


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

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Синтез полигидроксиалканоатов с 3-меркаптопропионатом бактериями  
*Cupriavidus necator B-10646*

Научный  
руководитель



Подпись, дата

Должность,      ученая  
степень

Жила Н.О.

Инициалы,  
фамилия

Выпускник



Подпись, дата

Сидорчук  
М.А.

Инициалы,  
фамилия

Красноярск 2020

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Синтез полигидроксиалканоатов с 3-меркаптопропионатом бактериями *Cupriavidus necator B-10646*» содержит 32 страницы и включает в себя 25 литературных источника, 11 рисунков.

БИОРАЗЛАГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ,  
CUPRIAVIDUS NECATOR, 3,3-ТИОДИПРОПИОНОВАЯ КИСЛОТА, 3-ГИДРОКСИБУТИРАТ, 3-МЕРКАПТОПРОПИОНАТ.

Цель работы: исследовать влияние 3,3-тиодипропионовой кислоты на ростовые характеристики бактерий *Cupriavidus necator B-10646*.

Актуальность данной работы заключается в получении сополимера с ЗМП, который является более ценным, чем гомополимер поли(3-гидроксибутират), так как характеризуются повышенной термической стабильностью.

В ходе работы было исследовано накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator B-10646* при использовании в качестве субстрата предшественника 3,3-тиодипропионовой кислоты. Показано, что 3,3-тиодипропионовая кислота не оказывает токсического действия на рост культуры. С увеличением концентрации 3,3-тиодипропионовой кислоты увеличивался выход полимера (от  $27,4 \pm 1,2\%$  при 0,5 г/л до  $43,4 \pm 0,7\%$  при 2 г/л). Процентное содержание 3-меркаптоприоната в полимере уменьшалось при увеличении концентрации 3,3-тиодипропионовой кислоты (с  $14,7 \pm 0,5\%$  до  $6,3 \pm 0,4\%$ ).

## Оглавление

РЕФЕРАТ .....	2
Введение .....	4
Глава 1. Обзор литературы .....	6
1.1 Полигидроксиалканоаты .....	6
1.2. Политиоэферы (ПТЭ) .....	13
1.3. Свойства ПТЭ .....	15
1.4. Биodeградируемость политиоэфиров .....	16
1.5. Биосинтетический путь Поли(3ГБ-со-3МП).....	18
Глава 2. Материалы и методы .....	21
2.1 Объект исследования .....	21
2.2 Культивирование бактерий.....	21
2.3 Анализ проб .....	22
2.3.1 Измерение концентрации клеток в процессе культивирования. ....	22
2.3.2 Определение биомассы клеток .....	22
2.3.3 Определение содержания в клетках состава ПГА .....	23
2.3.4 Выделение полимера и определение его молекулярной массы.....	23
2.4 Методы обработки данных .....	24
Результаты и обсуждение. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ВЫВОДЫ.....	26
Список литературы: .....	27

## Введение

Наличие, доступность и возможность использования ископаемых источников углерода ограничены. Нехватка и высокая стоимость ископаемых ресурсов ставят вопрос о том, что актуальность альтернативных ресурсов должна возрасти в ближайшем будущем. Биотехнологические процессы для производства энергии и химических веществ на сегодняшний день вызывают большой интерес, так как они могли бы помочь решить эти проблемы.

В последние годы биотехнологическое производство было сосредоточено только на синтезе биоразлагаемых веществ – полимеров, необходимых для замены их на аналоги, полученные из нефтепродуктов. В отличие от этого, биотехнологическому производству из небiodeградируемых полимеров было уделено мало внимания до сих пор, хотя уже сейчас существует спрос на большие объемы стойких материалов.

Современное строительство жилых домов, автомобили и другие крупные разработки будут немыслимы и непрактичны без наличия стойких полимеров, такие как полиэтилен, полистирол или поливинилхлорид. Однако все эти полимеры являются синтетическими.

Термин "не поддающиеся биологическому разложению биополимеры» противоречит одной интересной парадигме. Согласно ей все соединения, которые синтезируются с помощью живого вещества, так или иначе должны поддаваться биологическому разложению. Ранее считали, что не поддающиеся биологическому разложению соединения встречаются только среди ксенобиотиков-полностью синтетических химических соединений, не встречающихся в природе[1]

Серосодержащие сополимеры-политиоэффиры, которые являются целью изучения в данной работе, не следуют этой парадигме, потому что они хоть и производятся бактериями, но устойчивы к микробной деградации.

Перспективы для производства стойких биополимеров биотехнологическим способом из возобновляемых ресурсов увеличиваются по мере того, как у человечества растет потребность в неподдающихся биологическому разложению полимерах, а способы их получения из возобновляемых ресурсов в скором времени будут быть очень ценным.

Целью настоящей работы было исследование влияния 3,3-тиодипропионовой кислоты на ростовые характеристики бактерий *Cupriavidus necator B-10646*.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1) Исследовать возможность использования бактериями серосодержащих кислот в качестве единственного субстрата для роста и синтеза полимера;

2) Изучить рост бактерий и синтез полимера при использовании в качестве источников углерода 3,3-тиодипропионовую кислоту с различной концентрацией.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Полигидроксиалканоаты

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот, синтезированные микроорганизмами для хранения энергии. В отличие от других биоразлагаемых полиэфиров, ПГА синтезируются *in vivo*, тогда как остальные синтезируются *in vitro*, то есть химическим путем. Бактерии хранят ПГА в цитоплазме, где ПГА существуют в виде гранул размером от 0,2 до 0,5 мкм.[272]

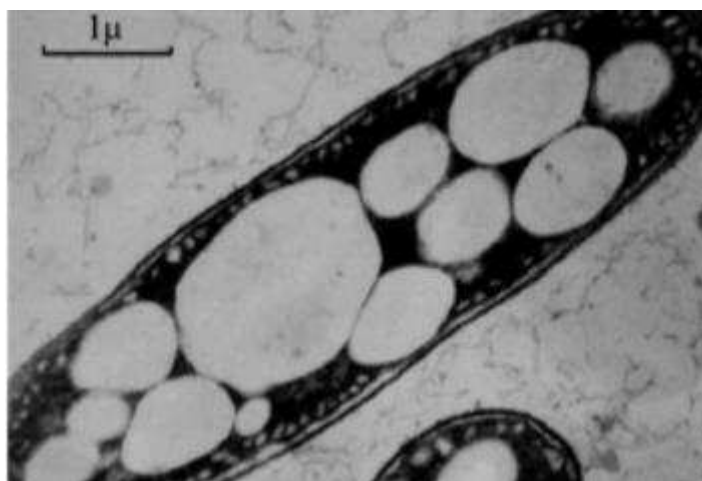


Рисунок 1.-Гранула ПГА в клетках бактерий *Azotobacter chroococcum* (трансмиссионный электронный микроскоп) [3]

Бейеринк первым обнаружил ПГА в клетках бактерий в 1888 г. Французский ученый Лемоин впервые описал ПГА в клетках *Bacillus megaterium* в виде поли(3-гидроксибутирата) П(ЗГБ) в 1925 г. [4]

Позже Макре и Улкинсон в 1958 году в своем докладе указали на быструю биоразрушаемость П(ЗГБ). С этого момента интерес к П(ЗГБ) возрос.

В последующие годы производились исследования П(ЗГБ) и других представителей класса ПГА, с использованием различных микроорганизмов.

И после этого стали реализовываться возможные виды применения для данного типа полимера. [5]

Данное семейство полимеров различной химической структуры различается базовыми физико-химическими свойствами.

ПГА обладают привлекательными свойствами для различных сфер, включая и биомедицинскую. Перспективность ПГА обуславливается существованием таких преимуществ этого класса биоматериалов как:

1. Высокая биосовместимость ПГА, в частности, поли-3-гидроксибутирата. Это связано с тем, что мономер,  $(C_4H_6O_2)$  который образует полимер – 3-гидроксималяная кислота – является естественным метаболитом тканей и клеток организмов;

2. ПГА не гидролизуются в жидких средах. Это связано с тем, что деградация ПГА- это естественный и биологический процесс, который происходит клеточными и гуморальными путями. В ходе этого процесса образуются мономеры гидроксималяной кислоты, не вызывающие резкого закисления тканей;

3. скорость биологической резорбции ПГА значительно ниже, чем полилактидов и полигликолипидов. Изделия из ПГА, в зависимости от формы и места имплантации, *in vivo* могут функционировать от нескольких месяцев до 2-3 лет. И более того, скоростью деградации ПГА можно управлять;

4. ПГА получают методом прямой ферментации, их синтез не требует таких технологических этапов, как синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов;

5. сырьем для синтеза ПГА могут являться сахара, органические кислоты, спирты, смеси углекислого газа и водорода, продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы, производства сахара,

пальмового масла, водосодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина.

Общая структура ПГА проиллюстрирована на Рисунке 2.

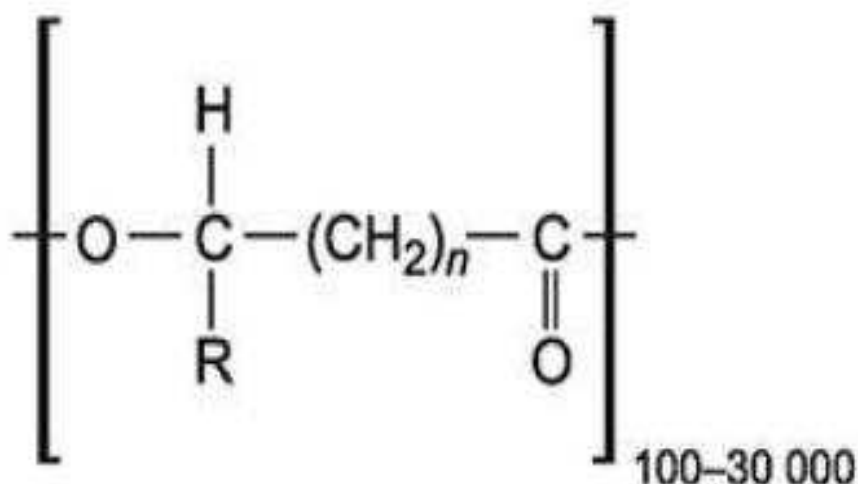


Рисунок 2. - Общая химическая формула полигидроксиалканоатов (ПГА)

В зависимости от строения мономеров, которые входят в состав ПГА, они могут быть разделены на такие основные группы как [6]:

#### 1. Короткоцепочечные ПГА.

Они состоят из 3-5 атомов углерода. Наиболее известными представителями этого класса являются поли-3-гидроксибутират, а так же его сополимеры с 3-гидроксивалератом. Поли-3-гидроксибутират является гомополимером D(-)-3-β-оксимасяной кислоты и представляет собой полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) [7]. Из всех ПГА, Поли(3ГБ) наиболее часто встречается в природе. Это самый простой ПГА по отношению к химической структуре, имеющие метилен группу (-CH<sub>2</sub>). В состав полимера входят углерод (81%), водород (7,03%) и кислород (37,16 %). Мономеры, такие как 3-гидроксивалерат и 4-гидроксибутират,



включают в ПГБ цепи с использованием специфических добавок в среде для роста бактерий [8].

2. ПГА со средней длиной цепи, которые имеют от 6 до 14 атомов углерода. Для синтеза средней длины цепи в качестве продуцента специально используют псевдомонад, а в качестве субстрата алифатические углеводороды, такие как н-алканы, н-алканоаты, или н-алканола.

3. Длинноцепочечные ПГА, с содержанием свыше 14 атомов углерода.

ПГА также можно систематизировать не только по длине углеродной цепи кислоты, но и по его компонентному составу:

- Однокомпонентные. Это ПГА, которые состоят только из короткоцепочечных мономеров. Например: поли(3-гидроксibuтират).
- Многокомпонентные, Это ПГА, состоящие из коротко- и средне- и длинноцепочечных мономеров или же различные их сочетания и вариации.

ПГА для клетки - это резервные макромолекулы, которые синтезируют прокариоты в лимитированных условиях несбалансированного роста. При этом ограничен синтез внутриклеточных молекул, которые содержат азот.

Синтезируют ПГА на сегодняшний день такие известные микроорганизмы, как: гетеротрофы, аэробные и анаэробные бактерии, хемоорганотрофы, хемоавтотрофы, архебактерии, фототрофные прокариоты, аэробные фотобактерии, олиготрофные полипростековые бактерии, анаэробные фототрофные бактерии и другие.

Окислительно-восстановительное состояние цитоплазмы и внутриклеточная концентрация ацетил-КоА и свободного КоА являются

условиями, которые обеспечивают изменение направления конструктивного обмена клеток в сторону синтеза и аккумуляции ПГА.

При аэробных условиях, ПГА разлагаются до углекислого газа и воды. В то время как в анаэробных условиях, в результате деградации ПГА образуют углекислый газ и метан. ПГА также имеют способность разрушаться в организме человека.

В последние годы ПГА были использованы при изготовлении нескольких медицинских материалов, таких как шовные нити, хирургические сетки, заменители кожи, сосуды, клапаны, костные пластины.

Область применения ПГА расширяется. Все потому что ПГА очень широко различаются друг между другом и по физическим свойствам (гибкости, кристалличности, температуре плавления и др.), а так же по и физиолого-биохимическим свойствам.

ПГА обладают такими ценными физико-химическими свойствами как: температурные характеристики, скорость биологического распада, биологическая совместимость, кристалличность, эластичность, механическая прочность. Но самое важное то, что каждым из этих свойств можно управлять, при этом варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру.

Накопление полимера в бактериальной клетке может быть определено достаточно легко. ПГА накапливаются в виде дискретных нерастворимых в воде гранул, так что оптический микроскоп, работая в режиме фазового контраста, может быть использован для обнаружения таких гранул в цитоплазме клетки. Диаметр ПГА гранул составляет от 0,2 до 0,5 мкм в диаметре.

ПГА не гидролизуются в жидких средах. Это все потому, что деградация ПГА является естественным, истинным, биологическим процессом, который происходит через клеточные и гуморальные пути.

Кроме того, скоростью деградации ПГА тоже можно управлять [9]. Ранее было показано, что основная роль в формировании состава ПГА принадлежит субстрату – алкановым кислотам. На количественный выход ПГА очень сильно влияют соединения фосфора и пептон.

Среди ПГА наиболее распространенным является поли(3-гидроксибутират) П(ЗГБ) - полимер 3-гидроксималесляной кислоты, именно он и был открыт первым. Поли(ЗГБ) является наиболее распространенным типом и лучше характеризует ПГА.

П(ЗГБ)- это первый ПГА, который содержит в себе только мономеры ЗГБ. П(ЗГБ) по физическим свойствам сопоставим с обычным пластиком, таким как полипропилен, с точки зрения температуры плавления, кристалличности, молекулярной массы и предела прочности при растяжении.

Большинство доступных биоразлагаемых пластиков имеют определенные недостатки, поскольку они водорастворимы и чувствительны к влаге [10].

П(ЗГБ) преодолел проблемы чувствительности к влаге, так как теперь он проявляет устойчивость к влаге, обладает лучшей оптической чистотой и нерастворим в воде. Данный полимер также показывает хорошую кислородную проницаемость.

П(ЗГБ) имеет высокий уровень термостойкости - до  $130^{\circ}\text{C}$ , также данный полимер имеет лучшую стойкость к ультрафиолетовым лампам, в сравнении с полипропиленом[10].

При таких уникальных свойствах П(ЗГБ), практическое применение этого полимера ограничено из-за его низкой ударной вязкости. П(ЗГБ) представляет из себя высокожесткий, кристаллический и относительно хрупкий термопластик.

Температура плавления П(ЗГБ) при  $175^{\circ}\text{C}$  лишь немного ниже, чем его температура деградации. Это является главной причиной, что затрудняет его термическую обработку.

Вследствие чего, на данный момент обширные работы направлены на синтез сополимеров, которые обладают наиболее лучшими свойствами, чем гомополимер П(ЗГБ). Включение субстратов, таких как 3-меркаптопропионат, может привести к улучшению физико-химических свойств, а именно большей прочности и гибкости.

На сегодняшний день известны способы получения многокомпонентных и разнообразных по составу ПГА, образованных не только мономерами 3-гидроксibuтирата, но и другими мономерами, такими как: 2-гидроксibuтиратом, 2-гидроксивалератом, 3-гидроксивалератом, 3-гидроксигексаноатом, 3-гидроксioктаноатом, 3-гидроксидодеканоатом, а также 4-гидроксibuтиратом, 4-гидроксивалератом и их сополимерами, штаммами-продуцентами.

ПГА с данными включениями, в отличие от гомогенного П(ЗГБ), имеют наиболее лучшие физико-химические свойства и характеризуются большей механической прочностью и эластичностью, способностью перерабатываться в разнообразные изделия с высокими физико-механическими характеристиками и более высокой скоростью биодegradации в биологических средах.

Сополимерные ПГА различного химического состава более перспективны, однако их получение – весьма сложная технологическая задача, так как для их получения в состав среды, как правило, необходимо внесение дополнительных источников углерода в качестве субстратов-предшественников целевых мономеров, которые в подавляющем большинстве ингибируют рост бактерий.

Впоследствии добавление предшественников на стадии культивирования негативно сказывается на общей продуктивности процесса биосинтеза, а именно на приросте биомассы клеток, и на выходах сополимеров.

Полигидроксиалканоаты имеют огромный потенциал использования в самых различных областях: в хирургии и фармацевтике, в сельском

хозяйстве, пищевой промышленности - в качестве упаковочного материала, в косметологии и многих других областях. ПГА обладают самыми разнообразными свойствами, благодаря более чем 150 вариациям мономеров [11]

## 1.2. Политиоэфиры (ПТЭ)

Политиоэфиры (ПТЭ) - это не поддающиеся биологическому разложению биополимеры, полученные из возобновляемых ресурсов. Они имеют более привлекательные физические свойства, если сравнивать их с аналогами ПГА. ПТЭ демонстрируют значительно повышенную термическую стабильность и более высокую температуру плавления.

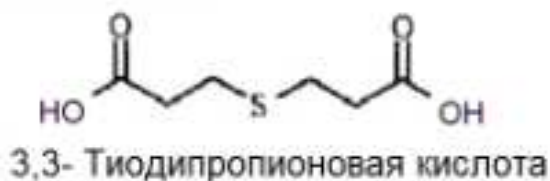


Рисунок 3. - Структурная формула предшественника 3,3-тиодипропионовой кислоты

Из-за высокой стойкости к микробной деградации ПТЭ могут быть ценными материалами для применения в тех областях, в которых необходимы стойкие и прочные материалы, например, в строительстве и автомобилестроении или в других специальных технических производствах [12].

Политиоэфиры (ПТЭ) могут быть пригодны в качестве антиоксидантных ингредиентов для синтетических полимеров, красок и

смазочных материалов. Кроме того, антибактериальные свойства ПТЭ обуславливаются из-за содержания серы в полимере.

Недавно было показано, что некоторые микроорганизмы способны синтезировать не только ПГА, но также способны синтезировать полимеры из меркаптоалкановых кислот [13], которые обычно называют политиоэфирами (ПТЭ). В то время как строительные блоки ПГА ковалентно связаны оксоэфирными связями, в ПТЭ они связаны тиоэфирными связями. Как ПГА, политиоэфиры синтезируются с помощью ПГА-синтазы, которая является ключевым ферментом биосинтеза ПГА [Error! Reference source not found.].

ПТЭ представляют собой новый класс биополимеров. Первоначально ПТЭ получали только путем ферментации микроорганизмов [14]. Эти исследования привели к тому, что в итоге получали сополимеры из двух или трех различных строительных блоков, содержащие 3-гидроксibuтират (ЗГБ), 3-гидроксивалерат (ЗГВ), 3-меркаптопропионат (ЗМП), 3-меркаптобутират (ЗМБ) и 3-меркаптовалерат (ЗМВ), которые были связаны как оксоэфирными, так и тиоэфирными связями.

Биотехнологический синтезированный политиоэфир (ПТЭ) появился более девятнадцати лет назад. Он был выделен из *Ralstonia eutropha* H16 [Error! Reference source not found.]. Этот ПТЭ синтезировался из 3-меркаптопропионовой кислоты (ЗМП) и 3-гидроксимасляной кислоты (ЗГМ), которые были в качестве субстратов-предшественников.

На сегодняшний день поли(ЗМП) является единственным гомополимером ПТЭ, который доступен в больших количествах. Его получают путем ферментации рекомбинантного штамма кишечной палочки, что может быть легко произведено в производственном масштабе [16].

Также было описано получение ПТЭ в бесклеточных системах с использованием микробных липаз в качестве биокатализаторов [17].

Например, было показано, что максимальные молекулярные массы линейного сополимерного ПТЭ, образованного тиоэтерификацией или

транстиоэтерификацией 1,12-додекандиевой кислоты или ее диэтилового эфира с 1,6-гександитиолом в присутствии иммобилизованного микробного липазного препарата из *Rhizomucormiehei*, достигали 13200 Да [17].

Кроме ЗМП, существуют такие органические соединения серы как 3,3-тиодипропионовая кислота (ТДП) и 3,3-дитиодипропионовая кислота (ДТДП).

Оба предшественника имеют преимущества по сравнению с ЗМП. В то время как более высокие концентрации ЗМП серьезно ухудшают рост *R. eutropha* H16, ТДП и ДТДП являются нетоксичными органическими соединениями. [Error! Reference source not found.].

По результатам исследования Лютке-Эверслоха и Steinbuehlea, при использовании ТДП в качестве субстрата-предшественника уменьшается суммарный выход ПТЭ с одновременным увеличением содержания ЗМП.

### 1.3. Свойства ПТЭ

Если сравнивать ПТЭ и ПГА, то друг от друга они отличаются лишь тем, что между мономерами полимера находятся не атомы кислорода (как у ПГА), а атомы серы. Это и приводит к заметным различиям в свойствах полимеров.

Если проанализировать ПГА и ПТЭ по молекулярной массе, то они оба представляют полимеры с массой не менее 150000 Да.

Таким образом, молекулярные массы этих политиоэфиров сопоставимы с ПГА. Но в отличие от этого, ПТЭ, которые получены с помощью ферментативного синтеза, имеют гораздо более низкую молекулярную массу в диапазоне от 9000 до 34 000 Да [18].

Тепловые характеристики полимеров, содержащих атомы серы в основных связях, проявляют заметные отличия от полимеров, которые содержат атомы соответствующих кислородсодержащих соединений. Это было показано на синтетических полимерах, таких как Поли (этиленсульфид)

и Поли (этиленоксид), которые имеют температуру плавления 216,8 °С или 67,8 °С соответственно. Только несколько сополимеров демонстрируют сходные значения температуры плавления в широком диапазоне- это полимеры с сомономерами-Поли(ЗГБ-со-ЗМП) и Поли(ЗГБ-со-ЗГП) [19].

Поли(ЗМП) проявлял самые интересные и неожиданные свойства. Во-первых, температура плавления гомополимера Поли(ЗМП) 170,8 °С, тогда как у Поли(ЗГП) 121,8 °С. Все остальные гомополимеры ПТЭ демонстрируют более низкую температуру плавления, чем соответствующие полиэфирные гомологи. [19].

Во-вторых, термогравиметрический анализ следа выявил значительно высокую термическую стабильность Поли(ЗМП) по сравнению с Поли(ЗГП) [27]. Интересно, что термограммы ПТЭ гомополимеров Поли(ЗМБ) и Поли(ЗМВ) были аналогичными, как у полиоксоэфира Поли (ЗГБ).

В-третьих, при комнатной температуре, Поли(ЗМП) гомополимер практически нерастворим во всех исследованных до сегодняшнего дня растворителях [19], в то время как растворители найдены для Поли(ЗМБ)и Поли(ЗМВ).

#### **1.4. Биodeградируемость политиоэфиров**

После того, как открыли ПТЭ, они стали представлять интерес для многих ученых. Вдруг как и их полиоксоэфирные гомологи, серосодержащие биополимеры являются биоразлагаемыми, и если да, то какие именно ферментативные системы катализируют их деградацию.

Знания о биodeградируемости и поведении ПТЭ в окружающей среде является необходимым условием для развития технических направлений.

На сегодняшний день есть несколько обширных исследований, на основе которых можно доказать, что гомополимеры ПТЭ не поддаются биологическому разложению.



Большая часть исследований были проведены с Поли(ЗГБ-со-ЗМП) сополимерами и с Поли(ЗМП) гомополимером, потому что только данные полимеры были доступны в достаточном количестве.

Внеклеточные ПГА-деполимеразы, которые секретируются с помощью многих микроорганизмов в присутствии ПГА, были исследованы очень подробно [20] и рассмотрены как наиболее вероятные кандидаты на расщепление ПТЭ.

Хорошо изученные ПГА-деградирующие бактерии и ПГА деполимеразы инкубировали в присутствии Поли(ЗГБ-со-ЗМП). В результате исследования все бактерии были способны образовывать четкие зоны на агаровых пластинках, которые содержали соответствующий полимер, помещенный на агаровую накладку. Тем не менее, диаметры прозрачных зон и размеры колоний уменьшались с увеличением молярной концентрации ЗМП в сополимере [20]. Никаких четких зон или роста колоний не было замечено на накладных агаровых пластинах, содержащих Поли(ЗМП) или Поли(ЗМБ) гомополимеры [20].

Некоторые бактерии, например *Schlegelella thermodepolymerans*, хоть и смогли вырасти на Поли(ЗГБ-со-ЗМП), Поли(ЗГБ) и других полиоксоэфирах, однако, они были неспособны использовать Поли(ЗМП) как единственный источник углерода для роста или образования четких зон на накладных агаровых пластинах, содержащих этот гомополимер [21].

Обширные попытки обогащения Поли(ЗМП) деградирующими бактериями из различных сред обитания, при разных условиях культивирования потерпели неудачу. Бактерии, которые содержат Поли(ЗМП), не могли деградировать даже после культивирования в течение нескольких месяцев. Кроме того, образцы полимеров не проявляли никаких признаков деградации, указывая на то, что бактерии способные расщеплять ПТЭ также отсутствуют [21].

Так же различные очищенные ПГА-деполимеразы из *Paucimonas lemoignei*, *Pseudomonas indica* и *Streptomyces thermodepolymerans* не проявляли никакой активности ни с одним из ПТЭ гомополимерами *in vitro*. С Поли(ЗГБ-со-ЗМП) сополимерами гидролиз наблюдался со всеми деполимеразами, кроме одной ПГА-деполимеразы (PhaZ7 от *P. lemoignei*).

Активность штамма уменьшалась с увеличением содержания ЗМП, так же отсутствие активности деполимераз были измерены с помощью гомополимеров ПТЭ [20].

При детальном анализе продуктов разложения, полученных из Поли(ЗГБ-со-ЗМП), было доказано следующее. В отличие от оксоэфирных связей, тиоэфирные связи в сополимерах не были восприимчивы к ПГА-деполимеразам [20].

Данные исследования ясно показали, что ПГА-деградирующие бактерии или ПГА-деполимеразы не способны расщеплять тиоэфирные связи в структуре ПТЭ.

В результате данных экспериментов можно сказать, что благодаря добавлению разных предшественников в ходе культивирования можно отрегулировать не только физические и термические свойства дальнейшего полимера, но также и его биodeградируемость.

### **1.5. Биосинтетический путь Поли(ЗГБ-со-ЗМП)**

В качестве предварительного условия для биосинтеза ПГА, предоставленный источник углерода должен транспортироваться в клетки, а затем метаболизироваться через центральные пути (например,  $\beta$ -окисление жирных кислот, цикл лимонной кислоты, синтез жирных кислот) или через специальные пути к гидроксиацилкоэнзимтиоэфиру[23].

Проще всего гидроксипропионовая кислота может быть непосредственно активирована до соответствующего кофермента тиоэфира А, который служит субстратом для ПГА-синтазы. А данный фермент является ключевым в синтезе ПГА, катализирующий реакцию полимеризации.

Таким образом, поглощение и активация 3-меркаптопропионовой кислоты до ЗМП-КоА и последующее включение в Поли(ЗГБ-со-ЗМП) наиболее вероятно произойдет в культуре бактерий, если 3,3-тиодипропионовая кислота будет обеспечена в качестве источника углерода.

Конверсия ЗМП в ЗМП-КоА была показана, например, в митохондриях сердца крысы, где она катализируется среднецепочечной ацил-КоА-синтетазой.

Описаны ингибирующие эффекты на ферменты  $\beta$ -окислительного пути в митохондриях, вызванные ЗМП-КоА [23], возможно, объясняя ингибирование роста штаммов бактерий из-за более высоких концентраций 3-меркаптопропионовой кислоты в средах.

Что касается катаболизма TDP, то данная кислота в ходе ферментативного разложения, преобразуется в ЗГБ и ЗМП. ЗМП и ЗГБ впоследствии преобразуются в соответствующие тиоэфиры КоА.

Интересно, что ЗМП-КоА, очевидно, используется в качестве субстрата ПГА-синтазой и, что удивительно, ПГА-синтаза, очевидно, способна катализировать образование как оксоэфирных, так и тиоэфирных связей.

Хорошо известен широкий субстратный диапазон ПГА-синтаз, о чем свидетельствует различная длина углеродной цепи и наличие различных заместителей в алкильной части [19].

Каталитический механизм действия ПГА-синтазы включает две тиоловые группы, которые получают из двух цистеиновых остатков субъединиц фермента, образующих гомодимер [24].

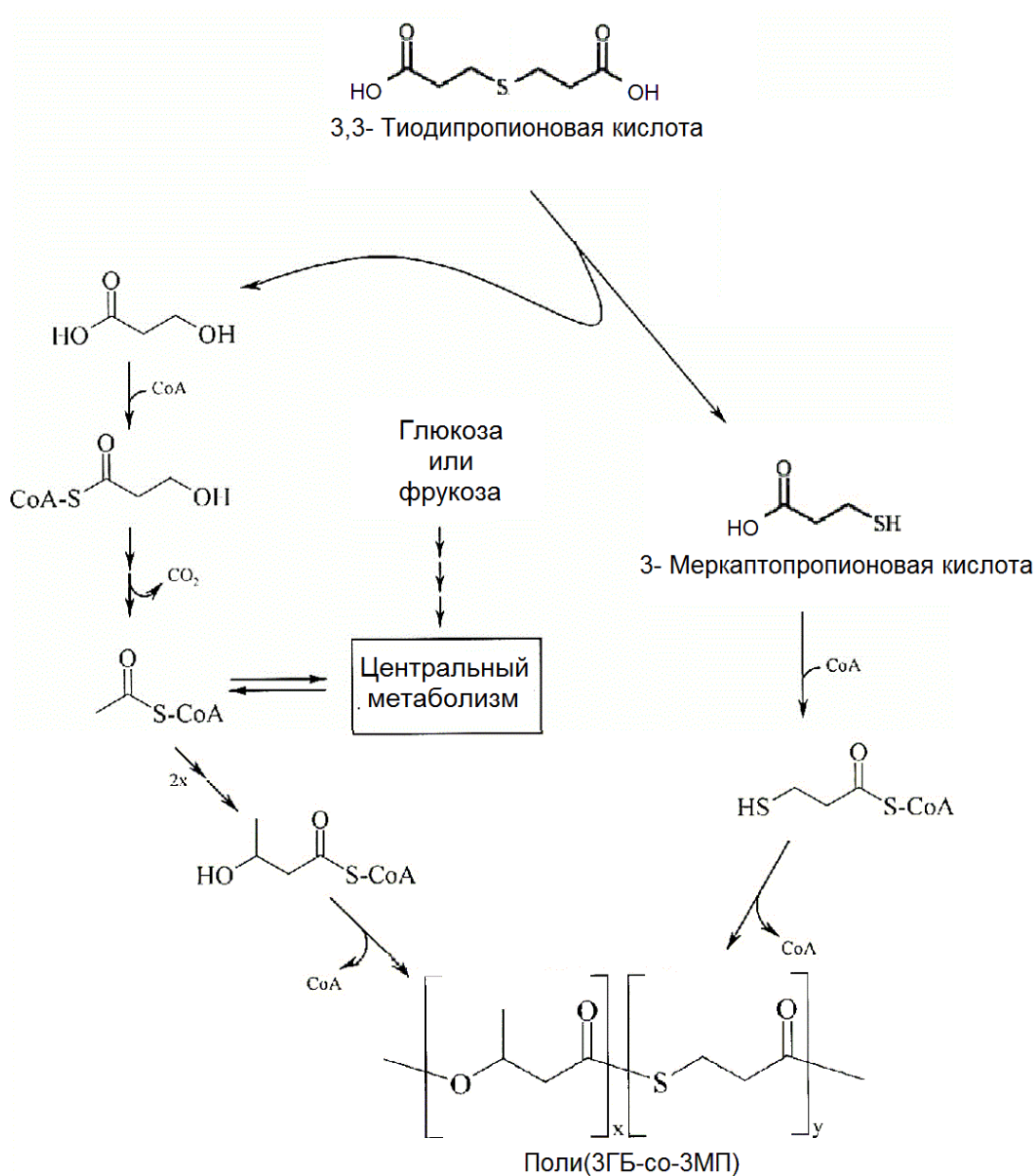


Рисунок 4.- Биосинтез Поли(ЗГБ-со-ЗМП) из 3,3-тиодипропионовой кислоты

Эти тиоловые группы ковалентно связывают растущую полиэфирную цепь и компоненты, которые будут включены в течение следующего витка цикла. Тиольная группа ЗМП, очевидно, также может обеспечить свободную электронную пару для этой нуклеофильной атаки, и МП включается, что приводит к образованию тиоэфира.

Таким образом, биосинтез полимерной структуры возможно производить в широком спектре различных ПГА за счет довольно неспецифических ПГА-синтаз, катализирующих реакцию полимеризации.

## **Глава 2. Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

В работе исследовалась возможность расти бактерии штамма *Cupriavidus necator B-10646* на таком субстрате как 3,3-тиодипропионовой кислоты. Данный штамм обладает способностью синтезировать сополимерные ПГА, образованные коротко- и среднецепочечными мономерами гидроксипроизводных алкановых кислот различного строения, и имеющий широкий органотрофный потенциал [25].

Данный процесс включает культивирование штамма-продуцента на жидкой солевой среде, содержащей углеродосодержащий ростовой субстрат с добавлением 3,3-тиодипропионовой.

### **2.2 Культивирование бактерий**

Посевной материал получали ресуспендированием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Бактерии *Cupriavidus necator-10646* выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5л, заполненных культурой на 50-60% объема на термостатируемой качалке Innova 44 IncubatorShakerSeries при температуре 30°C.

Для выращивания бактерий за основу была принята солевая среда Шлегеля. Состав среды Шлегеля:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 9,1г/л;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5 г/л;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,2 г/л;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25 г/л;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0 г/л ; стандартный раствор микроэлементов по Хоагланду (из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды) стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,228 г/л;  $\text{CoCe}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,030 г/л;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,008 г/л;  $\text{MnCe}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  –

0,008 г/л;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  – 0,176 г/л;  $NaMoO_4 \times 2H_2O$  – 0,050 г/л;  $NiCe_2$  – 0,008 г/л.

В качестве источника углерода использовалась фруктоза в концентрации 10-12г/л. В качестве источника азота использовали хлористый аммоний и мочевины.

Для начала был проведен эксперимент на определение концентрации ингибирования, где в качестве основного источника углерода было фруктоза. Концентрации 3,3-тиодипропионовой кислоты были следующие: 0,5г/л; 0,7г/л; 1г/л; 1,5г/л; 2г/л.

В последующих экспериментах более детально была изучена каждая концентрация кислоты, ее влияние на накопление биомассы, рост полимера и включений ЗМП в нем.

В ходе экспериментов периодически отбирали пробы культуры (каждые 12ч). Контроль оптической плотности, определение содержания и состава полимера, определение сухой биомассы клеток во всех опытах производили по методам, описанным в параграфе 2.3 Анализ проб.

## **2.3 Анализ проб**

### **2.3.1 Измерение концентрации клеток в процессе культивирования.**

Изменение биомассы клеток в процессе развития культуры регистрировали оптическими показателями культуры. Для измерения оптической плотности периодически отбирали пробы культуры, использовали фотоколориметр КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и  $\lambda=440$  нм (длина оптического пути 1 мм).

### **2.3.2 Определение биомассы клеток**

Биомассу бактерий в культуре определяли весовым способом. Для этого 20-25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 8 мин при 6000 g в

центрифуге Ependorf 5810R. Затем надосадочную жидкость сливали и оставляли для определения активности липазы, а осажденные клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение 24 ч, охлаждали в эксикаторе и взвешивали на весах AdventureOhaus. Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

### **2.3.3 Определение содержания в клетках состава ПГА**

Внутриклеточную концентрацию и состав ПГА определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после предварительного метанолиза образцов (навеска 3,9-4,5 мг) на хромато-масс-спектрометре GCDplus (“HewlettPackard”, USA). Метанолиз проб полимера проводили следующим образом: к навеске сухой биомассы (3,9-4,5 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0,5 мг бензойной кислоты/1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты и кипятили с обратными холодильниками в течение 2 часов 40 минут. По окончании метанолиза в колбу добавляли 1 мл дистиллированной воды.

### **2.3.4 Выделение полимера и определение его молекулярной массы**

Для того чтобы выделить полимер, использовали 50 мл культуры и центрифугировали 8 минут при 6000g. Осажденную биомассу помещали в круглые колбы на 100 мл, добавляли 10мл спирта и 25мл дихлорметана и оставляли на 24 ч. Образцы в дальнейшем фильтровали, растворитель удаляли на роторном испарителе при  $t=45^{\circ}\text{C}$ . Получившийся полимер далее растворяли 5 мл дихлорметана, пока он полностью не растворился, а после осаждали добавлением двойного объема гексана (10 мл).

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии AgilentTechnologies 1260 Infinity (США) относительно

полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую ( $M_w$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $PD = M_w/M_n$ ).

#### **2.4 Методы обработки данных**

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 7. Приведены арифметические средние и их стандартные ошибки.



[изъято 5 страниц]

## ВЫВОДЫ

1. Исследовано накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator B-10646* при использовании в качестве субстрата предшественника 3,3-тиодипропионовой кислоты. Показано, что 3,3-тиодипропионовая кислота не оказывает токсического действия на рост культуры.

2. С увеличением концентрации 3,3-тиодипропионовой кислоты увеличивался и выход полимера (от  $27,4 \pm 1,2\%$  при 0,5 г/л до  $43,4 \pm 0,7\%$  при 2 г/л).

3. Процентное содержание 3-меркаптоприоната в полимере уменьшалось при увеличении концентрации 3,3-тиодипропионовой кислоты (с  $14,7 \pm 0,5\%$  до  $6,3 \pm 0,4\%$ ).

## Список литературы:

1. Alexander Steinbuchel. Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: perspectives and impacts // *Current Opinion in Biotechnology* 2005, 16:607–613
2. Wübbeler J. H., Steinbüchel A. New pathways for bacterial polythioesters // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – Т. 29. – С. 85-92.
3. Ramsay J. A. et al. Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment // *Biotechnology Techniques*. – 1990. – Т. 4. – №. 4. – С. 221-226.
4. Raza Z. A., Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications / Z. A. Raza, Sh. Abida, I. M. Banat // *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2018 - №126 – P. 45-56.
5. Volova, T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates - plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications) / T.G. Volova // *Nova Science Pub. Inc.*, 2004. – P.283.
6. Dawes, E.A. Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer Academic, Dordrecht / E.A. Dawes. - Netherlands, 1990.- С. 287.
7. Noisshiki Y., Komatsuzaki S. Medical materials for soft tissue use // *Japanese Patent Application*. № JP 7275344 A2. 1995
8. Lee, E. Y.; Kang, S. H.; Choi, C. Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by newly isolated *Agrobacterium* sp. SH-1 and GW-04 from structurally unrelated single carbon substrates. *J. Ferment. Bioeng.* 1995,79, 328-334.
9. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // *Proc. Biochem.*, 2004. – С. 607 – 619
10. Lee, S.Y. Plastic bacteria. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria (Reviews) / S.Y Lee // *Tibtech.*-1996.- 431-438 c.
11. Thiele O. W., Dreysel J., Hermann D. The “Free” Lipids of Two Different Strains of Hydrogen-Oxidizing Bacteria in Relation to Their Growth Phases // *European Journal of Biochemistry*. – 1972. – Т. 29. – №. 2. – С. 224-236.

12. Kato M., Toshima K., Matsumura S. Enzymatic synthesis of polythioester by the ring-opening polymerization of cyclic thioester // *Biomacromolecules*. – 2007. – T. 8. – №. 11. – C. 3590-3596.
13. Griffin G. J. L. *Chemistry and technology of biodegradable polymers*. – Blackie Academic and Professional, 1994.
14. Lütke-Eversloh T. et al. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages // *Microbiology*. – 2001. – T. 147. – №. 1. – C. 11-19.
15. Kiene R. P., Taylor B. F. Biotransformations of organosulphur compounds in sediments via 3-mercaptopropionate // *Nature*. – 1988. – T. 332. – №. 6160. – C. 148-150.
16. Müller H. M., Seebach D. Poly (hydroxyfettsäureester), eine fünfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen Biopolymeren? // *Angewandte Chemie*. – 1993. – T. 105. – №. 4. – C. 483-509.
17. Weber N. et al. Copolymeric polythioesters by lipase-catalyzed thioesterification and transthioesterification of  $\alpha$ ,  $\omega$ -alkanedithiols // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2006. – T. 70. – №. 3. – C. 290-297.
18. Nakamura S., Kunioka M., Doi Y. Biosynthesis and characterization of bacterial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) // *Macromolecular Reports*. – 1991. – T. 28. – №. S1. – C. 15-24.
19. Steinbüchel A., Valentin H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids // *FEMS Microbiology Letters*. – 1995. – T. 128. – №. 3. – C. 219-228.
20. Takagi Y. et al. Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate with a Thiophenoxy Side Group Obtained from *Pseudomonas putida* // *Macromolecules*. – 1999. – T. 32. – №. 25. – C. 8315-8318.
21. Wodzinska J. et al. Polyhydroxybutyrate synthase: evidence for covalent catalysis // *Journal of the American Chemical Society*. – 1996. – T. 118. – №. 26. – C. 6319-6320.

22. Maya-Núñez G., Conn P. M. Transcriptional regulation of the GnRH receptor gene by glucocorticoids //Molecular and cellular endocrinology. – 2003. – T. 200. – №. 1-2. – C. 89-98.
23. Desetty R. D. et al. Isolation and heterologous expression of PHA synthesising genes from Bacillus thuringiensis R1 //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2008. – T. 24. – №. 9. – C. 1769-1774.
24. Rehm B. H. A., Steinbüchel A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis //International journal of biological macromolecules. – 1999. – T. 25. – №. 1-3. – C. 3-19.
25. Volova T. et al. A glucose-utilizing strain, Cupriaviduseuthrophus B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs //PLoS One. – 2014. – T. 9. – №. 2. – C. e87551.


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

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Синтез полигидроксиалканоатов с 3-меркаптопропионатом бактериями  
*Cupriavidus necator B-10646*

Научный  
руководитель



Подпись, дата

Должность,      ученая  
степень

Жила Н.О.

Инициалы,  
фамилия

Выпускник



Подпись, дата

Сидорчук  
М.А.

Инициалы,  
фамилия

Красноярск 2020