Jaya Kumar A., Kumarapillai H. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) in *Bacillus aryabhatai* and cytotoxicity evaluation of PHBV/poly(ethylene glycol) blends // *3 Biotech*. – 2020. – Vol.10, №2. – P.32. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2017-9>
39. Chanasit W. et al. The production of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by a newly isolated *Bacillus* sp. ST1C using liquid waste from biodiesel production // *Ann Microbiol*. – 2014. – Vol.64, №3. – P.1157–1166. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0755-1>

OPTIMIZATION OF THE CULTURE METHOD FOR THE MOST EFFECTIVE SYNTHESIS OF POLYHYDROXYBUTYRATE BY THE *BACILLUS ARYABHATAI* RAF 5 STRAIN AND ANALYSIS OF BARRIER PROPERTIES OF THE OBTAINED MEMBRANE

*Rysbek A., Shamukhan A., Abeldenov S.

National Center for Biotechnology, 13/5 Korgalzhynskoye Road, Astana, 010000

*Corresponding author: rysbek@biocenter.kz

ABSTRACT

The method of periodic updating (PU) or the periodic addition (PA) of fresh medium is considered as a promising technique for long-term and effective production of polyhydroxybutyrate (PHB) synthesized by different soil bacteria. In our previous studies, we reported PHB-producing potential of the *Bacillus aryabhatai* strain RAF 5 IMD B - 462 isolated from the chestnut soils in Astana city, Kazakhstan. The current study reports on the optimization of the RAF 5 cultivation using PU technology to obtain a high yield of PHB and biomass, as well as on the study of a membrane obtained on the basis of PHB. The accumulation of dense PHB granules in cell cytosol was confirmed by Transmission Electron Microscopy (TEM) analyses; more than 10 granules per cell were found in the cytosol of RAF 5. PHB was further extracted using the solvent extraction method. The highest PHB yield and biomass obtained after 72-hour incubation were 18.03 g/L and 20.04 g/L, respectively, when PU was applied. The highest PHB titer after 120-hour incubation was 3.76 g/L, when RAF 5 was growing in a conventional culture medium NB. The obtained PHB was further utilized to make a membrane sample which was subjected to water vapor, oxygen and carbon dioxide gas permeability analyses showing the promising results. In conclusion, this data proposes potential application might be utilized as a promising material to produce membranes.

Keywords: *Bacillus aryabhatai*; Polyhydroxybutyrate; Permeability of membranes; Periodic updating (PU); Transmission Electron Microscopy (TEM); Soil bacteria of Kazakhstan.

BACILLUS ARYABHATAI RAF 5 ШТАМЫ АРҚЫЛЫ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТ ЕҢ ТИІМДІ СИНТЕЗДЕУГЕ АРНАЛҒАН ДАҚЫЛДАУ ӘДІСІН ОҢТАЙЛАНДЫРУ ЖӘНЕ АЛЫНҒАН МЕМБРАНАНЫҢ ТОСҚАУЫЛДЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ТАЛДАУ

* Рысбек А., Шамухан А., Абельденов С.

Ұлттық биотехнология орталығы, 010000, Қазақстан, Астана қ., Қорғалжын тас жолы, 13/5

* Корреспондент автор: rysbek@biocenter.kz

ТҮЙІН

Жаңа органы мерзімді жаңарту (МЖ) немесе мерзімді қосу (МК) әдісі топырақ бактериялары синтездейтін полигидроксибутиратты (ПГБ) ұзақ мерзімді және тиімді өндіру үшін перспективалы техника ретінде қарастырылады. Біздің алдыңғы зерттеулерімізде Астана қаласының қара топырағынан оқшауланған *Bacillus aryabhatai* RAF 5 IMD B - 462 штаммының ПГБ өндіру әлеуеті хабарланған болатын. Ағымдағы зерттеу ПГБ және биомассаның жоғары шығымдылығын алу үшін МЖ технологиясын қолдана отырып, RAF 5 штаммын өсіру әдісін оңтайландыру, сондай-ақ ПГБ негізінде алынған мембрананы зерттеу нәтижелерін баяндайды. Жасуша цитозолінде тығыз ПГБ гранулаларының жиналуы трансмиссиялық электронды микроскопия (ТЭМ) талдаулары арқылы расталды; RAF 5 жасушаларының цитозолінде бір жасушаға 10-нан астам гранула анықталды. ПГБ одан әрі еріткіш экстракция әдісімен бөлінді. 72 сағаттық инкубациядан кейін МЖ қолданылған кезде ең жоғары ПГБ шығымдылығы мен биомассасы сәйкесінше 18,03 г/л және 20,04 г/л болды. 120 сағаттық инкубациядан кейін дәстүрлі қоректік сорпа мәдени ортасында өсірілген RAF 5 штаммының ең жоғары ПГБ титрі 3,76 г/л құрады. Алынған ПГБ мембрана үлгісін жасау үшін пайдаланылды, ол су буы, оттегі және көмірқышқыл газының өткізгіштік талдауларына ұшырады, нәтижесінде перспективалы нәтижелер көрсетілді. Қорытындылай келе, бұл деректер ПГБ мембраналар өндірісі үшін перспективалы материал ретінде қолданылуы мүмкін екенін ұсынады.

Кілт сөздер: *Bacillus aryabhatai*; Полигидроксибутират; Мембраналардың өткізгіштігі; Мерзімді жаңарту (МЖ); Трансмиссиялық электронды микроскопия (ТЭМ); Қазақстанның топырақ бактериялары.