

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 условий культивирования на рост бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 и синтез сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата)

Научный руководитель

\_\_\_\_\_  
Подпись, дата

\_\_\_\_\_  
Должность, ученая степень

Жила Н.О.

\_\_\_\_\_  
Инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_  
Подпись, дата

Болотова К.С.

\_\_\_\_\_  
Инициалы, фамилия

Красноярск 2019

## Содержание

Реферат.....	3
Введение .....	4
Глава 1. Обзор литературы .....	6
1.1 Полигидроксиалканоаты – природные полиэферы.....	6
1.2 Классификация и структура ПГА.....	7
1.3 Влияние NaCl на рост бактерий и синтез полимера.....	9
1.4 Влияние температуры культивирования на рост бактерий и синтез полимера.....	12
1.5 Влияние соотношения C:N и объема культуры на рост бактерий и синтез полимера	13
Глава 2. Материалы и методы .....	14
2.1 Штамм <i>Cupriavidus eutrophus</i> B-10646.....	14
2.2 Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования .....	14
2.3 Определение концентрации фруктозы.....	15
2.4 Определение содержания в клетках состава ПГА.....	16
2.5 Выделение полимера .....	16
2.6 Определение молекулярной массы полимера.....	16
Глава 3. Результаты .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.1 Исследование влияния NaCl .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.2 Исследование влияния коэффициента наполнения..	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.3 Исследование влияния температуры культивирования на рост бактерий и синтез полимера .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.4 Исследование влияния соотношения C:N .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Заключение .....	18
Список использованных источников.....	20

## Реферат

Бакалаврская работа на тему «Влияние условий культивирования на рост бактерий *Cupriaviduseutrophus*B-10646 и синтез сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата)» содержит 37 страниц текстового документа, 35 использованный источник, 17 рисунков.

CUPRIAVIDUSEUTROPHUS, ПОЛИМЕР, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТ), NaCl, БИОМАССА, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

Целью работы было исследование способности бактерий штамма *Cupriaviduseutrophus*B-10646 расти и синтезировать сополимер П(ЗГБ/ЗГВ) в различных условиях культивирования. В задачи входило: 1) Исследовать влияние хлорида натрия на рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) при добавлении 3-гидроксивалериановой кислоты в среду; 2) Исследовать влияние различного коэффициента заполнения на рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) при добавлении 3-гидроксивалериановой кислоты в среду; 3) Исследовать влияние различного температурного режима культивирования на рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) при добавлении 3-гидроксивалериановой кислоты в среду; 4) Исследовать влияние соотношения C:N на рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) при добавлении 3-гидроксивалериановой кислоты в среду; 5) Исследовать молекулярно-массовые характеристики сополимера.

Актуальность работы:

Синтез ПГА у *C. eutrophus* тесно связан с условиями культивирования данного вида бактерий. Подбор таких условий культивирования, при которых станет возможным снизить стоимость производства полимера, является перспективным направлением исследований.

## Введение

В настоящее время пластмассовые изделия плотно вошли в нашу жизнь. Они удобны в использовании, экономичны, легки в изготовлении. Однако их утилизация – проблема экологического характера. По данным на 2013 год, в мире насчитывается свыше 400 видов пластмассовых отходов. Мировое производство пластмасс ежегодно возрастает на 5-6%, приводя к соответствующему увеличению пластиковых отходов. Свалки таких отходов - опасный источник загрязнений окружающей среды, при горении они выделяют опасные вещества, такие как: оксиды азота, серы, хлористый водород и др. [1]

Одно из решений данной проблемы – это вторичная переработка, однако, это очень трудоемкий и энергозатратный процесс, не говоря уже о том, что вторично переработанный пластик будет стоить дороже, но качество его будет ниже. И соответственно, рано или поздно, даже переработанный пластик необходимо будет утилизировать, что в корне не решает проблему экологичности.

На основе распрей на тему экологичного решения проблемы, нашлось решение в виде производства биоразрушаемых полимерных соединений. [2]

Биоразлагаемые полимеры – полимерные материалы, способные под влиянием окружающей среды, в том числе под воздействием микроорганизмов, разлагаться на нейтральные для окружающей среды вещества. Основным плюсом в использовании биополимеров является их относительно недолгое разложение по отношению к их нефтехимическим аналогам.

Основной представитель биodeградируемых полимеров - это полигидроксиалканоаты (ПГА) – принадлежащие к классу алифатических полиэфиров на основе гидроксикарбоновых кислот. ПГА синтезируются прокариотическими организмами, как место хранения углерода и энергии, как правило, при дефиците азота. ПГА по физико-химическим свойствам сходны с синтетическими полимерами, не разрушающимися в природной

среде. Тем самым, они представляют собой наиболее привлекательную замену последним. [3]

Целью настоящей работы было исследование способности бактерий штамма *Cupriaviduseutrophus*B-10646 расти и синтезировать сополимер П(ЗГБ/ЗГВ) в различных условиях культивирования.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние хлорида натрия на рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ);
2. Исследовать рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ) в условиях различного коэффициента заполнения колб культурой бактерий;
3. Исследовать влияние температуры культивирования на рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ);
4. Исследовать влияние различных концентраций хлорида аммония в среде на рост бактерий и синтез сополимера П(ЗГБ/ЗГВ);
5. Исследовать молекулярно-массовые характеристики сополимера П(ЗГБ/ЗГВ), синтезированного в различных условиях культивирования.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Полигидроксиалканоаты – природные полиэфиры

Полигидроксиалканоаты представляют собой полиэфиры гидроксипроизводных жирных кислот, синтезированные микроорганизмами для хранения энергии. В отличие от других биоразлагаемых полиэфиров, ПГА синтезируются *invivo*, тогда как остальные синтезируются *invitro* химическим путем. Бактерии запасают ПГА в цитоплазме, где ПГА существуют в виде гранул размером от 0,2 до 0,5 мкм.

Бейеринк первым обнаружил ПГА в клетках бактерий в 1888 г. Французский ученый Лемоин впервые описал ПГА в клетках *Bacillus megaterium* в виде поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) в 1925 г. [4] Позже Макре и Улкинсон в 1958 году в своем докладе указали на быструю биоразрушаемость П(ЗГБ). С этого момента интерес к П(ЗГБ) возрос. В последующие годы проводились исследования П(ЗГБ) и других представителей класса ПГА, получаемых с использованием различных микроорганизмов. И после этого стали реализовываться возможные виды применения для данного типа полимера. [5] ПГА синтезируются огромным множеством микроорганизмов, однако, далеко не все из них подходят для промышленного производства полимера [33]. Основными субстратами для синтеза ПГА могут служить сахара, спирты, органические кислоты, промышленные отходы, CO<sub>2</sub> и тд [35].

Помимо термопластичности, ПГА обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, они характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью. [6] 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. [7]

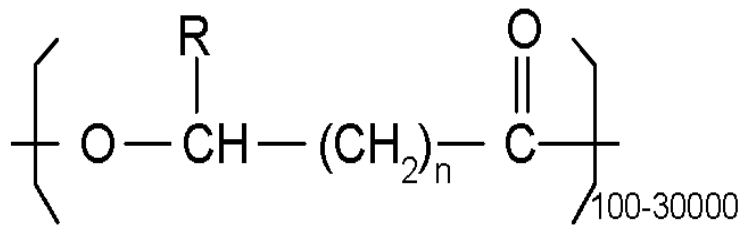
Температурные характеристики П(ЗГБ) и способность кристаллизоваться в нативном состоянии являются наиболее значимыми параметрами, так как определяют термомеханические свойства и, следовательно, возможности переработки полимера в специальную продукцию и изделия. Также очень важным параметром, характеризующим свойства полимера, является молекулярно-массовое распределение [32]. 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. [8] Полигидроксиалканоаты имеют огромный потенциал использования в самых различных областях: в хирургии и фармацевтике, в сельском хозяйстве, пищевой промышленности - в качестве упаковочного материала, в косметологии и многих других областях. ПГА обладают самыми разнообразными свойствами, благодаря более чем 150 вариациям мономеров [17]

ПГА могут быть синтезированы из биовозобновляемых ресурсов таких, как сахара, растительные масла и даже диоксида углерода [34]

## **1.2 Классификация и структура ПГА**

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

ПГА состоят из мономеров гидроксипроизводных жирных кислот. Общая структурная формула полигидроксиалканоатов представлена на рисунке 1.



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

R = метил - поли (3-гидроксипропионат)

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-гидроксипропионат)

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

Рисунок 1 – 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-lengthPHAs/ PHASHL), в состав их мономеров входят от трех до пяти углеродных атомов и являются природными термопластичными полимерами;
2. Среднецепочечные ПГА (Medium-chain-lengthPHAs/PHAMCL), мономерный состав из 6-14 углеродных атомов, представляют собой природные эластомеры;
3. Длинноцепочечные ПГА (long-chain-lengthPHAs/PHALCL) являющиеся сополимерами коротко – и среднецепочечных ПГА и включающие в мономерный состав свыше 14 углеродных атомов.

[7]



### **1.3 Влияние NaCl на рост бактерий и синтез полимера**

Галофилы – организмы, которые нуждаются в соли для роста, их можно найти во всех областях жизни – археи, бактерии, эукариоты. [18]

По отношению к солености микроорганизмы разделяют на несколько физиологических групп. Негалофильные микроорганизмы обитают в пресных водоемах, где концентрация NaCl не превышает 0,01%. Галотолерантные выдерживают более высокие концентрации и часто обитают в местах с меняющейся соленостью, например, в почве. Слабые галофилы оптимально растут при солености около 3.5% Умеренные галофилы лучше всего растут на средах, содержащих 5-15% соли. Экстремальные галофилы оптимально растут на среде, содержащей от 12–15% NaCl вплоть до насыщенных растворов.

Особую группу составляют галоалкалофилы, растущие при высоких концентрациях соды и сочетающие в себе свойства галофилов и алкалофилов. Типичными местами их обитания являются высокоминерализованные содовые озера. [9]

Один из основных параметров всех экосистем - осмотический стресс. Вода свободно проникает через мембрану, и неадаптированные организмы быстро теряют воду в присутствии солей. [10] Для достижения осмотического равновесия между клетками и окружающей средой микроорганизмы реализуют два механизма адаптации:

1. Поддержание осмотического равновесия путём избирательного накопления в цитоплазме неорганических ионов (так называемый солевой тип осмоадаптации).

2. Характерен для большинства умеренно галофильных и галотолерантных микроорганизмов, и связан с накоплением специфических низкомолекулярных органических веществ – осмолитов (или совместимых растворимых веществ). Эти низкомолекулярные вещества хорошо

растворимы в воде и не несут заряда при физиологических значениях рН. [11]

Экстремальные галофилы показывают большой потенциал для производства ПГА. [12] Во-первых, высокая соленость культивационных сред снижает риск микробного загрязнения. Во-вторых, некоторые галофилы могут продуцировать сополимеры из простых источников углерода, таких как крахмал, глюкоза. Тогда как для других бактерий требуется добавление структурно-родственных соединений предшественников, таких как жирные кислоты с нечетным количеством атомов. [15]

Это можно наглядно посмотреть в работе J. M. Cervantes-Ucetal., 2014. Авторы выделили несколько штаммов бактерий из соленых прудов Лас-Колорадас. Один из штаммов был позже определен, как *Halomonasnitroreducens*. Эти штаммы выращивались в нестерильных условиях, но, тем не менее, бактериального загрязнения в среде обнаружено не было. Выход П(ЗГБ) составил 33%. [16]

В работе T. Palmerio-Sanchezetal., 2016 было исследовано влияние NaCl в концентрации 21,6 г/л на синтез ПГА. В качестве основного субстрата использовали ферментированные сточные воды, остающиеся после переработки тунца. Это было сделано для имитации использования сырья с переменным содержанием соли, например, рыбные консервы. Максимальное содержание ПГА составило 8,4%. По сравнению с культурой, которая выращивалась на субстрате со смесью летучих жирных кислот, где выход ПГА составил 51,3%. Это показывает, что NaCl оказывает явное ингибирующее влияние на способность к накоплению ПГА. Соотношение HV:HVв полимере составило 62:38 при культивировании в присутствии NaCl и 72:28 в присутствии смеси летучих жирных кислот, что указывает на то, что физико-химические свойства ПГА также могут изменяться.

Что касается сравнения температурных характеристик, то все значения зависели от изменения процентного содержания ЗГВ в присутствии NaCl. [13]

В другой работе этого же ученого T. Palmerio-Sanchezetal., 2016 было исследовано влияние разных концентраций хлорида натрия (7, 13 и 20 г/л) на синтез ПГА Смешанным Микробным Сообществом. В качестве вывода можно отметить, что синтез ПГА ингибировался в зависимости от возрастания концентрации соли в среде. Так же нужно отметить, что в концентрациях NaCl 13 и 20 г/л по достижении максимального количества ПГА в клетке, ПГА начал деградацию. Они объяснили это тем, что деградация ПГА являются ответом на солевой стресс. [14]

В работе Rodriguez-Contrerasetal., 2016 было исследовано влияние хлорида натрия в концентрациях 5, 45, 100 и 250 г/л на рост бактерий *Bacillusmegateriumyuni* S29. Оптимальная концентрация соли для роста клеток составила 45 г/л, хотя не менее значительный рост также наблюдался при концентрациях 5 и 100 г/л хлорида натрия. Бактерии, которые росли в концентрации соли 250 г/л, показали незначительное увеличение оптической плотности после 11 часов культивирования. Так же было установлено, что концентрация соли влияет на синтез П(ЗГБ). В зависимости от концентрации соли в среде, этот штамм бактерий ведет себя по-разному. Поведение зависит от механизмов адаптации к различным концентрациям соли и механизмов поддержания осмотического давления в клетке. Оптимальная концентрация соли благотворно влияет на рост бактерий и синтез полимера. Кроме того, было показано, что штамм прекрасно растет и синтезирует полимер и в отсутствии соли в среде. [12]

В исследовании Yueetal., 2014 показано, что бактерия *H. campariensis*LS21 способна расти в искусственной морской воде, а также на смешанных субстратах, напоминающих кухонные отходы. При этом природный штамм этой бактерии синтезировал П(ЗГБ) с содержанием 26%, а рекомбинантный 70%. При этом штамм рос в загрязненных условиях, без каких-либо затрат на стерилизацию и поддержку чистоты культуры. Концентрация соли при этом составляла 40 г/л. [19]

## 1.4 Влияние температуры культивирования на рост бактерий и синтез полимера

Влияние температуры на рост бактерий и синтез полимера было исследовано в многих работах, но практически в каждой работе говорится о том, что самой оптимальной температурой для выращивания бактерий с одновременно высоким синтезом полимера является температура в 30<sup>0</sup> С. [22] Помимо этого есть возможность использовать термофильные бактерии для синтеза ПГА. Так, в одной из работ был использован термофильный штамм *Bacillusshackletonii*K5, у которого максимум накопления ПГБ (69,9%) и концентрации биомассы (2,28 г/л) был при температуре 45<sup>0</sup> С. [23] Также в одной из работ RebecaPerezaet.al, 2014 было предложено использование метанотрофных бактерий для синтеза ПГА, где самый высокий выход биомассы был при 25<sup>0</sup> С, однако было экспериментально выяснено, что оптимальная температура для роста биомассы с максимальным выходом ПГА является температура в 30<sup>0</sup> С. [24] Культивирования при температуре выше 30<sup>0</sup> С наиболее невыгодный вариант для синтеза полимера в промышленности, так как с повышением температуры растет метаболическая активность и поглощения субстратов идет намного больше, однако это практически не влияет на урожай биомассы и синтез полимера. [25] То же самое было показано в работе Der-ShyanSheuet. al 2018, где использовалась бактерия *Cupriavidus*sp. L7L, которую выращивали в температурных режимах от 20<sup>0</sup> С до 35<sup>0</sup> С. Урожай биомассы снижался с повышением температуры, однако синтез ПГА был максимальным при 30<sup>0</sup> С. Вместе с тем, содержание включений ЗГВ снижалось с увеличением температуры, подобно урожаю биомассы. Пропорции 2 основных мономеров ЗНВ и ЗНУ были антагонистическими. Доля ЗНВ увеличивалась с повышением температуры, а ЗНУ уменьшалась с повышением температуры. [26]

## 1.5 Влияние соотношения C:N и объема культуры на рост бактерий и синтез полимера

Значительное влияние на состав полимера и урожай биомассы имеет соотношение C:N в среде. Как известно, достаточное количество азота способствует росту клеток, в то время, как его недостаток способствует синтезу ПГА. [27] Помимо этого, в условиях дефицита азота увеличивается степень насыщения жирных кислот клеточной мембраны. [28] Например, в процессе культивирования бактерий *Bacillus megaterium* было выявлено, что максимальный рост был при соотношении C:N 25-26 (соотношение не посчитано пограммам). При этом содержание ПЗГБ составило 75%, однако так же было показано, что данный штамм бактерий способен накапливать ПЗГБ в клетках до 70% и без ограничения азота. [29] Также в одной из работ было показано использование микроорганизмов для переработки сточных вод, где соотношение C:N составляло 96:1. Конечный выход полимера при таких условиях составил 0,111 г/г. [30]

Помимо прочего, на рост бактерий и синтез полимера очень значительно влияет объем питательной среды. Так в одной из работ было показано, что с увеличением объема питательной среды, урожай биомассы значительно снижается. При этом менялось соотношение сополимеров П(ЗГБ/4ГБ). При минимальном заполнении объема колбы наибольший процент в составе полимера имел ЗГБ, однако с увеличением объема питательной среды в колбе процент ЗГБ снижался, в то время как процент 4ГБ, наоборот, увеличивался. [31]

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646

Одним из наиболее исследуемых видов бактерий среди ПГА-продуцирующих микроорганизмов считают *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* (еще ранее *Hydrogenomonas*, *Alcanigenes*, *Ralstonia*)). Штамм *Cupriavidus eutrophus* B-10646 является одним из вариантов, выделенных из культуры глюкозоусваивающего штамма *Ralstonia eutropha* B-8562 (штамм получен в результате длительной селекции штамма B5786 на средах с единственным источником углерода – глюкозой, депонирован в ВКПМ) в процессе длительной многоступенчатой селекции по эффективности синтеза многокомпонентных ПГА, образованных мономерами с различной длиной С-цепи, на ростовой среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу или смеси органических кислот. Штамм в отличие от прототипа устойчив к воздействию более высоких концентраций токсичных субстратов (СО, соли алкановых кислот, 4-бутиролактон).

### 2.2 Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования

Бактерии *Cupriavidus eutrophus* B-10646 выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5л, с коэффициентом заполнения 0,3 – 0,5 в термостатируемой качалке Innova 44 Incubator Shaker Series при температуре 25<sup>0</sup> С, 30<sup>0</sup>С (контроль) и 35<sup>0</sup> С. Для выращивания бактерий за основу была принята солевая среда Шлегеля следующего состава (г/л): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 9,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,5; MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 0,2; Fe<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,25; NH<sub>4</sub>Cl – 1,0 (контроль); раствор микроэлементов (из расчета 3 мл раствора на 1 л среды) стандартный раствор содержит: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 0,228; CoCe<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O – 0,030; CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O – 0,008; MnCe<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O – 0,008; ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,176; NaMoO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O – 0,050; NiCe<sub>2</sub> – 0,008 (г/л).

В качестве источника углерода использовали фруктозу (10-12 г/л). Для исследования влияния NaCl на рост бактерий и синтез полимера, в колбы добавляли NaCl в концентрациях 5г/л, 10г/л. Для исследования влияния соотношения C:N, в колбы добавляли NH<sub>4</sub>Cl в концентрациях 0,7г/л, 1,5г/л и 2г/л, что составляет C:N 14, 10, 7, 5. Для синтеза сополимеров, содержащих 3-гидроксивалерат (ЗГВ), в колбы на 24 часу культивирования добавили валерат калия в концентрации 1 г/л. Начальная концентрация фруктозы составляла 15 г/л.

Периодически отбирали пробы культуры и измеряли оптическую плотность на фотоколориметре Unicо при  $\lambda=440$ нм и длине оптического пути 1мм. Для этого делали разведение культуры с дистиллированной водой в соотношении 1:5.

Биомассу бактерий в культуре определяли весовым способом. Для этого 20-25 мл бактериальной суспензии центрифугировали 8 мин при 6000g в центрифуге Ependorf 5810R. 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 на весах AdventureOhaus. Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

### **2.3 Определение концентрации фруктозы**

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого супернатант разводили в 25 раз. Из разведения 1 мл пробы наливали в пробирку, куда добавляли: 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 100 мл 95%-го этилового спирта); 3 мл 80%-го раствора соляной кислоты. В качестве контроля брали: 1 мл дистиллированной воды, 1 мл спиртового раствора резорцина, 3 мл 30%-го раствора соляной кислоты. Пробирки с контролем и пробой помещали на

водяную баню на 20 мин., при  $t=80^{\circ}\text{C}$ . По истечении этого времени пробирки охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность на фотоколориметре Unicopri  $\lambda=540$  нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику.

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

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

#### **2.5 Выделение полимера**

Для выделения полимера 50 мл культуры центрифугировали 8 минут при 6000g. Биомассу помещали в колбы на 100 мл, куда добавляли 10 мл спирта и 25 мл дихлорметана, оставляли на 24 ч. Далее образцы фильтровали и растворитель удаляли на роторном испарителе при  $t=45^{\circ}\text{C}$ . Далее в колбы добавляли дихлорметан для растворения полимера, и полимер осаждали добавлением двойного объема гексана.

#### **2.6 Определение молекулярной массы полимера.**

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии AgilentTechnologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия).



Находили средневесовую ( $M_v$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, полидисперсность ( $ПД=M_v/M_n$ ).

**Изъято 13 стр.**

## Заключение

Была исследована способность бактерий штамма *Cupriaviduseutrophus*B-10646 расти и синтезировать сополимер П(ЗГБ/ЗГВ) в различных условиях культивирования.

1. Показано, что с увеличением концентрации NaCl с 0 г/л до 10 г/л происходило снижение концентрации биомассы с 5,7 г/л до 4,4 г/л. При этом содержание полимера и мономера ЗГВ в контрольной культуре и при концентрации NaCl 5 г/л достоверно не отличалось и составляло соответственно 68-75% и 27-29 мол.%. При концентрации соли 10 г/л в среде отмечено снижение содержания полимера до 52% при сохранении высокого включения ЗГВ (33 мол.%). Показано, что с увеличением концентрации соли в среде происходило снижение  $M_{wс}$  995 до 919 кДа.
2. Установлено, что с увеличением коэффициента заполнения с 0,3 до 0,5 происходит снижение концентрации биомассы с 5,92 до 4,36 г/л, тогда как включение ЗГВ возрастает с 20,65 до 33,03 мол.%. Максимальное содержание полимера в конце культивирования было при коэффициенте заполнения 0,3 и составило около 90% от веса сухой биомассы. Показано, что с увеличением коэффициента заполнения происходит возрастание полидисперсности полимера.
3. Показано, что концентрация биомассы *Cupriaviduseutrophus*B-10646, выращенного при 35 °С, была достоверно выше, чем при более низких температурах культивирования (25 и 30 °С) и составляла 6,88 г/л. Однако максимальное содержание полимера (85% от веса сухой биомассы) наблюдали при температуре 25 °С. Максимальное содержание ЗГВ (30,1 мол.%) получено при температуре 30 °С. Исследования молекулярно-массовых характеристик полимера показали, что наиболее высокомолекулярный полимер синтезировался при 25<sup>0</sup> С и 35<sup>0</sup> С.

4. Показано, что с увеличением концентрации хлорида аммония в среде происходило снижение содержания полимера с 80 до 52%. При этом содержание ЗГВ в сополимере практически не отличалось и составляло 27-31 мол.%. Установлено, что с увеличением концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$  происходило увеличение как среднечисловой, так и средневесовой молекулярной массы.

### Список использованных источников

1. Латышенко, К.П. Экологические и энергетические проблемы современности / К.П. Латышенко, С.А. Гарелина // Известия МГТУ «МАМИ», 2013 - №3(17) – с. 56-58.
2. Волова, Т.Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов/ Т.Г. Волова // JournalofSiberianFederalUniversity. Biology 2, 2015 - №8 – с. 132-135.
3. Вильданов, Ф.Ш. Биоразлагаемые полимеры – современное состояние и перспективы использования / Ф.Ш. Вильданов, Ф.Н. Латыпова, П.А. Красуцкий, Р.Р. Чанышев // Башкирский химический журнал, 2012 – т.19 №1 – с. 136-139.
4. Raza Z. A., Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications / Z. A. Raza, Sh. Abida, I. M. Banatb // International Biodeterioration& Biodegradation, 2018 - №126 – P. 45-56.
5. Volova, T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates - plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications) / T.G. Volova // Nova Science Pub. Inc., 2004. – P.283.
6. Волова, Т.Г. Полиоксисалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск.: СО РАН, 2003. – 330 с.
7. 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.
8. 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.
9. Oren A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63(2):334-348.

10. Grant W.D. (2004) Life at low water activity. // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359:1249-1267.
11. Galinski E.A. and Trüper H.G. (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. // *FEMS Microbiol. Rev.* 15(2-3):95-108.
12. Rodríguez-Contreras, A. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain / A. Rodríguez-Contreras, M. Koller, G. Braunegg, M.S. Marques-Calvo // *New Biotechnology*, 2016 – V.33 – P. 73-77.
13. Palmeiro-Sánchez, T. NaCl presence and purification affect the properties of mixed culture PHAs/ T. Palmeiro-Sánchez, C.S.S. Oliveira, A.R. Gouveia, J.P. Noronha, A.M. Ramos, A. Mosquera-Corral, M.A.M. Reis // *European Polymer Journal*, 2016 - №85 –p. 256-265.
14. Palmeiro-Sánchez, T. Transient concentrations of NaCl affect the PHA accumulation in mixed microbial culture / T. Palmeiro-Sánchez, A. Fra-Vázquez, N. Rey-Martínez, J.L. Campos // *Journal of Hazardous Material*, 2016 - №306 –p. -332-339
15. Koller, M. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters by Extremophiles / M. Koller // *MOJ Polymer Science*, 2017 – V.1, I.2 – p. 1-19.
16. Cervantes-Uc, J.M. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds / J.M. Cervantes-Uc, J. Catzin, I. Vargas, W. Herrera-Kao, F. Moguel, E. Ramirez, S. Rincon-Arriaga, G. Lizama-Uc // *Journal of Applied Microbiology*, 2014 - №117 – p. 1056—1065.
17. Chen G. Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates/ Chen G. Q, Wu Q. // *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2005. – V. 67. – P. 592–9.
18. Quillaguamán J. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects / Quillaguamán J,

- Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. // *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2010. – V. 85. – P. 1687–96.
19. Yue H. A seawater based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates / Yue H, Ling C, Yang T, Chen X, Chen Y, Deng H, et al. // *Biotechnol Biofuels.*, 2014. – V. 7. – P. 108.
20. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Учеб. пособие для университетов и педагогических институтов // Высшая школа. – М., 1973. – С. 343.
21. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* ВКПМ В-10646 – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения. – 2012 – П. РФ №2439143
22. Fernandez D. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions / D. Fernandez, E. Rodríguez, M. Bassas, M. Vinas, A.M. Solanas, J. Llorens, A.M. Marques, A. Manresa // *Biochemical Engineering Journal*, 2005 – V. 26 – P. 159–167
23. Yong L. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate / Yong Liu, Shaobin Huang, Yongqing Zhang, Fuqian Xu // *Journal of Environmental Science*, 2014 – V. 26 – P. 143-162
24. Pérez R. The effect of temperature during culture enrichment on methanotrophic polyhydroxyalkanoate production / Pérez R., Cantera S., Bordela S., García-Encina P.A., Muñoz R. // *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2019 – V. 140 – P. 144-151
25. Inoue D. Polyhydroxyalkanoate accumulation ability and associated microbial community in activated sludge-derived acetate-fed microbial cultures enriched under different temperature and pH conditions / Inoue D., Y. Suzuki, K. Sawada, K. Sei // *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2018 - №3 – V. 125 – P. 339-345

26. Sheu D.-Sh. Cultivation temperature modulated the monomer composition and polymer properties of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Cupriavidus* sp. L7L from levulinate as sole carbon source / D.-Sh. Sheu, Chen Y.L., Jhuang W., Chen H., Jane W. // *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018 – V. 118 – P. 156-164.
27. Camposa M. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations / M. Camposa, T. Figueiredo, L. Sousa, J. Druzian // *Industrial Crops and Products*, 2014 – V. 58 – P. 338-346.
28. Cavalheiro J. Adaptation of *Cupriavidus necator* to conditions favoring polyhydroxyalkanoate production / J. Cavalheiro et al // *Journal of Biotechnology*, 2012 – V. 164 – P. 309-317.
29. D'ebora Jung Luvizetto Faccin Optimization of C :N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium* / D'ebora Jung Luvizetto Faccin, Ivana Martins, Nilo Sérgio Medeiros Cardozo, Rosane Rech, Marco Antonio Z'achia Ayub, Tito Lívio Moitinho Alves, Rossano Gambetta, Argimiro Resende Secchi // *Wiley Interscience*. – 2009. – P. 22-40.
30. Chua C. K. Ma. Optimal Production of Polyhydroxyalkanoates in Activated Sludge Biomass / C. K. Ma, H. Chua, P. H. F. Yu, K. Hong // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2000. – P. 84 – 86.
31. Vigneswari S. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer with manipulated variables and its properties // S. Vigneswari, S. Vijaya, M.I.A. Majid, K. Sudesh, C.S. Sipaut, M.N.M. Azizan, A.A. Amirul // *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009 – V. 36 – P. 547-556.
32. Akiyama M., Tsuge T., Doi Y. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by

- bacterial fermentation //Polymer Degradation and Stability. – 2003. – . 80. – №. 1. – . 183-194.
33. Suzuki, T., Yamane, T., Shimizu, S. 1986. Mass production of polyhydroxybutyric acid by fed batch culture with controlled carbon/ nitrogen feeding. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 37 .374.
34. Green, Ph.R. Formation of short chain|medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid  $\beta$ -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha* / Ph.R. Green, J. Kemper, L. Schechtman, L. Guo, M. Satkowski, S. Fiedler, A. Steinbüchel, H.A. Rehm // Biomacromol., 2002. – V. 3. – P. 208-213.
35. Dawes E.A. Novel biodegradable microbial polymers / E.A. Dawes // Kluwer Academic, Dordrecht. – Netherlands. – 1990. – P. 287.



Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
*М. Волова* Т.Г. Волова  
« 5 » июня 20 19 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Влияние условий культивирования на рост бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 и синтез сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата)

Научный руководитель

*[Подпись]*  
Подпись, дата

*к.б.н. доцент*  
Должность, ученая степень

Жила Н.О.  
Инициалы, фамилия

Выпускник

*[Подпись]*  
Подпись, дата

Болотова К.С.  
Инициалы, фамилия

Красноярск 2019