

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

Биосинтез полигидроксиалканоатов различного состава бактериями
Cupriavidus eutrophus В-10646 с использованием новых прекурсоров

Научный руководитель _____

Подпись, дата

Должность, ученая
степень

Жила Н.О.

Инициалы, фамилия

Выпускник _____

Подпись, дата

Хнытикова В.А.

Инициалы, фамилия

Красноярск 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Реферат	3
Введение.....	4
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Биоразрушаемые полимеры	6
1.2 Полигидроксиалканоаты и их особенности.....	9
1.3 Биосинтез ПГА.....	10
1.4 Серосодержащие полимеры	13
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	16
2.1 Культурально-морфологические особенности штамма.....	16
2.2 Штамм <i>Cupriavidus eutrophus</i> В-10646	17
2.3 Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования.	17
2.5 Определение содержания в клетках состава ПГА.....	19
2.6 Выделение полимера	19
2.8 Исследование свойства поверхности пленки.....	20
2.9 Определение температурных характеристик.	20
Глава 3 Результаты и обсуждения	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Исследование новых предшественников.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Исследование физико-химических свойств и структуры поверхности пленок синтезированных полимеров.	Ошибка! Закладка не определена.
Заключение	21
Список использованных источников	22

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа на тему: «Биосинтез полигидроксиалканоатов различного состава бактериями *Cupriavidus eutrophus* B-10646 с использованием новых прекурсоров», содержит 42 страницы текстового документа, 26 иллюстраций, 2 таблицы, 39 использованных источников.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты (ПГА), серосодержащие мономеры, новые прекурсоры, поли(3-гидроксибутират/3-гидроксивалерат/4-гидроксивалерат), поли(3-гидроксибутират/2-гидроксиэтилтиоацетат), поли(3-гидроксибутират).

Целью работы было исследование способности бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 расти и синтезировать полимер в присутствии различных прекурсоров в среде, в условиях оптимального роста и накопления ПГА а также исследовать физико-химические свойства полученного полимера. Задачи заключали в себе: 1. Исследование роста бактерий и накопления полимера в присутствии новых серосодержащих предшественников синтеза ПГА; 2. Исследование роста бактерий в присутствии 4- и 5-гидроксипентановой кислоты; 3. Исследование физико-химических свойств полученных полимеров (температура плавления, молекулярная масса, структурная поверхность пленок).

Тема исследования связана с актуальным направлением – получение новых полимеров для изучения их состава и свойств. В рамках исследования удалось синтезировать полимеры, включающие в себя П(ЗГБ/ЗГВ/4ГВ) П(ЗГБ/2ГЭТА), П(ЗГБ).

ВВЕДЕНИЕ

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. Являются биоразлагаемыми, биосовместимыми и возобновляемыми биопластиками, которые могли бы заменить пластмассы нефтехимического происхождения во многих областях применения. Наиболее перспективными продуцентами для биотехнологического производства биоразрушаемых пластиков являются водородокисляющие бактерии *Cupriavidus eutrophus* В-10646, группа грам-отрицательных бактерий, способных накапливать до 80-90% полимера от веса сухой биомассы. В первую очередь, перспективность водородокисляющих бактерий определяется их высоким органотрофным потенциалом.

В настоящее время известно свыше 100 различных полигидроксиалканоатов, хорошо изученные и исследуемые ПГА – это гомогенный поли(3-гидроксибутират) и сополимеры 3-гидроксибутирата и 3-гидроксивалерата (П-ЗГБ-со-ЗГВ). Полигидроксиалканоаты накапливаются в бактериальных клетках в виде гранул, которые при окрашивании хорошо визуализируются микроскопически. Развернуты широкие исследования по выявлению новых полигидроксиалканоатов, изучению условий их синтеза и свойств. Этому направлению исследований уделяется большое внимание в связи с тем, что даже при незначительном изменении соотношения мономерных единиц в ПГА могут принципиальным образом изменяться их свойства, в том числе термомеханические, что является важным для практики (медицине, производстве пластиков и т.д.) [1].

Целью настоящей работы было исследование способности бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* В-10646 расти и синтезировать полимер в присутствии различных прекурсоров в среде, а также исследовать физико-химические свойства полученного полимера.

Для этого необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать рост бактерий и накопление полимера в присутствии новых серосодержащих предшественников синтеза ПГА;
2. Исследовать рост бактерий в присутствии 4- и 5-гидроксипентановой кислоты.
3. Исследовать физико-химические свойства полученных полимеров (температура плавления, молекулярная масса, структурная поверхность пленок)

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биоразрушаемые полимеры

Производство пластических масс на современном этапе развития возрастает в среднем на 5 – 6% ежегодно и, по прогнозам, к 2020 г. достигнет 250 млн. тонн. Их потребление на душу населения в индустриально развитых странах за последние 30 лет удвоилось, достигнув 85 – 90 кг. К концу десятилетия, как предполагается, эта цифра повысится на 45-50% [5].

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, ряд из них относится к токсичным материалам [6]. Такая высокая популярность пластмасс объясняется их легкостью, экономичностью и набором ценнейших служебных свойств. Пластики являются серьезными конкурентами металлу, стеклу, керамике. Но наряду с этим 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, однако проблема их утилизации носит, прежде всего, экологический характер. В настоящее время проблема переработки отходов полимерных материалов обретает актуальное значение не только с позиции охраны окружающей среды, но и связана с тем, что в условиях дефицита полимерного сырья, пластмассовые отходы становятся мощным сырьевым и энергетическим ресурсом [7]. Использование полимеров позволяет существенно экономить первичное сырье (прежде всего нефть) и электроэнергию [8].

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 3 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 назвать неразрешимыми.

На современном этапе развития общества возник новый подход к разработке полимерных материалов, диаметрально противоположный традиционному. Целью данного подхода является 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 [9].

Природные и синтетические полимеры, содержащие связи, которые легко подвергаются гидролизу, обладают высокой способностью к биодеструкции. Присутствие заместителей в полимерной цепи часто способствует повышению биоразрушаемости. Последняя зависит также от степени 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 поражены микроорганизмами и служат для них источником углерода, полимеры с большей молекулярной массой являются стойкими к действию микроорганизмов. Биодеструкцию большинства технических полимеров, как правило, инициируют процессами

небиологического характера (термическое окисление 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 входят 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 [10].

Таким образом, способность полимерных материалов к биодеструкции обусловлена их химическим составом, структурой и свойствами макромолекул.

Целью новейших разработок является установление общих закономерностей в подборе компонентов и технологических параметров при изготовлении материалов, сочетающих высокий уровень эксплуатационных характеристик (прочность, экологическую безопасность, низкую газопроницаемость и др.) со способностью к биоразложению, и научиться регулировать процессы их деструкции.

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

1.2 Полигидроксиалканоаты и их особенности

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – полимеры гидропроизводных алкановых кислот, которые синтезируются микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста [10]. Общая формула полигидроксиалканоатов выглядит так – рисунок 1.

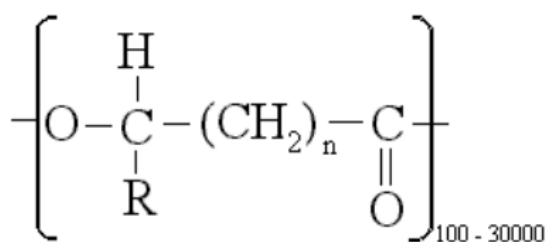


Рисунок 1- Общая структурная формула ПГА.

ПГА обладает хорошей термопластичностью, а также такими свойствами, как биосовместимость и биоразлагаемость. Накопление ПГА вызвано дисбалансом в условиях питательных веществ, таких как ограниченная доступность азота. ПГА деградирует в условиях отсутствия источников углерода для поддержания гомеостаза клеточной энергии бактерий. Источниками углерода для получения ПГА в настоящее время считают оливковое, кукурузное, соевое, рапсовое, пальмовое, подсолнечное масла, жирные кислоты, а так же отходы пищевой промышленности, содержащие липиды [20]. Преимущество данных продуктов заключается в более низкой стоимости, в отличие от других источников углерода, таких как, например, сахара [21].

Полигидроксиалканоаты представляют собой группу универсальных сложных полиэфиров, продуцируемые многими микроорганизмами в качестве внутриклеточных соединений углерода и соединений для хранения энергии при несбалансированном состоянии роста. Наиболее известным представителем ПГА является гомополимер ПЗГБ (поли-3-гидроксибутират) [25].

В целом, исходя из длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры, полигидроксиалканоаты подразделяют на три основные группы: 1) короткоцепочечные (short-chain-length, SCL), состоящие из кислот с длиной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов; 2) среднецепочечные (medium-chain-length, MCL), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода; 3) длинноцепочечные (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот C17 и C18 [26].

Также ПГА можно систематизировать по компонентному составу:

- 1) Однокомпонентные, состоящие только из одного типа мономеров.
- 2) Многокомпонентные, состоят разных, включая коротко-, средне- и длинноцепочечные мономеры [27].

Каждый тип ПГА обычно состоит из 1000-10000 мономеров [22]. Короткоцепочечные ПГА – являются наиболее изученными: высококристаллический поли(3-гидроксибутират), у которого степень кристалличности (СХ) 70-80 %. Данный полимер не кристаллизуется упорядоченно, полученное изделие обладает низкой ударной прочностью, а также сополимеры поли(3-гидроксибутирата) с 3-гидроксивалератом, обладают более сниженной степенью кристалличности (40-50 %) [23].

Наиболее перспективными полимерами являются те, которые обладают низкой кристалличностью и имеют свойства эластомеров. Это короткоцепочечные сополимеры 3- и 4-гидроксибутирата и сополимеры, состоящие не только из коротко-, но и среднецепочечных мономеров 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) или 3-гидроксиоктаоната (ЗГО) [24].

1.3 Биосинтез ПГА

В настоящее время известно несколько вариантов биосинтеза ПГА. Один из существующих вариантов детально исследован на штамме *Ralstonia eutropha*.

β -кетотиолаза, НАДФН-зависимая ацетоацетил-КоА редуктаза и ПГА-синтаза – три ключевых фермента, являющиеся основными для

биосинтеза ПГА. Данные ферменты, кодируемые следующими генами: *phaA*, *phaB* и *phaC*, которые располагаются в одном опероне [15].

Ведущую роль β -кетолазы в запуске синтеза полимера определяет концентрация КоА, высокие концентрации которой ингибируют кетотиолазную реакцию у *Zoogloearamigera*, *Azotobacterbeijerinckii*, *Ralstonia eutropha*. АА-КоА-редуктаза – фермент, определяющий скорость синтеза полимеров. О конститутивном синтезе фермента говорит то, что уровень активности фермента в бактериях, выращенных при дефиците азота и углерода, оказался практически одинаковым [16].

В настоящее время исследовано, примерно, 88 ПГА-синтаз, которые объединили в 4 основных класса. Класс 1 – жирные кислоты с атомами углерода от 3 до 5, класс 2 – длина углеродной цепи от 6 до 14, классы 3 и 4 производят синтез длинноцепочечных ПГА. Реакции деполимеразой (кодируемой *phaZ*) в 3-гидроксибутират (ЗГБ), далее возможно превращение обратно в ацетоацетил-КоА [17].

Существует два основных типа углеродных субстратов, потребление которых приводит к образованию среднецепочечных ПГА: субстраты, структурно связанные с мономерами и субстраты, не имеющие отношения к структуре мономеров. Обычно о продукции среднецепочечных ПГА, структурно связанных с мономерами, говорят в том случае, когда мономерный состав полимера подобен составу субстрата. Субстраты, структурно связанные с мономерами ПГА, являются субстратами (обычно жирные кислоты), использование которых приводит к синтезу среднецепочечных ПГА с очень сходными (R)-3-гидрокси кислотами, но с той же самой длиной C-цепи или с более короткой углеродной цепью [49]

Один из вариантов биосинтеза ПГА – β -окисление жирных кислот. Он является основным для синтеза среднецепочечных ПГА и демонстрирует использование в качестве субстрата жирные кислоты. *Pseudomonas oleovorans* и *Pseudomonas fragii* – микроорганизмы, у которых был обнаружен второй вариант, бактерии синтезируют ПГА из алкановых или жирных кислот [18].

Помимо поли-3-гидроксibuтирата, микроорганизмы способны синтезировать гетерополимерные ПГА – сополимеры 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата (второй вид ПГА), 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксигексаноата и другие, а также трех-, четырех- и более компонентные полимеры.

Синтез ПЗГБ и других ПГА в принципе возможен с использованием различного сырья: сахаров, спиртов, ацетата, а также водорода и углекислоты. Выбор субстрата определяется в первую очередь экономическими факторами. Лучшими субстратами для производства полимера являются меласса и тростниковый сахар. Полигидроксibuтират можно получать с хорошим выходом при выращивании *Azotobacter* на глюкозе и лимитации кислородом, а также *Alcaligenes* при дефиците азота в среде [28].

Так, водородные бактерии *A. eutrophus*, помимо гомогенного полимера 3-гидроксимасляной кислоты и сополимера 3- и 4-гидроксимасляных кислот, способны накапливать гетерополимер, являющийся продуктом сополимеризации 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислот. Введение в полимер 3ГВ и 4ГБ снижает температуры плавления полимера. Состав сополимера, его выход зависят от вида соединения, используемого в качестве источника углерода.

Гетерополимеры, такие как сополимеры с мономерами 3-гидроксibuтирата (3ГБ), 3-гидроксивалерата (3ГВ), 3-гидроксигексаноата или 4-гидроксibuтирата (4ГБ), могут быть получены бактериями-производителями ПГА с определенным источником углерода [30]. Таким образом, в некоторых исследованиях сообщалось, что несколько типов

источников углерода способствовали получению мономерной единицы 4-гидроксивалерата (4ГВ). Среди источников - леулиновая кислота (4-кетовалериановая кислота) и 4-гидроксивалериановая кислота, которые получают из γ -валеролактона путем щелочного омыления [31]. Эти источники углерода могут быть использованы по отдельности или в сочетании с другими источниками углерода, такими как коктановая кислота, сахароза и глюкоза. Использование двухстадийного культивирования и двухстадийного периодического культивирования с подпиткой может привести к получению желаемого полимера, который включает мономерную единицу 4ГВ [32].

1.4 Серосодержащие полимеры

Химический синтез политиоэфиров был впервые разработан Marvel и Kotch [35], но метод так и не был улучшен из-за сложности выделения необходимых катализаторов [36]. Более того, экономические и экологические проблемы, связанные с синтетическим путем, не стимулировали дальнейшие исследования в этой области. Биосинтетический подход к политиоэфирам имеет ряд преимуществ по сравнению с химическим путем. Самой главной проблемой является экономическая жизнеспособность крупномасштабных процессов биотехнологической ферментации, которые позволяют использовать возобновляемые ресурсы, такие как углеводы и растительные масла [37]. С точки зрения материала, биосинтетические политиоэфиры являются более гомогенными и на 100% изотактичны (все хиральные атомы углерода имеют одинаковую конфигурацию), они могут достигать высокой молекулярной массы ($M_w = 1,6 \times 10^5$), и, если необходимо, их можно легко сополимеризовать с полиоксиэфирами. Как и их оксо-аналоги, простые политиоэфиры являются термопластичными и поэтому могут быть обработаны с помощью экструзионного и формовочного оборудования, аналогичного используемому для полиоксисложных эфиров. Полиоксиэфиры являются биоразлагаемыми и биосовместимыми и стали коммерчески

привлекательными для применений в различных областях. Например, они оказались полезными в биомедицинских применениях, таких как замена сердечного клапана, где желательна постепенная биосорбция и колонизация клеток [36].

Микробные терполитиоэфирсы являются интересными материалами из-за их различных химических и физических свойств в сравнении с сополиоксиэфирсами и терполиоксоэфирсами. Известны данные, о том, что термостабильность политиоэфирсов выше, чем у полиоксиэфирсов [38]. Следовательно, можно ожидать, что точки плавления или термического разложения для терполитиоэфирсов будут расти дальше [39].

Проводятся исследования по получению новых серосодержащих полимеров, например, японскими учеными Hiroshi Kimura, Kiminari Mouri, и Yasutaka Kamei [39]. Было продемонстрировано получение новых терполитиоэфирсов, а именно поли(3-гидроксибутират-со-3-меркаптопропионат-со-4-гидроксибутират) и поли(3-гидроксибутират-со-3-меркаптопропионат-со-3-гидроксиивалерат), которые были биосинтезированы *Ralstonia eutropha* H16 дикого типа, было обнаружено, что фракция ЗМП в терполитиоэфирсах резко увеличилось при использовании смешанных источников углерода.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Культурально-морфологические особенности штамма

Царство *Procariotae*

Класс *Betaproteobacteria*

Семейство *Burkholderiaceae*

Род *Cupriavidus*

Вид *C. eutrophus*

Штамм *C. eutrophus* В-10646

Бактерии *Cupriavidus eutrophus* В-10646 – это грамотрицательные клетки-палочки (молодые – короткие, в стационарной фазе – разной длины, размеры 0.3-0.5×1.2-2.0 мк), подвижные (молодые – монотрихи, с возрастом – перетрихи). Слабоподвижные. Оптимум роста 30-31 °С, рН 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 при гетеротрофном и автотрофном росте.

Cupriavidus eutrophus В-10646 – облигатный аэроб, факультативный хемолитоавтотроф, оксидазоположителен. Гидролитическими ферментами не обладает, желатину не разжижает, крахмал не гидролизует. Обладает широким оградотропным потенциалом и способен в качестве источника углерода и энергии использовать: сахара (глюкоза, фруктоза), аминокислоты (аланин, серин, лейцин, гистидин, триптофан, глутаминовую, аспарагиновую, лизин), органические кислоты (щавелевую, лимонную, янтарную, фумаровую, уксусную, 3-ОН- и 4-ОН-масляную кислоту, пентановую,

гексановую, октановую, нонановую), спирты (этанол, глицерин), γ -бутиролактон при гетеротрофном росте, и H_2 (энергетический субстрат), CO_2 и CO при автотрофном росте.

2.2 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 C-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 (CO, соли алкановых кислот, 4-бутиролактон).

2.3 Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования.

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 200 мл, заполненных культурой на 50-60% объема на термостатируемой качалке при температуре 30°C. Для выращивания бактерий за основу была принята минеральная среда Шлегеля следующего состава: $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 9,1; KH_2PO_4 -1,5; $MgSO_4 \cdot H_2O$ -0,2; $Fe_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ -0,025, NH_4Cl -1,0 (г/л) и раствор микроэлементов (H_3BO_3 -0,288; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ -0,030; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ -0,008; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ -0,008; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,176; $NaMoO_4$ -0,050; $NiCl_2$ -0,008 (г/л)). В качестве источника углерода использовали фруктозу (7-10 г/л).

Также, для получения гетерополимеров, добавляли следующие вещества: 5-гидроксивалерат натрия;(2-гидроксиэтилтио)бутират натрия и метил-(2-гидроксиэтилтио)ацетат, метил-4-(2-гидроксиэтилтио)бутират, в концентрациях от 0,1 до 3 г/л. 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 1мм).

Биомассу бактерий на сухой вес в культуре определяли весовым способом. Для этого аликвоты бактериальной суспензии объемом 20 мл центрифугировали 8 мин при 6000g. Затем дважды отмывали клетки дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105 °С в сушильном шкафу в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

Были проведены эксперименты с добавлением различных веществ (4-и5-гидроксипентановая кислота; (2-гидроксиэтилтио)бутират натрия; метил-(2-гидроксиэтилтио)ацетат и метил-4-(2-гидроксиэтилтио)бутират).

2.4 Определение концентрации фруктозы

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого культуральную среду, отделенную от клеток бактерий при центрифугировании, разводили в 25 раз. 1 мл пробы наливали в пробирку, куда добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 1000 мл 95%-ного этилового спирта); 3 мл раствора соляная кислота:дистиллированная вода в соотношении 5:1. В качестве контроля вместо культуральной среды использовали дистиллированную воду. Пробирки с контролем и пробой помещали на водяную баню на 20 мин, при $t=80$ °С. По истечении этого времени пробирки охлаждали до комнатной

температуры и измеряли оптическую плотность на фотоколориметре Unicо при $\lambda=540$ нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику.

2.5 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). Метанолит 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 1мл дистиллированной воды.

2.6 Выделение полимера

Для выделения полимера взяли 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 биомассу отделяли от растворителей пропусканием через фильтровальную бумагу. Растворитель удаляли на роторном испарителе при $t=45$ °C. Далее в колбы добавляли дихлорметан для перерастворения полимера и затем полимер осаждали добавлением двойного объема гексана.

2.7 Определение молекулярно-массового состава полимера

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

Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, полидисперсность ($PD=M_w/M_n$).

2.8 Исследование свойства поверхности пленки.

Пленки были получены методом испарения 2% П(ЗГБ/ЗГВ/4ГВ), П(ЗГБ/2ГЭТА), П(ЗГБ) в дихлорметане. Раствор с дихлорметаном, приготовленный на магнитной мешалке при комнатной температуре, испарялся с чашек под стеклянным колпаком в течение 24 ч.

Свойства поверхности пленочных образцов оценивали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E (Kruss, Германия), с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. На вырезанную из пленочных образцов полоску (1 x 5 см) поочередно наносили капли воды и дийодметана объемом 1,5 мкл. В полуавтоматическом режиме методом «Circle» измеряли краевые углы смачивания. Для каждого образца проводили не менее 6 измерений. Из полученных значений методом Оунса-Вендта-Рабеля-Кьельбле рассчитывали свободную поверхностную энергию (СПЭ), ее дисперсную и полярную составляющую, определяли среднее значение и стандартное отклонение [34].

2.9 Определение температурных характеристик.

Термический анализ проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (MettlerToledo, Швейцария). Образцы массой $4,0 \pm 0,2$ мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью 5 °C/мин до 200 °C; образец выдерживали при 200 °C в течение 1 мин; охлаждали до -20 °C при скорости 5 °C/мин и выдерживали 4 мин. Далее повторно нагревали до 320 °C при скорости 5 °C/мин. Температуры стеклования (T_{cm}), кристаллизации ($T_{кр}$), плавления ($T_{пл}$) и термической деградации ($T_{дегр}$) определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE»

Изъято 17 стр.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследован рост бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 и синтез полимера в присутствии новых прекурсоров: 4-и 5-гидроксипентановой кислоты; (2-гидроксиэтилтио)бутирата натрия, метил-(2-гидроксиэтилтио)ацетата и метил-4-(2-гидроксиэтилтио)бутирата.
2. Показано, что при добавлении натриевой соли (2-гидроксиэтилтио)масляной кислоты и метил-4-(2-гидроксиэтилтио)бутирата происходит синтез сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ) и П(ЗГБ/4ГБ). Содержание мономеров ЗГВ и 4ГБ в полимере возрастает с увеличением концентрации предшественников.
3. При добавлении метил-4-(2-гидроксиэтилтио)бутирата происходит синтез сополимера П(ЗГБ-2-гидроксиэтилтио ацетата), 1,7% при общем содержании субстрата 1 г/л и 1,8% при 2 г/л, содержание мономера в полимере увеличивается с увеличением концентрации предшественника.
4. При добавлении γ -валеролактона и 5-гидроксипентановой кислоты происходит включение сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГВ) и П(ЗГБ/ЗГВ), соотношение мономеров ЗГВ и 4ГВ составляет 1:0,14. Содержание мономеров также возрастает с увеличением концентрации предшественника. Максимальное включение сополимера ЗГВ (25 мол.%), 4ГВ (0,7 мол.%).
5. Исследованы физико-химические свойства П(ЗГБ/ЗГВ/4ГВ) и П(ЗГБ-2ГЭТА). Показано, что с содержанием мономеров уменьшается молекулярная масса, в зависимости от общего содержания мономера.
6. Структура пленки, в зависимости от мономера, изменяется в сторону пористости.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Poli, Annarita. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea [Электронный ресурс] / Annarita Poli, Paola Di Donato, Gennaro Roberto Abbamondi, Barbara Nicolaus // Archaea. – 2011
2. Kamnev A. A. Endophytic and epiphytic strains of *Azospirillum brasilense* respond differently to heavy metal stress/ Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P.// Microbiology, 2007. – V. 76. – P. 809-811.
3. Obruca, S. Production of poly(3- hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate/ Obruca, S.; Marova, I.; Snajdar, O.; Mravcova, L.; Svoboda, Z.// Biotechnol. Lett., 2010. – V. 32. – P. 1925–32.
4. Suzuki T, Control of molecular weight of poly-p-hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens* / Suzuki T, Deguchi H, Yamane T, Shimizu S, Gekko K // Appl Microbiol Biotechnol (1988) 27:487-491
5. Пономарева, В.Т. Использование пластмассовых отходов за рубежом / В.Т. Пономарева, Н.Н. Лихачева, З.А. Ткачик // Пластические массы, 2002. -№ 5.- С. 44-48.
6. Волова, Т.Г. Получение и исследование физико-химических свойств микробных полиоксиалканоатов / Т.Г. Волова, С.Г. Луковенко, Аюд. Васильев //Биотехнология, 1992. -№1.- С. 19-22.
7. Вторичное использование полимерных материалов / Под ред. Е.Г. Любешкиной. –М., 1985. – 192 с.
8. Одесс, В.И. Вторичные ресурсы: хозяйственный механизм использования / В.И. Одесс. – М., 1988. – 15 с.
9. Васнев В.А. Биоразлагаемые полимеры. Высокомолекулярные соединения. Сер. Б. М., 1997. Т.39. №12. С. 2073-2086.

10. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов: Учеб. Пособие / А.С. Клинков, П.С. Беляев, М.В. Соколов. – Тамбов: ТГТУ, 2005. – 80с.
11. Рубан Е.А. Фосфолипиды и фосфолипазы микроорганизмов. / Успехи микробиологии / -1980, №15 – С. 41-67
12. Katja Peplinski Investigations on the microbial catabolism of the organic sulfur compounds TDP and DTDP in *Ralstonia eutropha* H16 employing DNA microarrays/ Katja Peplinski, Armin Ehrenreich, Christina Doring, Mechthild Bomeke, and Alexander Steinbuchel// *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 Nov; 88(5): 1145–1159.
13. Николаева Д.А. Биосинтез поли-3-гидроксибутирата разной молекулярной массы культурой *azotobacter chroococcum* и его биодegradация / Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук // 2004 г.
14. Suzuki T Mass production of poly-3-hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. / Suzuki T, Yamane T, Shimizu S // 1986 *Appl Microbiol Biotechnol* 23:322—329
15. Peoples O. P., Sinskey A. J. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*) // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – R. 264. – №. 26. – p. 15298-15303.
16. Noda I., Green P. R., Satkowski M. M., and Schechtman L. A. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers / *Biomacromol.* /2005. V. 6. – p. 580-586.
17. Laycock, B. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoate / B. Laycock, P. Halley, S. Pratt et al. // *Prog. Polym. Sci.* – 2013. – Vol. 38. – p. 536-583– 2007. – Vol. 82. – p. 233-247.
18. Poirier, Y. Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate / Y. Poirier, S.M. Brumbley // In: *Plastics from bacteria: Natural functions and applications* / G.Q.

19. Chen, A. Steinbüchel, editors. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. – с. 187-211.
20. Бонарцева, Г.А.
Новые полимерные системы для контролируемого высвобождения дипирадамов и индометацина / Бонарцева Г.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006 – Т. 42 – С. 710-715.
21. Kunasundari B., Sudesh K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates // Express Polym. Lett. – 2011. – R. 5. – №. 7. – q. 620-634.
22. 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. – R. 80. – №. 1. – q. 183-194.
23. Steinbüchel A. et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions // Canadian journal of microbiology. – 1995. – R. 41. – №. 13. – q. 94-105.
24. Volova T. G. et al. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B10646 // Bioresource technology. – 2013. – R. 146. – q. 215-222.
25. Madison L. L., Huisman G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic // Microbiology and molecular biology reviews. – 1999. – R. 63. – №. 1. – q. 21-53.
26. Chen, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry // Chem. Soc. Rev., 2009. – 2434 – 2446
27. Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины // Новосибирск: Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.
28. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // Proc. Biochem., 2004. – С. 607 – 619.

29. Ю. В. Поконова Новый справочник химика и технолога справочное издание / СПб.: Мир и семья.
30. Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148–175.
31. Gorenflo, V., Schmack, G., Vogel, R., & Steinbüchel, A. (2001). Development of a process for the biotechnological large-scale production of 4-hydroxyvalerate-containing polyesters and characterization of their physical and mechanical properties. *Biomacromolecules*, 2, 45–57.
32. Valentin, H. E., & Steinbüchel, A. (1995). Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Polymers and the Environment*, 3(3), 169–175.
33. Kessler, B., Witholt, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism // *Biotechnol.*, 2001. – V. 86. – P. 97–104.
34. Owens D.K. Estimation of the surface free energy of polymers / Owens D.K., Wendt R.C J. // *Appl. Polym. Sci.* 13: 1741-1747 // Kaelble D.H. (1970): Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. *J. Adhes.* 2: 66-81.
35. Marvel, C. S. & Kotch, A. J. *Am. Chem. Soc.* 73, 1100–1102 (1951).
36. Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8502, Japan, and Polymer Chemistry Laboratory, RIKEN Institute, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan.
37. Madison, L. L. & Huisman, G. W. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21–53 (1999).
38. J. Kawada, T. Lutke-Eversloh, A. Steinbüchel, and R. H. Marchessault, *Biomacromolecules*, 4, 1698 (2003).
39. Hiroshi Kimura, Kiminari Mouri, Yasutaka Kamei Department of Polymer and Science, Faculty of Engineering, Yamagata University, Yonezawa 992-8510

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

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« 5 » июля 20 19 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Биосинтез полигидроксиалканоатов различного состава бактериями
Cupriavidus eutrophus B-10646 с использованием новых прекурсоров

Научный руководитель


Подпись, дата

к.о.н. доцент
Должность, ученая
степень

Жила Н.О.
Инициалы, фамилия

Выпускник


Подпись, дата

Хнытикова В.А.
Инициалы, фамилия

Красноярск 2019