

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
 Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_  
T. Г. Волова

« \_\_\_\_ » 20 \_\_\_\_ г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Биосинтез полигидроксиалканоатов, включающих серосодержащие мономеры,  
бактериями *Cupriavidus necator* B-10646

Направление подготовки 06.04.01 – Биология

Профиль 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель



Доцент,  
канд. биол. наук,  
Н.О. Жила

подпись, дата

Выпускник



С.С. Захарова

подпись, дата

Рецензент



канд. биол. наук,  
А.Н. Бояндин

подпись, дата

Красноярск 2020

## **РЕФЕРАТ**

Магистерская диссертация по теме «Биосинтез полигидроксиалканоатов, включающих серосодержащие сополимеры, бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 » содержит 51 страницу текстового документа, 22 иллюстрации, 1 таблицу, 51 использованный источник.

**БИОСИНТЕЗ, ПОЛИТИОЭФИРЫ, СРЕДНЕЦЕПОЧЕЧНЫЕ  
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, *CUPRIAVIDUS NECATOR*, 3-  
МЕРКАПТОПРОПИОНОВАЯ КИСЛОТА, 3,3-ТИОДИПРОПИОНОВАЯ  
КИСЛОТА, ПОЛИМЕР, БИОМАССА, 3-МЕРКАПТОПРОПИОННАТ.**

Объект исследований – водородокисляющие бактерии *Cupriavidus necator* штамм B-10646.

Цель – изучение возможности получения сополимера поли(3-гидроксибутирата-со-3-меркаптопропионата) водородокисляющими бактериями *Cupriavidus necator* B-10646. В задачи исследования входило: 1). Исследование влияния 3-меркаптопропионовой кислоты на урожай полимера, биомассы и включение ЗМП. 2). Исследование влияния 3,3-тиодипропионовой кислоты на урожай полимера, биомассы и включение ЗМП. 3). Изучение свойств полученного полимера.

Одно из перспективных направлений в современном мире – получение более экологичных материалов.

В итоге были получены сополимеры поли(3-ГБ-со-З-МП) с разным содержанием 3-меркаптопропионата. Изучены физико-химические свойства образцов.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 5                                   |
| 1 Обзор литературы.....  | 7                                   |
| 1.1 Биоразрушаемые полимеры.....   | 7                                   |
| 1.2 Политиоэфиры.....  | 12                                  |
| 1.3 Полигидроксиалканоаты, их свойства и применение .....  | 14                                  |
| 1.3.1 Структура и классификация ПГА .....  | 17                                  |
| 1.4 Среднекепочечные ПГА: химическая структура и биосинтез.....  | 19                                  |
| 1.4.1 Химические и физические свойства ПГА .....   | 19                                  |
| 1.4.2 Биохимические пути синтеза ПГА .....   | 21                                  |
| 1.5 Субстраты, используемые для получения ПГА.....   | 23                                  |
| 1.6 Условия роста бактерий и накопления полимера. Периодические системы<br>и периодические системы с подпиткой ..... | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 2 Объект и методы исследований.....  | 26                                  |
| 2.1 Водородные бактерии Cupriavidus eutrophus .....  | 26                                  |
| 2.2 Материалы и методы исследования .....  | 28                                  |
| 2.2.1 Культивирование бактерий и методы измерения параметров<br>культивирования .....                                | 28                                  |
| 2.3 Измерение биохимических характеристик .....  | 29                                  |
| 2.3.1 Определение концентрации фруктозы .....  | 29                                  |
| 2.3.2 Определение содержания аммонийного азота   | <b>Error! Bookmark not defined</b>  |
| 2.3.3 Определение содержания в клетках состава ПГА .....   | 30                                  |
| 2.3.4 Определение концентрации органических кислот в культуральной<br>среде .....                                    | 30                                  |
| 2.3.5 Определение физических свойств (поли(3ГБ-ко-3МП)) .....  | 30                                  |
| 2.4 Статистическая обработка данных .....  | 31                                  |
| 3 Результаты и обсуждения .....  | 32                                  |

|   |                              |
|---|------------------------------|
| 3.1 Синтез сополимеров П(3-ГБ-со-3-МП) штаммом <i>C. eutrophus</i> B10646 при добавлении 3-меркаптопропионовой (3МПК) и 3,3-тиодипропионовой (3,3-ТДПК) кислот в разных концентрациях ..... | Error! Bookmark not defined. |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 32                           |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....  | 34                           |

## ВВЕДЕНИЕ

Синтетические полимеры получили широкое распространение с середины 1940-х годов, и уже в скором времени заменили такие материалы, как стекло, дерево и даже металл, и тем самым стали играть существенную роль в промышленности, экономике и оказывать влияние на состояние окружающей среды [1]. Столь широкое распространение пластмасс связано с их физико-химическими свойствами, а именно с их стабильностью и прочностью. С другой стороны, пластики используются в качестве, так называемых, «короткоживущих» материалов и используются, например, для создания упаковок, тары, бытовых и гигиенических изделий [2]. Однако из-за устойчивости пластмасс в окружающей среде увеличивается количество отходов. Сложившаяся ситуация повысила интерес к биоразрушимым материалам как альтернативе традиционным пластикам.

Биоразруемые полимеры открыли путь для разработки стратегий по ликвидации полимерных отходов. Наиболее активно изучаемыми среди биоразруемых пластиков являются алифатические полиэфиры, в том числе бактериального происхождения, так называемые полигидроксиалканоаты (ПГА) [3; 4; 5; 6; 7; 8].

Широкое разнообразие бактерий накапливает оптически активный полимер ((R) -3 гидроксимасляную кислоту) в качестве хранения углерода и энергии. Поли ((R) -3-гидроксибутират) П(ЗГБ), выделенный из бактерий, является биоразлагаемым и биосовместимым термопластом с температурой плавления около 180 °С. Бактериальный П(ЗГБ) рассматривается в качестве промышленного экологически разлагающегося пластика для широкого спектра медицинской, морской, и сельскохозяйственной деятельности. Тем не менее, существует ряд недостатков бактериального П(ЗГБ), ему присущи хрупкость и термическая нестабильность выше точки плавления [9]. В последнее время исследуется синтез сополимеров, состоящих из ЗГБ и 3-меркаптопропионовой кислоты. Эти микробные полимеры, содержащие в основной цепи серу, были

предоставлены в качестве представителя восьмого класса биополимеров [10]. Микробные политиоэфиры - интересный материал из-за их различных химических и физических свойств по сравнению с соответствующими сополиоксиэфирами и терпооксиэфирами [11]. Сообщается, что термическая стабильность у политиоэфиров лучше, чем у полиоксиэфиров[12]. Таким образом, для политиоэфиров можно ожидать дальнейшего роста точки плавления или термического разложения, чего нельзя сказать об их кислородных аналогах [13]. Одним из таких сополимеров, представляющих интерес для исследований, является поли(3-гидроксибутират-ко-3-меркаптопропионат) .

Целью настоящей работы было изучение возможности получения сополимеров поли(3-гидроксибутират-ко-3-меркаптопропионата) с использованием водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* B-10646.

Для достижения цели сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать влияние 3-меркаптопропионовой кислоты на урожай биомассы, синтез полимера и включение 3 меркаптопропионата;
2. Исследовать влияние 3,3-тиодипропионовой кислоты на урожай биомассы, синтез полимера и включение 3 меркаптопропионата;
3. Изучить физико-химические свойства полученных сополимеров с разным содержанием 3 меркаптопропионата.

# **1 Обзор литературы**

## **1.1 Синтетические полимеры**

Производство синтетических полимеров на современном этапе развития человечества возрастает в среднем на 5 - 6 % ежегодно, и в 2020 г., по прогнозам, достигнет 250 млн. тонн. Их потребление на душу населения в индустриально развитых странах за последние 20 лет удвоилось, достигнув 85-90 кг. К концу десятилетия, как полагают, эта цифра повысится на 45-50% [14].

Термин «полимерные материалы» является обобщающим. Он объединяет три обширных группы: полимеры, пластмассы и их морфологическую разновидность – полимерные композиционные материалы (ПКМ), или, как их ещё называют, армированные пластики. Общее для всех перечисленных групп то, что их обязательной частью является полимерная составляющая, которая и определяет основные термодеформационные и технологические свойства материала. Полимерная составляющая представляет собой органическое высокомолекулярное вещество, полученное в результате химической реакции между молекулами исходных низкомолекулярных веществ – мономеров. Полимерами принято называть высокомолекулярные вещества (гомополимеры) с введенными в них добавками, а именно стабилизаторами, ингибиторами, пластификаторами, смазками и т.д. Физически полимеры являются гомофазными материалами, они сохраняют все присущие гомополимерам физико-химические особенности. Пластмассами называются композиционные материалы на основе полимеров, содержащие дисперсные или коротковолокнистые наполнители, пигменты и иные сыпучие компоненты. Физически пластмассы представляют собой гетерофазные материалы с изотропными (одинаковыми во всех направлениях) физическими макросвойствами [15].

Насчитывается около 150 видов пластиков, 30% из них – это смеси различных полимеров. Для достижения определенных свойств и лучшей

переработки в полимеры вводят различные химические добавки, которых уже более 20, а ряд из них относится к токсичным материалам [15]. Такая высокая популярность пластмасс объясняется их легкостью, экономичностью и набором ценнейших служебных свойств. Пластики являются серьезными конкурентами металлу, стеклу, керамике. Но при их потреблении возникает проблема с утилизацией отходов, которых существует свыше 400 различных видов, появляющихся в результате использования продукции полимерной промышленности.

Учитывая специфические свойства полимерных материалов – они не подвергаются гниению, коррозии, проблема их утилизации носит, прежде всего, экологический характер. Однако в настоящее время проблема переработки отходов полимерных материалов обретает актуальное значение не только с позиций охраны окружающей среды, но и связана с тем, что в условиях дефицита полимерного сырья пластмассовые отходы становятся мощным сырьевым и энергетическим ресурсом [16]. Использование отходов полимеров позволяет существенно экономить первичное сырье (прежде всего нефть) и электроэнергию [17].

Вместе с тем, решение вопросов, связанных с охраной окружающей среды, требует значительных капитальных вложений. Стоимость обработки и уничтожения отходов пластмасс примерно в 8 раз превышает расходы на обработку большинства промышленных и почти в три раза – на уничтожение бытовых отходов. Это связано со специфическими особенностями пластмасс, значительно затрудняющими или делающими непригодными известные методы уничтожения твердых отходов. Проблем, связанных с утилизацией полимерных отходов, достаточно много. Они имеют свою специфику, но их нельзя считать неразрешимыми.

## **1.2 Биоразрушаемые полимеры**

На современном этапе развития общества возник новый подход к разработке полимерных материалов, диаметрально противоположный традиционному. Он имеет целью получение полимеров, которые сохраняют эксплуатационные характеристики только в течение периода потребления, а затем претерпевают физико-химические и биологические превращения под действием факторов окружающей среды и легко включаются в процессы метаболизма природных биосистем. Способность полимеров разлагаться и усваиваться микроорганизмами зависит от ряда их структурных характеристик. Наиболее важными являются химическая природа полимера, молекулярная масса, разветвленность макроцепи (наличие и природа боковых групп), надмолекулярная структура [18].

Природные и синтетические полимеры, содержащие связи, которые легко подвергаются гидролизу, обладают высокой способностью к биодеструкции. Присутствие заместителей в полимерной цепи часто способствует повышению биодеструктируемости. Последняя зависит также от степени замещения цепи и длины ее участков между функциональными группами, гибкости макромолекул. Важным фактором, который определяет стойкость полимера к биоразложению, является величина его молекул. В то время, как мономеры или олигомеры могут быть метаболизированы микроорганизмами и служат для них источником углерода, полимеры с большой молекулярной массой являются стойкими к действию микроорганизмов. Биодеструкцию большинства технических полимеров, как правило, инициируют процессами небиологического характера (термическое и фотоокисление, термолиз, механическая деградация и т.п.). Упомянутые деградационные процессы приводят к снижению молекулярной массы полимера. При этом возникают низкомолекулярные биоассимилируемые фрагменты, имеющие на концах цепи гидроксильные, карбонильные или карбоксильные группы.

Создание биоразрушаемых пластмасс основано на введении в цепь полимера биоактивирующих добавок, которые должны содержать

функциональные группы, способные разлагаться под действием бактерий. Трудность заключается в том, что добавки вводят в полимер на стадии синтеза или переработки, а разрушение его должно протекать после использования, но не во время переработки. Поэтому проблема заключается в создании активаторов разрушения, обеспечивающих определенный срок службы пластмассовых изделий без ухудшения их качества. Активаторы должны быть также нетоксичными и не повышать стоимость материала [19].

Биоразрушаемые полимеры принято делить на материалы, полученные химическим и биотехнологическим синтезом.

Химически синтезированные полимеры - в эту категорию входят такие соединения, как полигликолевая кислота, полилактид, поли( $\epsilon$ -капролактон), поливиниловый спирт, поли(этилен оксид). Данный вид соединений подвергается энзиматической либо микробиологической атаке. Например, полилактид – продукт конденсации молочной кислоты, в компосте биоразлагается в течение одного месяца, усваивается он и микроорганизмами, содержащимися в морской воде. Тем ни менее, данный вид соединений может составить коммерческую конкуренцию традиционным не разрушающим полимерным материалам [20].

Биоразрушаемые полимеры – это материалы, полученные путём биологического синтеза, содержащие крахмал, целлюлозу, хитозан и протеин. Биоразлагаемые полимеры на основе крахмала способны разлагаться в компосте при 30° С в течение двух месяцев с образованием благоприятных для растений продуктов распада. В качестве возобновляемого природного биоразлагаемого начала при получении термопластов активно разрабатываются и другие композиты, – целлюлоза/хитин или целлюлоза/крахмал. Например, полимеры, полученные взаимодействием целлюлозы с эпоксидным соединением и ангидридами дикарбоновых кислот, полностью разлагаются в компосте за 4 недели. На их основе формированием получают бутыли, разовую посуду, пленки для мульчирования. Для придания более высокой биоразлагаемости материалам на основе сложных эфиров целлюлозы в

композицию рекомендуется вводить полиэфиры лимонной кислоты либо ацетат целлюлозы, частично переэтерифицированный 6-гидроксикапроновой кислотой. [19].

Компостируемые материалы, получаемые из смеси растительных и натуральных исходных продуктов, где основным компонентом является целлюлоза или ее производные, широко применяются в настоящее время в качестве исходного сырья для изготовления одноразовых изделий для упаковки и предметов первой необходимости. В последнее время особое внимание разработчиков привлекают композиции, содержащие хитозан и целлюлозу. Из них получают биоразлагаемые пластики, пленку с хорошей прочностью и водостойкостью, когда в смеси содержится 10–20 % хитозана. Из тройной композиции – хитозан, микроцеллюлозное волокно и желатин – получают пленки с повышенной прочностью, способные разлагаться микроорганизмами при захоронении в землю. Природные белки или протеины также используются для получения биоразлагаемых пластиков, предназначенных для упаковки сухой и влажной пищи и др. Для получения биоразлагаемого упаковочного материала пищевых продуктов, парфюмерии и лекарственных препаратов используют метакрилированный желатин, казеин, производные серина, кератиносодержащие натуральных продуктов. Так, фирмой Showa (Япония) разработан биодеструктируемый термопластичный полимер для внешнего корпуса телевизоров и персональных компьютеров. В целом, данное направление по использованию природных полимеров с целью создания биоразлагаемых пластиков интересно прежде всего тем, что ресурсы исходного сырья возобновляемы.

Биополимеры – полигидроксиалканоаты - это полиэфиры различных гидроксипроизводных жирных кислот, которые синтезируются большим количеством микроорганизмов как дополнительный источник энергии, в условиях, когда необходимые элементы питания, как азот или фосфор, лимитированы, а источник углерода находится в избытке. Они обладают свойствами, сходными с различными термопластиками, такими как

полипропилен. Данный вид полимеров разрушается до конечных продуктов воды и диоксида углерода в аэробных условиях и до метана в анаэробных условиях микроорганизмами, обитающими в почве, море, озерах и сточных водах [20].

Таким образом, способность полимерных материалов к биодеструкции обусловлена, главным образом, их происхождением, а так же химическим составом, структурой и свойствами макромолекул.

Цель новейших разработок состоит в том, чтобы установить общие закономерности в подборе компонентов и технологических параметров при изготовлении материалов, сочетающих высокий уровень эксплуатационных характеристик (прочность, низкую газопроницаемость, экологическую безопасность и др.) со способностью к биоразложению, и научиться регулировать процессы их деструкции.

Исследования в области создания биоразрушаемых полимеров важны для решения глобальных экологических проблем в связи с загрязнением окружающей среды отходами полимерных материалов.

### **1.2.1 Политиоэфиры**

Развитие ненефтехимических источников для производства пластмасс продолжает прогрессировать, так как крупные транснациональные корпорации сосредоточиваются на использовании возобновляемых ресурсов для замены ископаемого углерода. Многие бактерии, как известно, накапливают полиоксиэфир в качестве водонерастворимых гранул в цитоплазме. Термопластичные и /или эластомерные характеристики этих биодеградируемых полимеров перспективны для разработки различных технологических применений [21].

Политиоэфиры (ПТЭ) — новый класс биополимеров с различными химическими и физическими свойствами. Сообщается, что термическая стабильность у политиоэфиров лучше, чем у полиоксиэфиров. Таким образом,

для политиоэфиров можно ожидать дальнейшего роста точки плавления или термического разложения. Способность производить ПТЭ биосинтетическим путем открывает новые возможности в области биоматериалов [22].

В настоящее время известны многие микробные полиоксифиры, которые включают в себя более чем 140 различных повторяющихся звеньев в цепи. Большинство из этих разнообразных полигидроксиалканоатов (ПГА), которые были синтезированы из тиоэфиров коэнзима А (CoA) соответствующей гидроксиалкановой кислоты, были получены только путем культивирования бактерий с предшественниками синтеза структурно связанных мономеров, входящих в состав ПГА [23]. Первые биополимеры с тиоэфирной связью в основной цепи полимера были выделены из ПГА аккумулирующих бактерий *Cupriavidus necator* (ранее *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstoniaeutropha*, *Wautersia eutropha*) содержащих 3-меркаптопропионат (3МП) или 3-меркаптобутират (3МБ) в дополнение к 3-гидроксибутирату (3ГБ). Таким образом, 3-меркаптоалконоат (3МА), содержащийся в полимере, был выделен в качестве первого представителя нового класса биополимеров, которые упоминались как политиоэфиры (ПТЭ) [24]. Структурная формула одного из политиоэфиров изображена на рисунке 1.

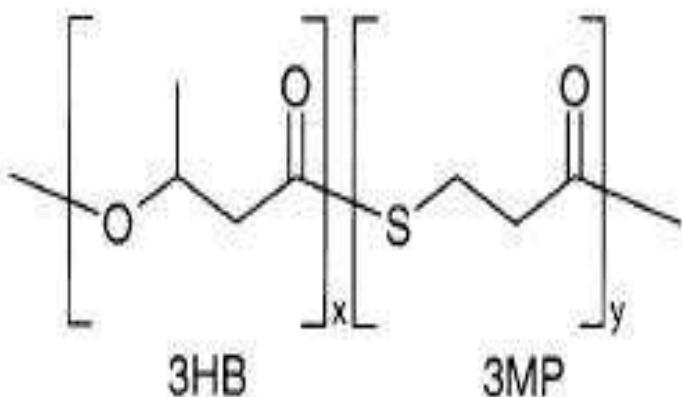


Рисунок 1 – Структурная формула поли(3-гидроксибутират-ко-3-меркаптопропионата)

### **1.3 Полигидроксиалканоаты, их свойства и применение**

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот, которые синтезируются прокариотическими организмами в качестве депо углерода и энергии, как правило, при условии лимитирования роста клеток конструктивными элементами и при избытке источника энергии, (углерода).

В 1888г. Бейеринк первым обнаружил гранулы ПГА в бактериальных клетках. Состав ПГА был впервые описан Лемойдженом, как неизвестный ранее материал, представленный гомополиэфиром 3-гидроксимасляной кислоты, названный поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)). В последующие 30 лет интерес к этим неизвестным материалам был весьма незначительным. Макре и Уилкинсон в 1958 году в своем докладе описали некоторые функции П(ЗГБ). Они указали на быструю биоразрушаемость П(ЗГБ), который синтезировался в клетках бактерий *Bacillus megaterium*. С этого момента интерес к П(ЗГБ) стал возрастать. В последующие годы, исследования, проводимые на П(ЗГБ), а также на других представителях семейства ПГА, были расширены с использованием самых различных микроорганизмов и далее было реализовано применение данного типа биополимеров [25].

Полигидроксиалканоаты по ряду физико-химических свойств сходны с широко применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах и не разрушающими в природной среде синтетическими полимерами (полипропиленом и полиэтиленом). Помимо термопластичности, ПГА обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, они характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью. Возможно получение на основе ПГА композитов с различными природными и синтетическими материалами, позволяющими направленно изменять их структуру, состав и, следовательно, базовые свойства материала – пластичность, механическую прочность,

температурные и другие характеристики, что еще больше усиливает привлекательность ПГА и расширяет возможные сферы применения [26].

Первым среди выделенных и наиболее полно к настоящему времени охарактеризованным полигидроксиалканоатом является поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)). По своим пластическим свойствам он близок к классическим полимерам — полиэтилену и полипропилену [3]. Однако он обладает лучшими газобарьерными свойствами по сравнению с полилактидами — наиболее широко распространенными сегодня разрушающими полимерами, (например, по отношению к кислороду) и большей устойчивостью к ультрафиолету, характеризуется также хорошей водостойкостью и теплоустойчивостью, при этом его проницаемость для водяного пара втрое ниже по сравнению с полипропиленом [26].

Поли(3-гидроксибутират) является гомополимером D(-)-3-β-оксимасляной кислоты и представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами ( $C_4H_6O_2$ ). В отличие от сложных синтетических полиэфиров, поли(3-гидроксибутират) — это стереорегулярный оптически активный полимер, который образует спирали в растворе и кристаллизуется в сферолиты [27].

Поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) накапливается многими бактериями и может составлять до 90 % от сухого веса клеток. [20]. Внутри клеток он, как и другие ПГА, аккумулируется в цитоплазме в виде сферических включений (гранул) и находится в гранулах в подвижном аморфном состоянии.

Гранулы образованы фибриллярными структурами, которые представляют собой двойные нити в виде закрученных вправо лент. Последние образуют мицелообразные кристаллы полимера. Плотность и высокая гидрофобность полимерных цепей в гранулах связана с наличием ограничивающих фосфолипидных оболочек, которые расположены монолинейно и укреплены белковыми структурами.

Температурные характеристики П(ЗГБ) и способность кристаллизоваться в нативном состоянии являются наиболее значимыми параметрами, так как

определяют термомеханические свойства и, следовательно, возможности переработки полимера в специальную продукцию и изделия.

Свойства полигидроксиалканоатов определяются их строением. Прежде всего, они зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными связями в молекуле.

На примере только нескольких типов ПГА показано, что свойства ПГА меняются очень значительно в зависимости от типа и соотношения мономеров в полимерной цепи. В результате этого на базе ПГА можно иметь спектр материалов с различными физико-механическими свойствами, пригодными для различных применений.

При нагревании молекулярные цепи в ПГА легко сдвигаются друг к другу, в результате этого материал размягчается и приобретает текучесть. Данное технологическое свойство имеет большую коммерческую ценность, так как позволяет с использованием различных методов (прессования и эструзии, и др.) получать из ПГА разнообразные изделия и материалы [28].

Полигидроксиалканоаты имеют огромный потенциал использования в самых различных областях: в хирургии и фармацевтике - в качестве препаратов, используемых для лечения нарушенных кожных покровов (ожогов и т.д.), протезов сосудов, хирургических ниток, носителей для контролируемой доставки лекарств и прочего. В сельском хозяйстве – для инкарпулирования пестицидов и удобрений для безопасного пролонгированного высвобождения активного начала [29]. При этом не происходит накопления препаратов в биосфере через аккумуляцию и концентрирование в трофических цепях биоты агроценозов и природных экосистем [27]. ПГА можно использовать в пищевой промышленности - в качестве упаковочного материала, в косметологии и многих других областях.

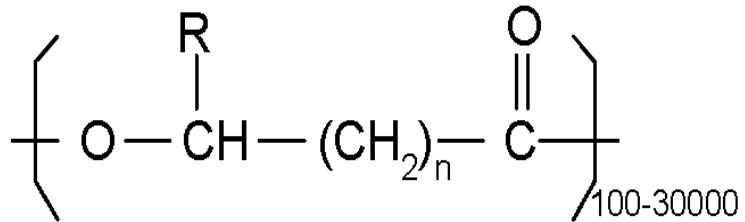
ПГА могут быть синтезированы из биовозобновляемых ресурсов таких, как сахара, растительные масла и даже диоксида углерода [30]. Данный тип биополимеров имеет несравненно большее преимущество перед материалами,

изготовленными из нефтепродуктов, так как их способны утилизировать микроорганизмы и грибы.

### 1.3.1 Структура и классификация ПГА

На сегодняшний день известно более 150 различных по структуре полимеров, синтезируемых природными, а также генетически модифицированными микроорганизмами.

Как уже было, ранее описано, ПГА состоят из мономеров гидроксипроизводных жирных кислот. Общая структурная формула полигидроксиалканоатов представлена на рисунке 2.



n=1 R = водород - поли (3-гидроксипропионат)

R = метил - поли (3-гидроксибутират)

R = этил - поли (3-гидроксивалерат)

R = пропил - поли (3-гидроксигексаноат)

R = пентил - поли (3-гидроксиоктаноат)

R = нонил - поли (3-гидроксидодеканоат)

n=2 R = водород - поли (4-гидроксибутират)

n=3 R = водород - поли (5-гидроксивалерат)

Рисунок 2 – Общая структурная формула полигидроксиалканоатов (Lee, 1996)

В соответствии с количеством атомов углерода, составляющих мономерные единицы, бактериальные ПГА могут быть подразделены на три группы:

1. Короткоцепочечные ПГА (Short-chain-length PHAs/ PHASL), в состав их мономеров входят от трех до пяти углеродных атомов и являются природными термопластиками;
2. Среднекепочечные ПГА (Medium-chain-length PHAs/PHAMCL), мономерный состав из 6-14 углеродных атомов, представляют собой природные эластомеры;
3. Длинноцепочечные ПГА (long-chain-length PHAs/PHALCL) являющиеся сополимерами коротко - и среднекепочечных ПГА и включающие в мономерный состав свыше 14 углеродных атомов. Их свойства зависят от молярного соотношения мономеров коротко - и среднекепочечных ПГА. Данный тип полигидроксиалканоатов имеет широкий ряд физических и термических свойств.

Данное разделение полимеров на группы базируется на существующем представлении о субстратной специфичности ПГА-синтаз, акцептирующих определенные гидроксикислоты при строительстве полимерной цепи в процессе полимеризации [3]. Ранее считалось, что ПГА-синтаза из природных штаммов-продуцентов *R.eutropha* способна полимеризовать гидроксикислоты, состоящие из 3-5 углеродных атомов, но не взаимодействует с гидроксикислотами с длиной углеродной цепи 6 и более. Однако в ходе последующих исследований было установлено, что ПГА-синтазы природных штаммов-продуцентов, включая *C. necator*, обладают более широкой субстратной специфичностью [31], что позволяет данным микроорганизмам синтезировать одновременно коротко - и среднекепочечные ПГА.

Таким образом, большое разнообразие мономеров обнаруженных на сегодняшний день в составе ПГА определяет широкий спектр физических свойств этих биополимеров.

## **1.4 Серосодержащие полимеры : химическая структура и биосинтез**

Микробные полигидроксиалканоаты (ПГА) содержат большое разнообразие различных сложных полиэфиров с более семи 150 (R)-гидроксиалканоатами в качестве известных компонентов. Они синтезируются многими прокариотами в качестве соединений для хранения углерода и энергии в условиях несбалансированного роста. Недавно была обнаружена тиоэфирная связь в основной цепи полимера. Такие полимеры были выделены в новый структурный класс, называемый политиоэфиры (ПТЭ). Этот новый класс биополимеров вызывает интерес у учёных и в последнее время изучаются пути синтеза ПТЭ, их свойства и деградация.

### **1.4.1 Химические и физические свойства ПТЭ**

Поли(3-гидроксибутират) (П(3ГБ)), полученный бактериальным синтезом, природный термопластик, привлек большое внимание учёных за его способность к биологическому разложению и биосовместимость. Широкий диапазон свойств П(3ГБ) интенсивно изучались. Однако П(3ГБ) присущи недостатки, такие как хрупкость и термическая нестабильность выше его точки плавления.

Свойства П(3ГБ) модифицировали, синтезируя новые сополимеры, содержащие блоки 3ГБ и 3-гидроксивалерата (3ГВ) и другие. Было установлено, что твердофазные структуры и свойства бактериальных сополи(гидроксиалканоатов) зависят не только от их химических структур, но и от композиционного состава в сомономерных единицах.

Недавно был синтезирован поли(3-гидроксибутират-со-3-меркаптопропионат) (П(3-ГБ-со3-МП)). Это был первый пример на бактериальном ПГА, содержащем атомы серы в скелете. Ожидается, что свойства этих полимеров будут отличаться от свойств полимеров, содержащих атомы кислорода в соответствующей связи. Например, температура плавления поли(этиленсульфида) составляет  $216\text{ }^{\circ}\text{C}$ , что значительно выше, чем у его

кислородного аналога, то есть поли(этиленоксида) (температура плавления – 66–69 °C). Можно ожидать, что свойства П(3-ГБ-со-ЗМП) отличаются от его кислородного аналога поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксипропионата) (П(3-ГБ-со-ЗМП)).

В своём исследовании Tanaka et al (2004) изучили термические свойства бактериальных П(3-ГБ-со-ЗМП) с разным содержанием ЗМП. Было выявлено, что с увеличением содержания ЗМП температура стеклования уменьшается, так же как и температура плавления и степень кристалличности.

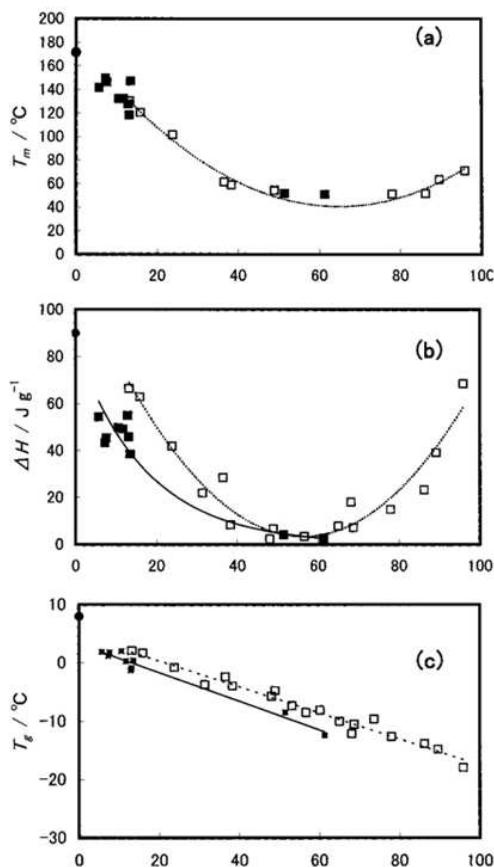


Рисунок 3 – Графики (а) температуры плавления ( $T_m$ ), (б) теплоты плавления ( $H$ ) и (с) температуры стеклования ( $T_g$ ) по сравнению с содержанием ЗМП и ЗГП (мол.%) Для фракционированных сополимеров: ■ П(ЗГБ-со-ЗМП) фракции, □ П(ЗГБ-со-ЗГП) фракции, ● П(ЗГБ) гомополимер.

Молекулярная масса и полидисперсность, как правило, высокие у данных сополимеров. Рентгеноструктурный анализ показал, что у сополимера П(ЗГБ-со-ЗМП) обнаружилось существенное различие в дифракционных картинах. Вероятно, блоки ЗМП случайным образом распределены в полимерной цепи и

препятствуют развитию размера кристаллов. Также выяснили, что образцы с более низким содержанием ЗМП кристаллизуются преимущественно как П(ЗГБ). Таким образом, разумно ожидать, что богатый ЗМП П(ЗГБ-со-ЗМП) может образовывать кристалл с гораздо более высокой степенью кристалличности или даже образовывать кристаллическую решетку, отличную от кристаллической решетки богатых ЗГБ-единиц П(З-ГБ-со-З-ГП) с аналогичным содержанием ЗГБ. [35].

#### **1.4.2 Биохимические пути синтеза ПТЭ**

Микробный синтез ПТЭ был впервые описан в 2001 году LUTKE-Eversloh и др. Единственное различие от соответствующих полиоксиэфиров является наличие атома серы вместо кислорода в основной цепи, которая, вероятно, является причиной отсутствия биодеградации выявленных гомополимеров. В противном случае, возникновение серы в биополимерах, как правило, ограничена белками и несколькими сложными полисахаридами, где сера находится в боковых цепях.

Микробное производство ПТЭ впервые было достигнуто с использованием клеток *R. eutrophus*, модели организма для синтеза полиоксиалканоатов (ПГА). В своём исследовании Wuubbeler и др. (2014) инкубировали клетки в среде минеральных солей в условиях, способствующих синтезу ПГА в присутствии обязательного серосодержащего субстрата-предшественника, как З-меркаптопропионовой кислоты (ЗМПК), и второго источника углерода для роста. *R. eutrophus* могли накопить сополимер З-гидроксибутират (ЗГБ) и ЗМП, поли(З-ГБ-со-ЗМП), в которых содержалось до 40% мол ЗМП. Вариации состава сополимера были получены, главным образом, путем изменения используемого серосодержащего субстрата предшественника. Другой субстрат предшественник представляет собой 3,3-тиодипропионовую кислоту (3,-ТДПК). Использование этого тиоэфира для синтеза ПТЭ в *R. eutrophus* было также изучено. 3,3-ТДПК применяется в

качестве предшественника, предоставляющего более высокое общее содержание сухого веса клеток сополимера, но более низкую долю блоков ЗМП в полимере по сравнению с 3-меркаптопропионовой кислотой. Преимуществом применения 3,3-ТДПК является то, что часть сополимера ЗМП может, по-видимому, регулироваться в диапазоне 1-39 мол % путем изменения условий культивирования. [38; ].

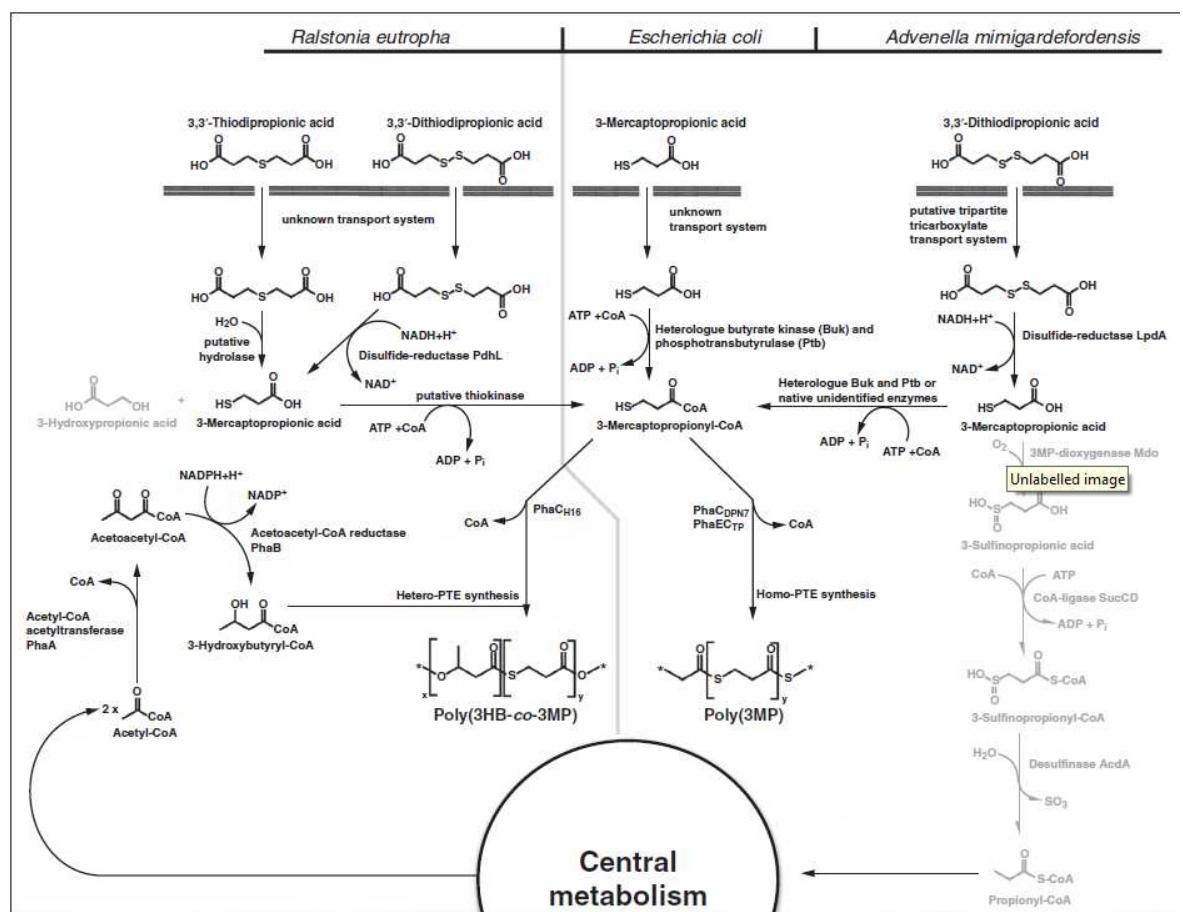


Рисунок 4 – Предлагаемые пути для использования ЗМПК и 3,3-ТДПК в качестве предшественника для синтеза ПТЭ

*R. eutropha* синтезирует элементы ПТЭ, когда 3-меркаптоалконоат (ЗМА) предоставляются в качестве соподложек. После поглощения в клетке, происходит сложнотиоэфирная активация соответствующего ЗМА-коэнзим А; скорее всего, происходит катализация неспецифической тиокиназы, хотя КоА трансферазы могут также выполнить эту реакцию (рисунок 5)

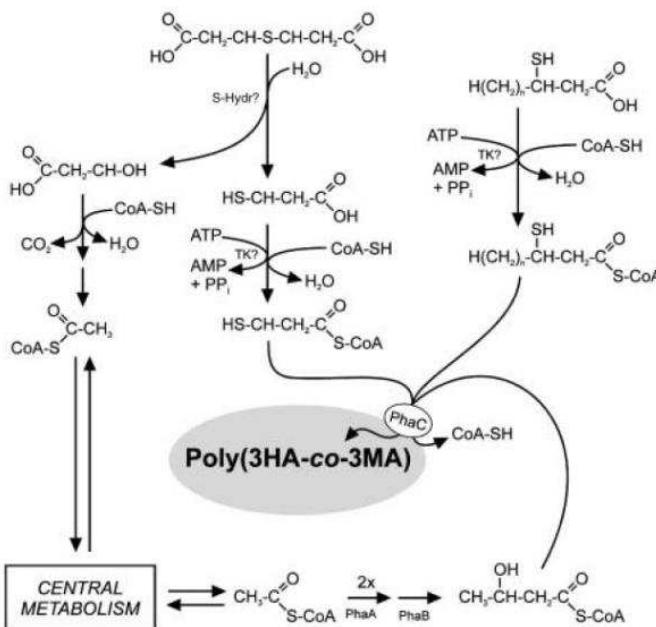


Рисунок 5 – Предполагаемый путь метаболизма для биосинтеза ПТЭ, в *Ralstonia eutrophpha*. Сокращения: НА, гидроксиалканоатный; МА, меркаптоалконоат; S-Hydr, сульфид гидролазы; ТЗ, тиокиназа; PhaA, кетотиолаза; ФАБ, ацетоуксусными-редуктазы; РНАС, ПГА-синтазы

Данных о метаболическом пути 3МА недостаточно, но превращение 3МП в 3МП-КоА было продемонстрировано, например, в митохондриях сердца крысы, где она катализирует со средней длиной цепи ацил-КоА-сингтетазы (Cuevas и др ., 1985). Сильное ингибирующее действие 3МП-КоА на ферменты жирной кислоты также было показано (Саббаг и др., 1985).

*R. eutrophpha* также способна синтезировать 3МП содержащие полимеры, когда 3,3-ТДПК предоставляется в качестве серосодержащего субстрата. Реакция, как полагают, протекает через гидролитическое расщепление ТДП в 3МП и 3-гидрокисипропионата (3НП), хотя этот мнимый сульфид гидролаза еще не идентифицирован. Тем не менее, наиболее важной особенностью является катализ совершенно другого типа связей: сульфогидрильные группы ковалентно связаны с карбонильными группами, что приводит к образованию тиоэфирных связей.[25]

## 1.5 Деградация ПТЭ

По биоразлагаемости ПГА было проведено много исследований в различных природных средах, а также идентифицировано около 700 штаммов ПГА разлагаемых микроорганизмов. Разлагаемые ПГА микроорганизмы выделяют ПГА деполимеразы, которые гидролизуют полимер растворимых в воде продуктов и используются продукты гидролиза в качестве источников углерода и энергии для роста. Многие исследования были проведены с мезофильными полимер-деградирующими бактериями, но относительно мало с термофильными бактериями

Однако по исследованию деградации нового класса биополимеров, содержащих в основной цепи серу, экспериментов проводилось мало из-за кропотливого синтеза и дороговизны прекурсоров ЗМП. Исследования Lutke-Eversloh и др. (2003) физических свойств ПТЭ показали, что характеристики ПТЭ, как растворимость, степень кристалличности и термической стабильности, значительно отличаются от кислородсодержащих аналогов ПГА.

Недавно в своем исследовании Elbanna и др.(2004) выделили термофильный штамм K14T, который был в состоянии использовать поли(З-ГБ-со-З-МП) в качестве источника углерода для роста. Анализ последовательности 16S rDNA штамма K14T показал, что этот новый изолят был филогенетически связан с термофильной бактерией DhA-71, разрушающей кислоту смолы, выделенной Yu & Mohn (1999), которая способна разрушать дегидроабиетиновую кислоту при высоких температурах. Смоляные кислоты представляют собой трициклические дитерпены, которые встречаются на многих деревьях и преобладают в хвойных и, следовательно, встречаются в отходах целлюлозно-бумажного производства. На основании фенотипических, хемотаксономических и филогенетических результатов для штаммов K14T и DhA-71 был описан новый вид, принадлежащий новому роду, для которого предложили название *Schlegelella thermodepolymerans* gen. Nov., Sp. Nov. в честь Г. Г. Шлегеля, первоходца в исследованиях ПГА.

Исследования по субстратной специфиности очищенной поли(ЗГБ) деполимеразой из *Schlegelella. thermodepolymerans* включает элементы ПТЭ с

различным содержанием ЗМП. По сравнению с поли(ЗГБ), активность фермента значительно снизилась в соответствии с содержанием ЗМП и, наконец, никакой активности не было обнаружено с поли(ЗМП). Аналогичные результаты были получены с помощью трех хорошо изученных ПГА деполимераз (PhaZ2, PhaZ5, PhaZ7).

Анализ продуктов разложения также представил доказательства, что распределение последовательности сомономеров ЗГБ и ЗМП в поли(З-ГБ-со-З-МП) не случайно, и не подчиняется статистике Бернулли, так как олигомеры, были обнаружены в нерастворимой в воде фракции разложения.

В качестве заключения можно сказать, что эта работа показывает, что ПГА деполимераз являются специфическими для оксиэфирных связей и не гидролизуются сложнотиоэфирными связями. Можно предположить, что, если ЗМП, содержащие сополимеры, представлены в качестве субстратов, расщепление сополимеров происходит при оксиэфирных связях, высвобождая ЗГБ фрагменты, которые затем используют в качестве источника углерода. Фракции полимера, состоящие в основном из остатков ЗМП и, наиболее вероятно, представляющие олигомеры ЗМП, осаждены и не могут быть дальше расщеплены. Так как *Schlegelella thermodepolymerans* использовали ЗМП в качестве единственного источника углерода для роста, неспособность расщеплять тиоэфирные связи в полимере и, вероятно, также олигомеры, предотвращает использование этих бактерий с ЗМП в качестве источника углерода.

Биодеградация данных полимеров изучается до сих пор. Более того, поскольку З-меркаптопропионат вырабатывается в относительно небольших количествах только химической промышленностью, а так как свободный З-меркаптопропионат или другие соединения, которые метаболизируются через З-меркаптопирониат, происходят только при низких концентрациях, главным образом в морской среде, экспозиция бактерий к этому субстрату-предшественнику для биосинтеза ЗМП в природе является низкой.

Из-за небиоразлагаемости, биологический поли(ЗМП) может быть очень полезным для некоторых специальных технических применений. Если поли(ЗМП) обладает некоторыми уникальными целевыми свойствами, такими как высокая термическая стабильность, которая не проявляется другими биополимерами, и если можно показать, что поли(ЗМП) является биосовместимым, некоторые интересные материалы (например, медицинские устройства) могут быть изготовлены из этого полимера для конкретных применений, где биодеградация нежелательна.

## 2 Объект и методы исследований

### 2.1 Водородные бактерии *Cupriavidus necator*

Домен *Bacteria*

Филум *Proteobacteria*

Класс *Proteobacteria*

Семейство *Burkholdeviaceae*

Род *Cupriavidus*

Вид *C. necator*

Штамм *C. eutrophus* B-10646

Культурально-морфологические особенности штамма *C. necator* (ранее *eutrophus*): грамотрицательные палочки (размеры  $0.3\text{-}0.5 \times 1.2\text{-}2.0$  мк), подвижные монотрихи в молодости с возрастом становятся перетрихи. Оптимальная температура для роста  $30\text{-}31^{\circ}\text{C}$ , pH 6,7-7,2.

На агаризованной среде с пептоном (гетеротрофные условия роста) образуют морфологически однородные округлые колонии, светло-кремовые, непрозрачные со слегка волнистым краем диаметром 2-4 мм. На минеральной агаризованной среде (автотрофные условия роста) колонии мелкие (1,5-2,5 мм), светло-серые, полупрозрачные. В жидкой питательной среде представляет однородную суспензию молочно-кремового цвета. Облигатный аэроб.

Факультативный хемолитоавтотроф. Оксидазоположителен. Гидролитическими ферментами не обладает. Желатину не разжижает. Крахмал не гидролизует. Обладает широким органотрофным потенциалом и способен в качестве источника углерода использовать: сахара (глюкоза, фруктоза), аминокислоты (аланин, серин, лейцин, гистидин, триптофан, глутаминовую, аспарагиновую, лизин), органические кислоты (щавелевую, лимонную, янтарную, фумаровую, уксусную, 3-и 4-масляную кислоту, пентапновую, гексановую, октановую, нонановую), спирты (этанол, глицерин), 4-бутуролактон, CO<sub>2</sub> и CO.

Ростовые характеристики: штамм растет на минеральной среде с сахарами или органическими кислотами, а также в атмосфере водорода, двуокиси углерода и кислорода, специфических факторов роста и органических добавок не требуется. Границы физиологического действия pH в диапазоне 4.4-8.6, штамм сохраняет способность к росту в диапазоне температур 20-41°C. Стабильно сохраняет свои характеристики при варьировании условий культивирования и сред (замена источника углерода и энергии, низкие или высокие значения активной реакции среды), повышение температуры до 35°C, использование в качестве ростового токсического субстрата - 4-бутуролактон и соли монокарбоновых кислот.

Таким образом, для заявляемого штамма характерны:

- устойчивый продуктивный рост на средах различного состава;
- способность длительно сохранять активность в лиофилизированном виде;
- высокая активность ферментов, контролирующих синтез ПГА;
- способность к синтезу ПГА с высокими выходами;
- устойчивость к воздействию C-субстратов - стимуляторов синтеза гетерополимерных ПГА;
- способность к синтезу гетерополимерных ПГА, образованных различными мономерами с макровключениями последних;
- способность к синтезу ПГА, имеющих степень кристалличности ниже 50%.

Штамм *Cupriavidus necator* депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), коллекционный номер ВКПМ В-10646.

## **2.2 Материалы и методы исследования**

Исследования проводились на базе кафедры биотехнологии в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза института биофизики СО РАН.

### **2.2.1 Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования**

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5-1,0л, заполненных культурой на 50-60 % объема на терmostатируемой качалке при температуре 30°C. Для выращивания бактерий за основу была принята солевая среда Шлегеля следующего состава:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 9,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,25;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,2-1,0 ; раствор микроэлементов (из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды; стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,228;  $\text{CoCe}_2^{\times}6\text{H}_2\text{O}$  – 0,030;  $\text{CuSO}_4^{\times} 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{MnCe}_2^{\times}4\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{ZnSO}_4^{\times}7\text{H}_2\text{O}$  – 0,176;  $\text{NaMoO}_4^{\times}2\text{H}_2\text{O}$  – 0,050;  $\text{NiCe}_2$  – 0,008 (г/л)).

При гетеротрофном культивировании для штамма *Cupriavidus necator* В-10646 ростовым субстратом, была фруктоза (10-12 г/л). Для синтеза сополимеров, содержащих 3-меркаптопропионат (3МП), в культуральную среду добавляли 3-меркаптопропионовую кислоту (3МПК) в концентрациях 0,5; 0,7; 1 и 1,5 г/л. К 10 мл дистилированной воды добавляли 3МПК в нужной концентрации и доводили до нейтрального pH раствором 33% KOH. Также в качестве предшественника 3МП использовали 3,3-тиодипропионовую кислоту (3,3-ТДПК) в концентрациях 0,1; 0,2; 0,3 и 0,5 г/л, также доводя до нейтрального pH.

Периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на фотоколориметре КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и  $\lambda=440$  нм (длина оптического пути 1 мм).

Биомассу бактерий в культуре определяли весовым способом. Для этого 20-25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 10 мин при 6000 g. Затем дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые 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. Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

## **2.3 Измерение биохимических характеристик**

### **2.3.1 Определение концентрации фруктозы**

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого супернатант разводили в 50 раз. Из этого разведения 1 мл пробы наливали в пробирку и добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 1000 мл 95%-ного этилового спирта) и 3 мл раствора соляной кислоты:дистиллированная вода (5:1). В качестве контроля использовали раствор следующего состава: 1 мл дистиллированной воды, 1 мл спиртового раствора резорцина и 3 мл раствора соляной кислоты и воды. Пробирки с контролем и пробой помещали в водянную баню ( $t=80^{\circ}\text{C}$ ) на 20 минут. По истечении этого времени контроль и пробу охлаждали до комнатной температуры. Концентрацию фруктозы измеряли на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 540 нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику.

### **2.3.2 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 GCD plus (“Hewlett Packard”, 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. При этом происходило разделение жидкостей. Нижний хлороформенный слой использовали для анализа в хроматографии.

### **2.3.4 Определение концентрации органических кислот в культуральной среде**

Для измерения концентрации 3-меркаптопропионовой кислоты отбирали 20 мл культуральной среды в пробирки и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R при 6000 оборотов/мин в течение 10 минут. По завершении центрифугирования 5 мл среды после осаждения клеток подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения pH=2-3. Подкисленную среду переносили в мерную пробирку со шлифом и добавляли 1 мл хлороформа, закрывали и взбалтывали в течение 1 минуты. Когда происходило расслоение фаз, из нижнего хлороформенного слоя отбирали по 2 мкл пробы и запускали в хроматограф (“Hewlett Packard”, USA).

### **2.3.5 Определение физических свойств (поли(ЗГБ-со-ЗМП))**

Молекулярную массу и молекулярно массовое распределение полимера определяли с использованием гель-проникающей хроматографии (Agilent Technologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия).. 12-15 мг полимера растворяли в 2 мл хлороформа. Полученный раствор фильтровали с помощью шприца и шприцовой насадки Millex-FH Filter Unit. Находили средневесовую ( $M_v$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярные массы, а также полидисперсность ( $\overline{P}D = M_v/M_n$ ).

Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР растворов ПГА в  $\text{CDCl}_3$  получены с использованием ЯМР-спектрометра Avance III 600 “Bruker” (Германия).

Температурные характеристики сополимера определены с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC-1(MettlerToledo, Швейцария) Образцы в виде порошка массой  $4,0 \pm 0,2$  мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $200\text{ }^\circ\text{C}$ . Далее образцы охлаждали до  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , выдерживали в течении 20 минут и повторно нагревали до  $320\text{ }^\circ\text{C}$ . Температуры плавления и термической деградации определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE».

## 2.4 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам [51] с использованием программного пакета Microsoft Excel 2010 для Windows 2010. Эксперименты проводились в трех повторностях. Для полученных данных рассчитывались среднее и их стандартное отклонение.

**[изъято 13 страниц]**

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе работы были исследованы рост и накопление полимера у бактерий *C. necator* штамм B-10646. Установлено, что исследуемый штамм способен синтезировать сополимер поли(3-гидроксибутират-со-3-меркаптопропионата (поли(3-ГБ-со-3-МП)) в гетеротрофных условиях при условии добавления в культуру 3-меркаптопропионовой (3МПК) или 3,3-тиодипропионовой (3,3-ТДПК) кислот (предшественника для синтеза мономеров 3МП).

Показано, что 3-меркаптопропионовая кислота в концентрации до 1 г/л не оказывает ингибирующего действия на рост бактерий и синтез полимера, а её добавление в культуру в найденных концентрациях обеспечивает условия для эффективного синтеза сополимеров поли(3-гидроксибутират-со-3-меркаптопропионата) с высоким содержанием фракции 3-меркаптопропионата (до 38 мол. %).

Установлено, что добавление 3,3-тиодипропионовой кислоты оказывает более ингибирующее действие на рост бактерий и включения 3-меркаптопропионата не превышали 10 мол.%.

В результате синтезированы образцы полимера с 3-меркаптопропионатом, изучены физико-химические свойства полученного сополимера поли(3-ГБ-со-3-МП). Показано, что для сополимеров поли(3-ГБ-со-3-МП) характерно два пика плавления.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Cain, R.B. Microbial degradation of synthetic polymers / In: Frey J.C., Gadd G.M., Herbert R.A., Jones C.W., Watson-Craik I.A. // 48 symposium of the society for general microbiology (University of Cardiff, March 1992): Bath. Press. – UK, 1992. – P. 293-338.
2. Witt, U. Biodegradation of polyester copolymers containing aromatic compounds / U. Witt, R.J. Meller, J. Klein // J.M.S. Pure Appl. Chem., 1997. – V. 32. – P. 851-856.
3. Anderson, A.J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A.J. Anderson, E.A. Dawes // Microbiol. Rev., 1990. – V. 54. – P. 450-472.
4. Doi, Y. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxyvalerate) / Y. Doi, M. Kunioka // Macromolecules, 1990. - V. 23. - P. 26-31.
5. Augusta, J. A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics / J. Augusta, H. Widdecke // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1993. - V. 39. - P. 673-678.
6. Marchessault, R.H. Chemical, enzymatic and microbial degradation of bacterial and synthetic poly-R-hydroxyalkanoates / R.H. Marchessault, C.J. Monasterios, J.J. Jesudason, B. Ramsay, I. Saracovan, B. Saito // Polym. Degrad. Stab., 1994. - V. 45. - P. 187-196.
7. Jendrossec, D. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids / D. Jendrossec, A. Schirmer, H.G. Schlegel // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996. - V. 46. - P. 451-463.
8. Mergeart, J. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters / J. Mergeart, J. Swings // Microbiol., 1996. - V. 17. - P. 463-469.
9. Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions //Amino acids. – 2011. – T. 41. – №. 1. – C. 113-121.

10. Lindenkamp N., Schürmann M., Steinbüchel A. A propionate CoA-transferase of *Ralstonia eutropha* H16 with broad substrate specificity catalyzing the CoA thioester formation of various carboxylic acids //Applied microbiology and biotechnology. – 2013. – Т. 97. – №. 17. – С. 7699-7709.
11. Steinbüchel A., Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms //Biochemical Engineering Journal. – 2003. – Т. 16. – №. 2. – С. 81-96.
12. Chou Y. J. et al. *Schlegelella aquatica* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – Т. 56. – №. 12. – С. 2793-2797.
13. Elbanna K. et al. Studies on the biodegradability of polythioester copolymers and homopolymers by polyhydroxyalkanoate (PHA)-degrading bacteria and PHA depolymerases //Archives of microbiology. – 2004. – Т. 182. – №. 2-3. – С. 212-225.
14. Пономарева, В.Т. Использование пластмассовых отходов за рубежом / В.Т. Пономарева, Н.Н. Лихачева, З.А. Ткачик // Пластические массы, 2002. - № 5. - 44-48 с.
15. Вторичные ресурсы: проблемы, перспективы, технология, экономика: Учеб. пособие / Г.К. Лобачев, В.Ф. Желтобрюхов и др. – Волгоград, 1999. - 180 с.
16. Вторичное использование полимерных материалов / Под ред. Е.Г. Любешкиной. - М., 1985. – 192 с.
17. Одесс, В.И. Вторичные ресурсы: хозяйственный механизм использования / В.И. Одесс. – М., 1988. – 15 с.
18. Васнев, В.А. Биоразлагаемые полимеры. Высокомолекулярные соединения. Сер. Б. - М., 1997.- Т. 39.- № 12.- 2073-2086 с.
19. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов: Учеб. пособие / А.С. Клинков, П.С. Беляев, М.В. Соколов. – Тамбов: ТГТУ, 2005. – 80 с.

20. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // Process Biochemistry, 2004. - V. 40. - P. 607-619.
21. Lütke-Eversloh T. et al. Biosynthesis of novel thermoplastic polythioesters by engineered *Escherichia coli* //Nature materials. – 2002. – Т. 1. – №. 4. – С. 236-240.
22. Lütke-Eversloh T. et al. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages //Microbiology. – 2001. – Т. 147. – №. 1. – С. 11-19.
23. Qi Q., Rehm B. H. A., Steinbüchel A. Synthesis of poly (3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene phaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2 //FEMS microbiology letters. – 1997. – Т. 157. – №. 1. – С. 155-162.
24. Lütke-Eversloh T. et al. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptoputyrate) as a sulfur analogue to poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) //Biomacromolecules. – 2001. – Т. 2. – №. 3. – С. 1061-1065.
25. Volova, T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates - plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications) / T.G. Volova // Nova Science Pub. Inc., 2004. – Р.283.
26. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск.: СО РАН, 2003. – 330 с.
27. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты - биоразрушающие полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая; под ред. В.И. Шумакова. – Красноярск: Платина, 2006. – 287 с.
28. Fernandez-Urrusuno, R. Development of controlled release formulations of alachlor in ethylcellulose / R. Fernandez-Urrusuno, J. M. Gines, E. Morillo // Journal of Microencapsulation – 2000. – V.17. – P.331-342.
29. Komives, C. Degradation of pesticides in a continuous-flow two phase microemulsion reactor / C. Komives, D. Osborn, A.J. Russel // Biotechnol Prog., 1994. – V.10(3). – P.340-343.

30. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci., 2000. – V. 25. – P. 1503–1555.
31. Green, Ph.R. Formation of short chain|medium chain lehgth polyhydroxyalkanoate cjpolymer by fatty acid  $\beta$ -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha* / Ph.R. Grenn, J. Kemper, L. Schechtman, L. Guo, M. Satkowski, S. Fiedler, A. Steinbüchel, H.A. Rehm // Biomacromol., 2002. – V. 3. – P. 208-213.
32. Witholt, B., Kessler, B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics // Curr. Opin. Biotechnol., 1999. – V. 10. – P. 279–285.
33. Hazer, B., Steinbüchel, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007. – V. 74. – P. 1–12.
34. Tao, H.J., Macknight, W.J., Gagnon, K.D., Lenz, R.W., Hsu, S.L. Spectroscopic analysis of chain conformation distribution in a biodegradable polyester elastomer, poly(beta-hydroxyoctanoate) // Macromolecules, 1995. – V. – 28. – P. 2016–2022.
35. Liu, W.K., Chen, G.Q. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate with high 3-hydroxytetradecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007. – V. 76. – P. 1153–1159.
36. Kessler, B., Witholt, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism // Biotechnol., 2001. – V. 86. – P. 97–104.
37. Timm, A., Steinbüchel, A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads // Appl. Environ. Microbiol., 1990. – V. 56. – P. 3360–3367.
38. Langenbach, S. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-

hydroxyalkanoate) synthesis / S. Langenbach, B.H. Rehm, A. Steinbuchel // FEMS Microbiol. Lett., 1997. – V. 150. – P. 303-309.

39. Ren, Q. Fab, G. An NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli* / Q. Ren, N. Sierro, B. Witholt, B. Kessler // Bacteriol., 2000. – V. 182. – P. 2978-2981.

40. Park, S.J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers / S.J. Park, J.P. Park, S.Y. Lee // FEMS Microbiol. Lett., 2002. – V. 214. – P. 217-222.

41. Diniz, S.C., Taciro, M.K., Gomez, J.G.C., Pradella, J.G.D. High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates // Appl. Biochem. Biotechnol., 2004. – V. 119. – P. 51–69.

42. Hartmann, R., Hany, R., Pletscher, E., Ritter, A., Witholt, B., Zinn, M. Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: Batch versus chemostat production // Biotechnol. Bioeng., 2006. – V. 93. – P. 737–746.

43. Huijberts, G.N.M., Eggink, G. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2442 in continuous cultures // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996. – V. 46. –P. 233–239.

44. Kim, D.Y., Kim, H.W., Chung, M.G., Rhee, Y.H. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates // J. Microbiol., 2007. – V. 45. – P. 87–97.

45. van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., Witholt, B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes // Microbiol., 2001. – V. 147. – P. 1621–1630.

46. Jung, K., Hazenberg, W., Prieto, M., Witholt, B. Two-stage continuous process development for the production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) // Biotechnol. Bioeng., 2001. – V. 72. – P. 19–24.

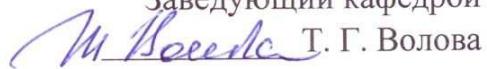
47. Kim, B.S. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer / B.S. Kim, S.C. Lee, S.Y. Lee, H.N. Chang, Y.K. Chang, S.I. Woo // Enzyme. Microb. Technol., 1994. – V. 16. – P. 556-561.
48. Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates // Appl. Environ. Microbiol., 1988. – V. 54. – P. 2924–2932.
49. Elbahloul, Y., Steinbüchel, A. Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonas putida* GPo1 and a simplified downstream process // Appl. Environ. Microbiol., 2009. – V. 75. – P. 643–651.
50. Шлегель, Г.Общая микробиология / Г. Шлегель // Мир. – М., 1987.- С. 567.
51. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Учеб. пособие для университетов и педагогических институтов // Высшая школа. – М., 1973. – С. 343.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 06 » июля 20 20 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Биосинтез полигидроксиалканоатов, включающих серосодержащие мономеры,  
бактериями *Cupriavidus necator* B-10646

Направление подготовки 06.04.01 – Биология

Профиль 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель

  
подпись, дата

Доцент,  
канд. биол. наук,  
Н.О. Жила

Выпускник

  
подпись, дата

С.С. Захарова

Рецензент

  
подпись, дата

канд. биол. наук,  
А.Н. Бояндин

Красноярск 2020