

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

Влияние $MgSO_4$ на процесс биосинтеза ПГА

Руководитель

подпись, дата

К.т.н.

должность, учёная степень

С. В. Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Е. Д. Мымликова

инициалы, фамилия

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Влияние $MgSO_4$ на процесс биосинтеза ПГА» содержит 41 страницу текстового документа и включает в себя 50 литературных источников, 1 таблицу, 3 формулы, 12 рисунков.

БИОРАЗЛОГАЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ, БИОПЛАСТИКИ, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПГА, БИОСИНТЕЗ, CUPRIAVIDUS EUTROPHUS, СУЛЬФАТ МАГНИЯ, $MgSO_4$.

Целью данной работы было исследовать влияние сульфата магния на процесс биосинтеза ПГА бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* В-10646.

Актуальность данной работы заключается в изучении влияния сульфата магния и определения концентрации, которая обеспечит наиболее благоприятные условия для биосинтеза ПГА. Сера и магний – одни из важных элементов минерального питания. Недостаток этих элементов вызывает нарушение в синтезе белка и ограничивает рост культуры. Поэтому, эффективный процесс биосинтеза ПГА не возможен без обеспечения заданных концентраций сульфата магния.

В результате проведённых экспериментов исследованы ростовые характеристики штамма-продуцента и биосинтез полимера бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 на опытном производстве Сибирского Федерального Университета и в ходе коротких экспериментов. Установлено, что содержание серы и магния в культуре с концентрациями 5-20 мг/л на опытном производстве являются оптимальными для интенсивного роста культуры. Определено, что с увеличением концентрации сульфата магния ростовые характеристики культуры возрастают, и также идет положительное влияние на утилизацию азотного субстрата. Установлено, что на первой стадии биосинтеза ПГА для обеспечения максимального роста культуры необходима концентрация сульфата магния 1,5 г/л. На втором этапе, для максимального накопления ПГА

концентрация $MgSO_4$ должна быть минимальна.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	1
СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
1.1 Характеристика ПГА	7
1.2 Влияние серы и магния на синтез ПГА	9
1.2.1 Влияние серы и ее соединений на синтез ПГА.....	10
1.2.2 Влияние магния на синтез ПГА.....	13
2.1 Объект исследования	16
2.2. Процесс культивирования ПГА.....	16
2.3 Культивирование на опытном производстве с использованием ферментеров.....	18
2.4 Микробиологический контроль.....	20
2.5 Анализ проб	21
2.5.1 Определение концентрации биомассы	21
2.5.2 Определение сухой биомассы клеток	21
2.5.3 Определение концентрации глюкозы	22
2.5.4 Определение концентрации азота (качественно)	22
2.5.5 Определение концентрации азота (количественно)	23
2.6 Расчет кинетических и продукционных параметров культуры	23
2.6.1 Удельная скорость роста	23
2.6.2 Определение субстратной константы	23
2.7 Методы обработки данных	24
3.1 Анализ биотехнологических журналов опытного производства	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Влияние сульфата магния на рост культуры и биосинтез ПГА	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.1 Влияние $MgSO_4$ на ростовые характеристики	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.2 Влияние различных концентраций сульфата магния на содержание ПГА.....	Ошибка! Закладка не определена.

3.2.3 Зависимость удельной скорости роста в экспоненциальной фазе от концентраций сульфата магния **Ошибка! Закладка не определена.**

3.2.4 Определение субстратной константы **Ошибка! Закладка не определена.**

3.3 Влияние различных концентраций сульфата магния на утилизацию азотного субстрата – карбамида **Ошибка! Закладка не определена.**

ВЫВОДЫ 24

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 25

ВВЕДЕНИЕ

С конца 60-х годов активно ведутся работы по исследованию биополимеров (биопластиков). Современная биотехнология позволяет получать широкий спектр целевых продуктов различной природы, включая новые экологически чистые биоматериалы с высокими потребительскими свойствами. Существуют два основных вида биополимеров: полимеры, производимые при помощи биологических систем (таких как микроорганизмы) и химически синтезированные полимеры на основе биологического сырья (аминокислот, сахаров, жиров) [1].

В последние годы все более актуальными становятся работы по полимерам биологического происхождения. Замена неразрушаемых синтетических полимеров, на биоразрушаемые, имеет огромное экологическое значение [39].

Среди применяемых и активно разрабатываемых в настоящее время биоразрушающихся полимеров можно выделить: алифатические полиэфиры, полиамиды, сегментированные полиэфируретаны, полимеры молочной и гликолевой кислот (полилактиды и полигликолактиды), силикон, полиэтилентерефталат, поли- β -гидроксibuтират и другие полимеры гидроксипроизводных жирных кислот, так называемые полигидроксиалканоаты [2, 31].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутри клеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными

элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода [3, 4]. *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha*) считают одним из наиболее исследуемых видов бактерий среди ПГА-продуцирующих микроорганизмов. В последние годы изучению ПГА уделяется огромное внимание благодаря их потенциальному применению в различных областях – от сельского хозяйства до медицины, так как по сравнению с обычными пластиками, получаемыми из нефти, ПГА разрушаются в аэробных/анаэробных условиях и являются биосовместимыми материалами [32]. Однако сравнение ПГА с другими эквивалентными коммерциализированными материалами (например, синтетические полимеры или нефтехимические пластики) показывает, что ПГА достаточно дорогие материалы.

Хотя технология культивирования и процесс экстракции полимера с каждым годом совершенствуются, в промышленном масштабе производство ПГА пока не может соревноваться с синтетическими пластиками из-за высокой стоимости субстратов для культивирования. В этой связи в настоящее время растет потребность в новых штаммах, способных синтезировать ПГА при росте на недорогих ростовых субстратах [5].

Цель работы - исследовать влияние сульфата магния на процесс биосинтеза ПГА бактерий штамма *Cupriavidus Eutrophus* В-10646.

Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ влияния добавок $MgSO_4$ на изменение концентрации биомассы и содержания полимера в процессе культивирования на опытном производстве;
2. Определить влияние различных концентраций $MgSO_4$ на ростовые характеристики, утилизацию азотного субстрата и процесс биосинтеза ПГА.

1 Обзор литературы

1.1 Характеристика ПГА

Полимеры, которые поддаются биологическому разложению, были разработаны несколько десятилетий назад, но их масштабное производство и применение появляется только сейчас в различных сферах деятельности [6].

Биополимеры разделяют на два основных типа:

1. Полимеры, производимые биологическими системами (микроорганизмами)
2. Химически синтезированные полимеры на основе биологического сырья (аминокислоты, сахара, жиры) [5].

Лидер по масштабам производства среди разрушаемых биопластиков на данный момент это - полилактиды - полимеры на основе молочной кислоты, которую можно получать химическим и биотехнологическим способами. Помимо полилактидов, другим перспективным биопластиком рассматриваются полигидроксиалканоаты (ПГА) [7].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода [8, 32].

Данные полимеры имеют различную химическую структуру и различаются базовыми физико-химическими свойствами. ПГА обладают

многими свойствами, полезными для различных сфер деятельности. Перспективность ПГА обусловлена весьма существенными преимуществами этого класса биополимеров:

- высокая биосовместимость ПГА;
- скорости биорезорбции 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;
- ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует таких технологических этапов, как синтез мономеров, полимеризация, добавление пластификаторов и модифицирующих компонентов;
- сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья [27, 34].

ПГА ассоциируются в клеточной цитоплазме в виде включений (гранул). Фотография гранул в культуре клеток бактерий *Azotobacter chroococcum* представлена на рисунке 1. [Nutietal., 1972].

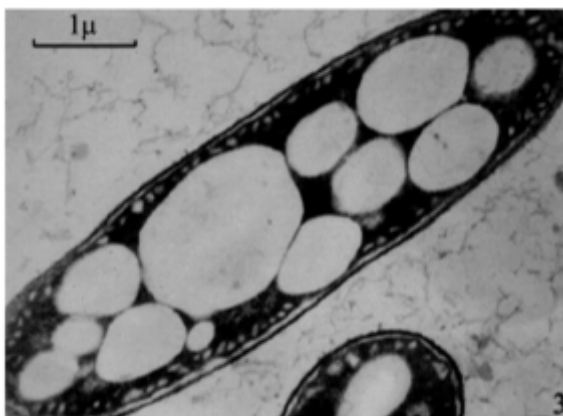


Рисунок 1. — Гранулы ПГА в культуре клеток бактерий *Azotobacter chroococcum* (трансмиссионный электронный микроскоп) [Nutietal., 1972]

ПГА являются резервными макромолекулами клетки и синтезируются прокариотами в специфических условиях несбалансированного роста при избытке углерода в среде, когда синтез азотсодержащих внутриклеточных молекул ограничен. Среди известных микроорганизмов синтезирующих ПГА

аэробные и анаэробные бактерии, гетеротрофы, хемоорганотрофы и хемоавтотрофы и другие [39]. Условия, обеспечивающие изменение направления конструктивного обмена клеток в сторону синтеза и аккумуляции ПГА, определяются окислительно-восстановительным состоянием цитоплазмы, внутриклеточной концентрацией ацетил-СоА [29, 50].

В аэробных условиях, ПГА разлагаются до углекислого газа и воды, в то время как в анаэробных условиях, ПГА образуют углекислый газ и метан в результате деградации. Они также способны 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.

Среди всех биопластиков они уникальны тем, что они полностью вырабатываются и разрушаются живыми клетками, а так же имеют широкий спектр использования [10, 12], например, для создания упаковок (контейнеры, пленки), средств личной гигиены (подгузники и т. д), печати (тонеры), электронных изделий (мобильные телефоны и др), а так же медицинских устройств (нити для швов, пластыри, ортопедические штифты, нервные направляющие, каркасы костного мозга и др.) [11, 13].

Так же ПГА чрезвычайно различаются между собой по физическим свойствам (гибкости, кристалличности, температуре плавления и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата [28, 37].

Немало важно отметить то, что ПГА обладают физико-химическими свойствами: кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада, биосовместимость, эластичность, а главное то, что каждым из свойств можно управлять, варьируя в процессе ферментации состав среды и задавая ту или иную химическую структуру. [8, 9].

1.2 Влияние серы и магния на синтез ПГА

Способность к продукции ПГА обнаружена у 300 различных бактерий [15]. В общем, ПГА-продуцирующих бактерий можно разделить на две группы в соответствии с условиями культивирования, необходимыми для синтеза полимера. Первая группа требует ограничения основного питательного вещества (в). Бактерии этой группы включают *Cupriavidus necator*, *Rhodopseudomonas palustris* и *Methylobacterium organophilum* [35, 36]. Вторая группа синтезирует ПГА наряду с ростом в среде культивирования. Сюда можно отнести *Alcaligenes latus* и рекомбинантную *E. coli*, содержащие гены биосинтеза ПГА [16]. Так же в производстве полигидроксиалканоатов используют смешанные микробные культуры [17], они не требуют стерильных условий и имеют более широкий метаболический потенциал, чем отдельные штаммы [18].

ПГА синтезируются в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты [11].

Водородные бактерии при культивировании в автотрофных условиях помимо углерода, кислорода и водорода, нуждаются и в других химических элементах – азоте, фосфоре, сере, магнии, калии, а также в микроэлементах. Известно, что макроэлементы потребляются клетками в ионной форме: K^+ , Mg^{++} , SO_4^{--} , HPO_4^- . [19]

1.2.1 Влияние серы и ее соединений на синтез ПГА

Сера — химический элемент VI группы периодической системы Д. И. Менделеева, относится к биогенным химическим элементам, т. е. постоянно входит в состав живых организмов и играет важную роль в обмене веществ. В медицине сера используется в качестве лекарственного средства, в сельском хозяйстве — для борьбы с вредителями и болезнями растений, в

промышленности применяется в органическом синтезе, в производстве взрывчатых веществ, резины, искусственных волокон, спичек и др [24].

Сера и ее соединения входят в состав некоторых микроорганизмов и практически всех растительных и животных организмов [22, 24].

В среднем в структуре белка на 15 частей азота приходится 1 часть серы [21].

Сера – один из самых важных элементов минерального питания бактерий, без которого их жизнь невозможна. Как и азот, она входит в состав всех белков микроорганизмов, являясь незаменимым компонентом ряда аминокислот. В отличие от азота, сера входит в состав только «избранных» аминокислот: цистеина, цистина и метионина. Цистеин – это простейшая структура, из которой организмы строят многие другие серосодержащие органические соединения. Цистин, например, представляет собой две соединенные молекулы цистеина. А метионин – это незаменимая аминокислота, которая не синтезируется в организме человека.

Сера является одним из составляющих витаминов, ферментов и т.д.

В активные центры молекул многих ферментов входят сульфгидрильные группы, имеющие большое значение для многих ферментативных реакций, протекающих в организме. Они участвуют в создании и стабилизации трехмерной структуры белков, а в некоторых случаях — непосредственно в функционировании каталитических центров ферментов. Полагают, что содержание серы в белках колеблется от 0,8 до 2,4%.

В трёх названных аминокислотах сосредоточено до 90 % серы, которая находится в организме. Остальные 10 % приходятся на другие соединения. Сера содержится в витаминах и коферментах, таких как тиамин (B1), биотин (B7), коэнзим А, глутатион, липоевая кислота. Она входит в состав ферментов, в том числе отвечающих за дыхание растений, например, в состав дегидрогеназы. Сера незаменима в растительных маслах.

Универсальными источниками серы служат сульфаты, которые впоследствии восстанавливаются до сульфидов и используются для

биосинтетических процессов. Некоторые микроорганизмы способны использовать сульфиты и элементарную серу, в основном это прокариоты и некоторые грибы. Обширная группа прокариотических микроорганизмов способна окислять восстановленные соединения серы (сероводород, тритионат, тиосульфат и др.) в дыхательной цепи и извлекать при этом энергию. Известны сульфатредуцирующие бактерии (например, вид *Chromatium okenii*), осуществляющие процесс анаэробного «сульфатного дыхания», происходящего с выделением в окружающую среду сероводорода H_2S . [20]

Ограничение роста бактерий дефицитом серы также снижает эффективность использования бактериями водорода и влияет на химический состав. При 20 %-й обеспеченности клеток элементом экономический коэффициент по водороду составляет 0.81 г/г. При этом сокращается содержание азотсодержащих компонентов в клетках; изменяется аминокислотный состав белка. Очень значительно, до 33.2 %, возрастает концентрация полимера в клетках [23].

Варьируя концентрацию сульфата в среде, можно влиять на молекулярную массу синтезируемого полимера, а при изменении концентрации кальция изменяется соотношение моносахаридов, входящих в состав данного вещества, следовательно, и его свойства [49].

Показано, что при культивировании дрожжей *Candida* и *Saccharomys* на стандартной по остальным элементам минеральной среде наибольшее количество биомассы достигается при концентрации серы в минеральной среде, равной 0,2-0,3 мМ. Так же проведенные эксперименты доказывают, что снижение концентрации серы в питательной среде резко уменьшает активность роста или полностью его ингибирует [25].

Недостаток серы вызывает нарушения в синтезе белка. И не только количество белка находится в прямой взаимосвязи с обеспеченностью серой, также она влияет на качество белка. Растения способны поглощать достаточно большие количества серы: содержание серы в пересчете на элемент колеблется от 0,1 до 1% сухого вещества растений [26].

В большей степени на биосинтетическую активность водородных бактерий влияет дефицит азота, серы, фосфора. Уменьшение удельной скорости роста, вызванное перечисленными элементами, сопровождается существенным изменением и биохимического состава клеток.

При азотном голодании, естественно, наиболее значительно подавляется синтез белка: его содержание в клетках снижается. Количество нуклеиновых кислот сокращается. При дефиците серы количество белков и нуклеиновых кислот у микроорганизмов также сокращается и азот накапливается в небелковой форме или в форме нитратов.

По внешним признакам дефицит серы похож на азотное голодание, поскольку похожа роль серы и азота в метаболизме микроорганизмов. Это следует иметь в виду, определяя по внешним признакам дефицит в том или ином элементе. Если при дефиците серы ошибочно повысить норму азотного показателя, это не исправит положения, а наоборот приведет к снижению роста культуры. Постоянная подача серы в культуру микроорганизмов очень важно для их нормального роста.

1.2.2 Влияние магния на синтез ПГА

К макроэлементам, необходимым для синтеза белковых молекул относится и магний. Основная функция данного элемента – активация многих ферментов, обязательных для нормального метаболизма клеток и роста микроорганизмов, а также фермента энолазы. Преобладающее значение ионы магния Mg^{2+} имеют в гликолитическом цикле (перенос фосфатов) и в процессе фосфорилирования [33]. Часто магний является связующим компонентом между ферментом и субстратом, принимает участие в стабилизации двойной спирали ДНК. Эффективное действие магния напрямую зависит от концентрации источников углерода, от концентрации других ионов, по отношению к которым магний является антагонистом, и ряда других факторов

[43].

Наиболее часто источники магния, как и калия, вносят в питательную среду в виде его солей: сульфат магния ($MgSO_4$), эпсомит — ($MgSO_4 \times 7H_2O$), после обезвоживания которого получают кизерит ($MgSO_4 \cdot H_2O$). Так, для промышленного культивирования штаммов трансформированных *Escherichia coli* в питательную среду вносят 0,24 г/л сульфата магния $MgSO_4$. В процессе культивирования ведется экспоненциальная подпитка растворами сульфата магния. [43, 44]

На недостаток магния водородные бактерии отвечают перестройкой синтетического аппарата при очень низких концентрациях в питательной среде. Синтез белков при недостатке магния лимитируется.

Магний необходим для многих ферментов гликолиза и цикла Кребса. В митохондриях при его недостатке наблюдается уменьшение количества, нарушение формы и в конечном счете исчезновение крист. Для девяти из двенадцати реакций гликолиза требуется участие металлов-активаторов и шесть из них активируются магнием. Это четыре киназы (гексо-, фосфофрукто-, фосфоглицерат-, пируваткиназы), енолаза и пируваткарбоксилаза.

За исключением фумаразы, все ферменты цикла Кребса активируются магнием или содержат его как интегральный компонент структуры. Для двух из семи ферментов пентозофосфатного пути (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и транскетолаза) также необходим Mg. Он требуется и для работы ферментов молочнокислого и спиртового брожения.

Магний — является одним из наиболее важных биоэлементов: служит активатором многих ферментативных процессов (регулирует реакции фосфорного обмена, гликолиза, многие этапы синтеза белков, жирных кислот и липидов, синтез и распад нуклеиновых кислот. В большинстве реакций, в которых принимает участие АТФ, обязательным является образование его комплекса с Mg^{2+} . Магний представляет собой один из наиболее распространенных на Земле элементов. В природе магний встречается исключительно в виде соединений. Он входит в состав многих минералов [45].

Наряду с натрием, калием, кальцием и цинком магний обнаруживается в живых организмах в значительных количествах. В растительных продуктах содержание магния обычно в несколько раз выше, чем в продуктах животного происхождения. В растениях магний обнаруживается в составе хлорофилла. Некоторые организмы (литотамниевые водоросли, фораминиферы, известковые губки способны накапливать его в больших количествах. [24]

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Для процесса культивирования использовался штамм бактерий *Cupriavidus euthrophus* В-10646, способный синтезировать ПГА. Процесс включает культивирование бактерий-продуцентов на среде, с содержанием углеродосодержащего ростового субстрата с добавлением различных концентраций сульфата магния.

Штамм получен в лаборатории хемоавтотрофного биосинтеза в Институте биофизики СО РАН зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) [30].

Культурально-морфологические особенности штамма: грамотрицательные, слабо подвижные клетки.

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. Оптимум роста 30-31°C, рН 6,7-7,2.

2.2. Процесс культивирования ПГА

Культивирование в колбах. Подготовка инокулята.

Бактерии выращивали в условиях, разработанных для синтеза ПГА. Посевной материал получали в строго стерильных условиях путем ресуспендирования музейной культуры, хранящейся на скошенной



агаризованной среде. В дальнейшем культуру выращивали в жидкой среде Шлегеля с концентрацией глюкозы 20 г/л (на 1 л. культуры).



Рисунок 1 – пробирка с музейной культурой бактерий штамма *S. eutrophus* B-10646 на скошенном агаре

Рисунок 2 – литровые колбы с инокулятом культуры *S. eutrophus* B-10646

Рисунок 3 - Шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova 44®» для культивирования бактерий колбах объемом от 1 до 3 л.

Инокулят получали в строго стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) в стеклянных колбах объемом от 0,5 до 2,0 л с коэффициентом заполнения 1/2 при 30 °С и 200 об/мин.

Для выращивания бактерий за основу принята солевая среда Шлегеля. Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который добавляют из расчета 5 мл/л. Микроэлементы добавляли по прописи Хоагланда из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 литр среды [3].

В качестве источника азота использовали карбамид (мочевину) с концентрацией 2 г/л.

Различные концентрации $MgSO_4$ были поданы только в начале эксперимента. Сульфат магния был добавлен с концентрациями 0 г/л; 0,05 г/л; 0,1 г/л; 0,2 г/л; 0,5 г/л; 1 г/л и 1,5 г/л.

2.3 Культивирование на опытном производстве с использованием ферментеров

Культивирование бактерий *C. euthrophus* В-10646 проводили в строго

стерильных условиях на
производстве Сибирского
Университета, с
использованием ферментера
Bioengineering NLF 22
объем которого 30 л. (рабочий
20 л), при температуре 30°C, и
ферментера фирмы
P 150 (Швейцария) с объемом
л. (рабочий объем от 10 до 110



ОПЫТНОМ
Федерального
фирмы
(Швейцария)
объем от 5 до
затем
Bioengineering
аппарата 150
л).



А

Б

Рисунок 4. А) Фото ферментера «Bioengineering NLF 22», объемом 30 л

Б) Фото ферментера Bioengineering P 150», объемом 150 л

Для культивирования в ферментерах также по вышеописанной технологии получали инокулят в стерильных условиях объемом в среднем 18 л.

Затем культуру сгущали путем центрифугирования до 3 – 4 л. Полученный инокулят подавался в ферментер NLF 22 Bioengineering (30 л.), через загрузочный порт в стерильных условиях, в котором уже находится приготовленная питательная среда.

Культивирование осуществляется в две стадии. На первой стадии происходит накопление биомассы в течение 24 ч до концентрации 40–50 г/л. На данном этапе используются подпитывающие растворы солей азота и глюкозы. Коррекция концентрации основных питательных субстратов (глюкоза, карбамид) производится аппаратчиком с помощью перистальтических насосов. Параметры процесса ферментации: температура плюс $30 \pm 0,5$ °С, концентрация растворённого кислорода dO 25 ± 7 %, обороты мешалки 100-700 оборотов в минуту.

На второй стадии лимитируют подачу азота. В этот момент концентрация клеток перестаёт увеличиваться, а содержание полимера в клетках растёт.

2.4 Микробиологический контроль

Для проверки стерильности инокулята и питательных сред необходимо производить отбор проб и посев на агаризованную среду. Пробы для микробиологического контроля были отобраны во время подготовки инокулята, на засева в ферментер, через сутки процесса культивирования и после перекачки в большой ферментер.

Все манипуляции, связанные с посевом и выделением микробных культур, производятся в стерильных условиях.

Перед посевом вся посуда проверяется на целостность и стерилизуется. Для посева бактерий применяется пептонный агар (ПА).

Работа по микробиологическому контролю включает четыре этапа:

- подготовка плотной питательной среды для посева;
- приготовление разведений (10^{-7});

- посев на плотную питательную среду в чашки Петри;
- визуальная оценка выросших колоний.

Бактерии штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 выглядят как изолированные морфологически однородные округлые колонии светло-кремовые, непрозрачные со слегка волнистым краем диаметром 2-4 мм. Стерильными считаются те пробы культуры, в посевах которой отсутствует рост посторонних микроорганизмов через восемь суток с начала посева или через 5 суток с момента пересева.

2.5 Анализ проб

2.5.1 Определение концентрации биомассы

Изменение биомассы клеток в процессе роста культуры регистрировали оптическими показателями культуры. Для измерения оптической плотности периодически отбирали пробы культуры, использовали фотокolorиметр

1 мл пробы + 5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешать (пипетировать). Разбавленную пробу налить в кювету на 1 мм и измерить в фотометре «UNICO 2100». В качестве контроля использовать дистиллированную воду. Измерения проводить при длине волны 440 нм.

Если оптическая плотность больше 1, то необходимо измерять в разведении 1:20.

0,5 мл пробы + 10 мл дистиллированной воды, пипетировать. Контроль - дистиллированная вода, кювета – 1мм и длинна волны – 440 нм.

2.5.2 Определение сухой биомассы клеток

Концентрацию клеток X , г/л, регистрировали весовым способом. Для этого необходимо взять аликвоты бактериальной суспензии, объемом 10-25 мл, центрифугировать 10 мин при 6000 об/мин; дважды отмыть клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировать. Отмытые клетки

перенести в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Пробы высушить при температуре 105 °С в течение суток, охладить в эксикаторе и взвесить. Биомассу бактерий в культуре определить как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

2.5.3 Определение концентрации глюкозы

В 2 центрифужный стакан (эппендорф) внести пробу объемом 2 мл и открутить на центрифуге «Hamil Micro-6» в течении 3-5 мин. Затем к 1 мл надосадочной жидкости добавить 4 мл дистиллированной воды и пипетировать. В 3 пробирки и внести сначала по 2 мл ферментно-хромогенной смеси (ФХС), а потом в первую пробирку – 40 мкл дистиллированной воды; во вторую пробирку – 40 мкл калибратора из набора «Глюкоза - ФКД»; в третью пробирку – 40 мкл разведённой надосадочной жидкости. Оставить на 25 минут при комнатной температуре. Через 5 минут после добавления ферментно-хромогенной смеси взболтать пробирки.

Измерение проводить с использованием фотометра «UNICO 2100», кюветы - 5 мм, длина волны 490 нм. В качестве контроля пробирка №1. Результат вычислить по формуле (1)

$$K_{\text{гл}} = \frac{O.P._{\text{пробы}}}{O.P._{\text{калибратор}}} * 9, \quad (1)$$

где $K_{\text{гл}}$ – концентрация глюкозы; $O.P._{\text{пробы}}$ - оптическая плотность пробы и $O.P._{\text{калибратора}}$ – оптическая плотность калибратора.

2.5.4 Определение концентрации азота (качественно)

1 мл пробы + 10 мл дистиллированной воды. Добавить 1-2 капли 33% КОН и 0,5 мл реактива Неслера. Исходя из цвета реакции определить концентрацию.

2.5.5 Определение концентрации азота (количественно)

2 мл культуры центрифугировать в течении 2 мин на центрифуге «Eppendorf».

0,5 мл надосадочной жидкости разбавить в 50 мл дистиллированной воды. Тщательно перемешать. В пробирку налить 10 мл пробы и добавить каплю щелочи и 0,5 мл реактива Несслера.

Измерить оптическую плотность на ФЭКе с синим светофильтром при длине волны 400 нм. В качестве контроля – дистиллированная вода.

2.6 Расчет кинетических и продукционных параметров культуры

Критериями оценки процесса биосинтеза ПГА служили: концентрация биомассы клеток в культуре, выход полимера, длительность и продуктивность процесса. Для этого находили общепринятыми методами кинетические и продукционные параметры культуры [3, 28].

2.6.1 Удельная скорость роста

Удельную скорость роста культуры ($m, ч^{-1}$) определяли по уравнению:

$$\mu = \ln \left(\frac{x_k}{x_n} \right) / \Delta t, \quad (2)$$

где:

x_n , - начальная концентрация бактерий, г/л;

x_k –конечная концентрация бактерий, г/л;

Δt – время культивирования, ч.

2.6.2 Определение субстратной константы

Субстратную константу определяли по уравнению Моно методом

линеаризации данных по Лайнуиверу-Бэрку (М. С. Мосичев, А. А. Складнев, В. Б. Котов)

2.7 Методы обработки данных

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 7.

ВЫВОДЫ

1. Проведен анализ влияния сульфата магния на продукционные характеристики в процессе культивирования на опытном производстве. Установлено, что сульфат магния может оказывать как лимитирующее, так ингибирующее действие на бактерии, что негативно отражается на продукционных характеристиках всего процесса биосинтеза ПГА.

2. Установлена концентрация сульфата магния (1,5 г/л), обеспечивающая максимальные ростовые характеристики культуры *Cupriavidus eutrophus* В-10646. Субстратная константа составила 0,015 г/л, а $\mu_{max} = 0,052$ ч⁻¹.

Концентрации MgSO₄ менее 1,5 г/л оказывают лимитирующее действие на процесс, приводит к увеличению содержание полимера в клетках и снижению скорости роста культуры. Кроме того установлено, что утилизация азота зависит от концентрации MgSO₄. Недостаток приводит к неполной утилизации азотного субстрата.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Волова, Т.Г. Физико-Химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения. / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов, А. Д. Васильев, А. Г. Суковатый, А. J. Sinsky // Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2013, том 55, № 7, с. 775–786.
2. Вторичные ресурсы: проблемы, перспективы, технология, экономика: Учеб. пособие / Г. К. Лобачев [и др];– Волгоград, 1999. – С. 180.
3. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh., H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. - 2000.- С.1503-1555.
4. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // Proc. Biochem., 2004. – С. 607 – 619.
5. Волова Т. Г. Синтез биорезорбируемых полимеров. Структура и свойства / Т. Г. Волова // Известия высших учебных заведений. Физика. - 2013. - Т. 56, № 12(3). - С. 27-32.
6. Султыгова А. К. Синтез биodeградируемых полимеров на основе полиэфиров / А. К. Султыгова, М. Б. Бекбузаров, Б. А. Темирханов, З. Х. Султыгова // Органическая, биоорганическая и фармацевтическая химия. -

2014. - № 2. С. 158-161.

7. Volova T. G. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates / T. G. Volova, E. I. Shishatskaya. N. O. Zhila, E. G. Kiselev, P. V. Mironov, A. D. Vasiliev, I. V. Peterson, A. J. Sinskey // Journal of Siberian Federal University. Biology 3. - 2012. - № 5. - P. 280-299.

8. Жила, Н.О. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* В-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Н. О. Жила, Т. Г. Волова, Г. С. Калачева // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2014. - № 2. - С.161-173.

9. Zhilaa N. O. Microbial Synthesis and Characterization of Poly (3-Hydroxybutyrate-co- 4-Hydroxybutyrate) Copolymers / N. Zhilaa, T. Volovaa, E. Nikolaeva, D. Syrvacheva - Bioresource Technology – 2012. – V. 124. – P. 216–235

10. Koller M. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resources / M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, G. Brauneegg // Materiali in Tehnologije. - 2012. - №46. - P. 23-30

11. Verlinden, R. A. J. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates / R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, I. J. Radecka // Journal of Applied Microbiology. - 2007. - № 102. - P. 1437 — 1449.

12. Chee J.-Y. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics / J.-Y. Chee, S.-S. Yoga1, N.-S. Lau, S.-C. Ling, R. M. M.Abed, K.Sudesh // Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. - 2010. - P. 1395 – 1404.

13. Chen Y. Effects of cell fermentation time and biomass drying strategies on the recovery of poly-3-hydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* using a surfactantchelate aqueous system / Y. Chen, Q. Xu, H. Yang, G. Gu // Process Biochemistry. - 2001. - № 36. - P. 773-779.

14. Hanson A. J. Community proteomics provides functional insight into polyhydroxyalkanoate production by a mixed microbial culture cultivated on fermented dairy manure / A. J. Hanson, N. M. Guho, A. J. Paszczynski, E. R. Coats //

Applied Microbiology Biotechnology. - 2016. - № 100. — P. 7957 – 7976.

15. Inoue D. Polyhydroxyalkanoate production potential of heterotrophic bacteria in activated sludge / D. Inoue, Y. Suzuki, T. Uchida, J. Morohoshi, K. Sei // Journal of Bioscience and Bioengineering. - 2016. - Vol. 121. № 1. - P. 47 — 51.

16. Akaraonye E. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice / E. Akaraonye, T. Keshavarz, I. Roy // Journal of Chemical Technology and Biotechnology. - 2010. - № 85. - P. 732–743.

17. Красильникова, Е. Н. Регуляция метаболических путей у бактерий рода *Sulfobacillus* при изменении степени аэрации среды / Красильникова, Е. Н. Л. М. Захарчук, 1, М. А. Егорова // Микробиология, 2010, том №10, с 166-172.

18. Chiara S. Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery / S. Chiara, F. Abbondanzi, P. Galletti, L. Giorgini, L. Mazzocchetti, C. Torri, E. Tagliavini // Bioresource Technology. - 2015. - № 189. - С.195 — 202.

19. Кеслер Т. Г. Влияние режима минерального питания на биосинтез водородных бактерий в непрерывной культуре. / Т. Г. Кеслер, М. И. Вебер, И. Н. Трубачев, Ф. Я Сидько // Непрерывная культура водородных бактерий как средство биосинтеза белка. Красноярск, 19746, с. 45—52.

20. Белясова Н. А. Микробиология учебное пособие / Н.А. Белясова Учебник Министерства образования, Высшая школа, Минск, 2012, 443 с.

21. Лысак В.В. Микробиология : учебное пособие / В. В. Лысак. – Высшая школа, Минск : БГУ, 2007, 200 с.

22. Волков А.И. Большой химический справочник / А. И. Волков, И. М. Жарский – Академия, Москва, 2005, 402 с.

23. Калачева Г.С. Синтез полиэфиров гидроксипроизводных жирных кислот и характеристика состава липидов сине-зеленых, святающихся и водородокисляющих прокариот: дис ... док. биол. наук: 03.01.06 / Калачева Галина Сергеевна: - Красноярск, 2012. - 71

24. Тюкавкина Н. А. Биоорганическая химия / Н.А. Тюкавкина, Ю. И.

Бауков - Учебное пособие, Москва, 2004.

25. Исакова Е.П. Исследование механических свойств, морфологии и биоразлагаемости композиций полилактида с полисахаридами / Е.П. Исакова, Научный журнал - Химия растительного сырья, № 1, Москва, 2014.

26. Исайчев В. А, Влияние макроэлементов и регуляторов роста на динамику содержания азота, фосфора, калия и серы в растениях озимой пшеницы сорта Бирюза в условиях лесостепи среднего Поволжья // В. А. Исайчев, Н. Н. Андреев, 2016.

27. Anderson A. J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / Anderson A. J., Dawes E. A. // Microbiological Reviews. - 1990. - № 54. P. 450 – 472.

28. Жила, Н. О. К вопросу о внутриклеточной деградации полигидроксипропаноата / Н. О. Жила, Г. С. Калачева, Т. Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Сер. 2. Биология. - 2015. - №8. - С. 220-235.

29. Замышляева О. Г. Методы исследования современных полимерных материалов : учебно-метод. Пособие / О. Г. Замышляева. - Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 90 с.

30. Волова Т., Шишацкая Е. Штамм бактерий ВКПМ В-10646 1. – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения. // Патент РФ № 2439143 - 2012.

31. Елинов Н. П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов учебное пособие СПб: Наука, 1995, 149-152 с.

32. Волова, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Красноярск.: СО РАН, 2002. – 267 с.

33. Довлатбемян К.Г. Кальций и магний для растений – макроэлементы первого порядка / К. Г. Довлатбемян, В. А. Волков, И.С. Полянская// Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2015. – 67 - 84 с.

34. Akaraonye E. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice / E. Akaraonye, T. Keshavarz, I. Roy // Journal of Chemical

Technology and Biotechnology. - 2010. - № 85. - P. 732–743.

35. Chiara S. Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery / S. Chiara, F. Abbondanzi, P. Galletti, L. Giorgini, L. Mazzocchetti, C. Torri, E. Tagliavini // *Bioresource Technology*. - 2015. - № 189. - C.195 — 202.

36. Hanson A. J. Community proteomics provides functional insight into polyhydroxyalkanoate production by a mixed microbial culture cultivated on fermented dairy manure / A. J. Hanson, N. M. Guho, A. J. Paszczynski, E. R. Coats // *Applied Microbiology Biotechnology*. - 2016. - № 100. — P. 7957 – 7976.

37. Madison, L.L. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic / L.L. Madison, G.W. Huisman // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999: 63,21-53 с.

38. Volova T. Cell growth and PHA accumulation from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B -10646 // Volova T., Kiselev E., Shishatskaya E., Zhila N ., Boyandin A., Syrvacheva D., Vinogradova O., Kalacheva G., Vasiliev A., Peterson I. *Bioresource Technology* – 2013. – V. 146. – P. 215–222

39. Волова, Т.Г. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс]: учеб.-метод. пособие для самостоят. работы [для студентов программы подг. 020400.68 «Биология»] / Сиб. федерал. ун-т ; сост.: Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. - Красноярск : СФУ, 2013. - С. 73.

40. Zhilaa N. Microbial Synthesis and Characterization of Poly (3-Hydroxybutyrate-co- 4-Hydroxybutyrate) Copolymers / N. Zhilaa, T. Volovaa, E. Nikolaeva, D. Syrvacheva - *Bioresource Technology* – 2012. – V. 124. – P. 216–235

41. Guho N. M. Community proteomics provides functional insight into polyhydroxyalkanoate production by a mixed microbial culture cultivated on fermented dairy manure / N. M. Guho, A. J. Hanson, A. J. Paszczynski, E. R. Coats // *Applied Microbiology Biotechnology*. - 2016. - № 100. — P. 7957 – 7976.

42. Koller M. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers and plastics from renewable resources / M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, G. Brauneegg

// *Materiali in Tehnologije*. - 2012. - №46. - P. 23-30

43. Каримов И. Ф. Влияние тромбоцитарного катионного белка на биолюминесценцию и жизнеспособность рекомбинантного штамма *Escherichia coli* с клонированным Lux-опероном *Photobacterium leiognathi* / И. Ф. Каримов, Ю. Б. Иванов, Д. Г. Дерябин // Оренбургский государственный университет, 2009. - № 2. - С. 138-142.

44. Хамитов Р. А. Разработка технологии промышленного культивирования штамма *E. coli* — продуцента фермента ULP-протеиназы, осуществляющего протеолитический процессинг SUMO-интерферона, гибридного белка-предшественника α -интерферона / Р. А. Хамитов, Н. А. Литвинова, Н. В. Стратонова, В.С. Леонов – Дальневосточный государственный медицинский университет, 2013. - 70

45. Мануйлов А. В. Основы химии/ А. В. Мануйлов, В. И. Родионов - Новосибирск: НГУ, 1998. - 350

46. Zhilaa N. Characterization of *Cupriavidus eutrophus* B-10646 Culture Synthesizing Polyhydroxyalkanoates Grown on Sugars And Lipidic Substrates/ N. Zhilaa T. Volovaa, G. Kalachevaa - *Bioresource Technology* – 2013. – V. 124. – P. 216–235

47. Volova T. G. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates / T. G. Volova, E. I. Shishatskaya. N. O. Zhila, E. G. Kiselev, P. V. Mironov, A. D. Vasiliev, I. V. Peterson, A. J. Sinskey // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 3. - 2012. - № 5. - P. 280-299.

48. Деревянко В. Н. Исследование химического взаимодействия оксида магния раствора солей-электролитов / В.Н Деревянко, А. А. Максименко, А. И. Бегун, А. Н. Гришко – Днепропетровск, 2015. - 70

49. Волова Т. Г. Биотехнология : учебное пособие / Т. Г. Волова. – Новосибирск: СО РАН, 1999. – 254

50. Dawes, E.A. Novel biodegradable microbial polymers. Kluwer Academic, Dordrecht / E.A. Dawes. - Netherlands, 1990.- С. 287.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 18 » июня 20 18 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Влияние $MgSO_4$ на процесс биосинтеза ПГА

Руководитель


подпись, дата

К.т.н.

должность, учёная степень

С. В. Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Е. Д. Мымликowa

инициалы, фамилия

Красноярск 2018