

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.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Характеристика нового штамма *Cupriavidis sp.*, синтезирующего
полигидроксиалканоаты.

Направление подготовки 06.04.01 – Биология

Профиль 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный
руководитель

подпись, дата

Доцент,
канд. биол. наук,
Н.О. Жила

Выпускник

подпись, дата

А.А. Колкова

Рецензент

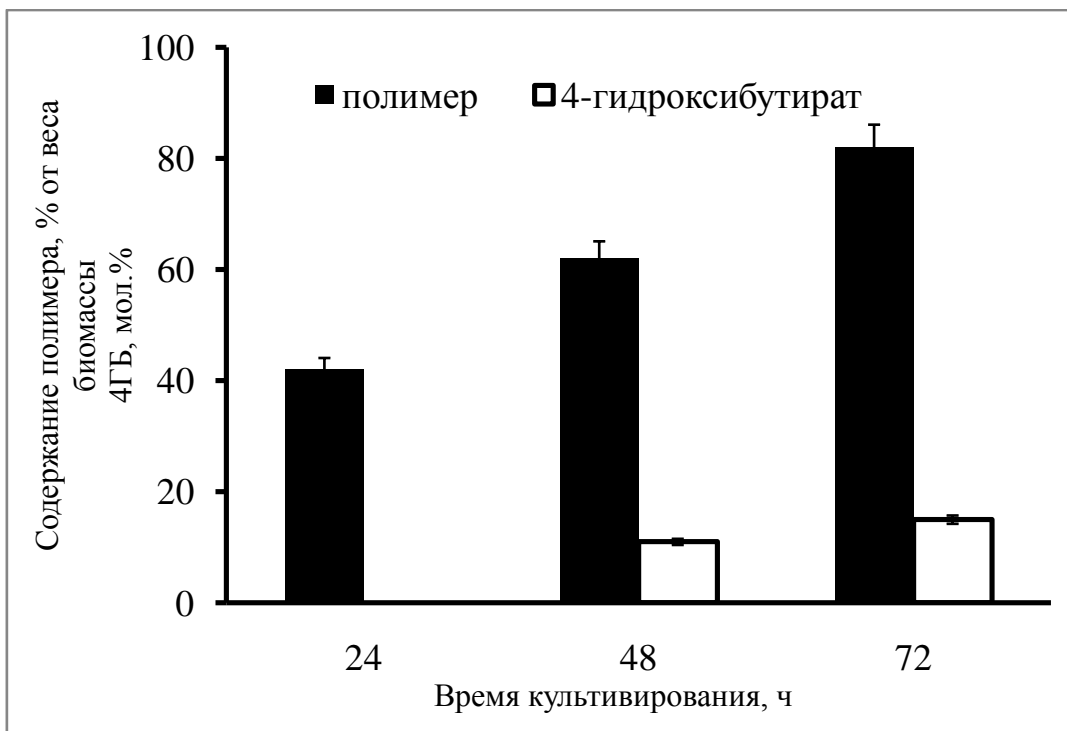
подпись, дата

Канд. биол. наук
М.Ю. Трусова

Красноярск 2019г.

Содержание

Реферат магистерской диссертации	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Полигидроксиалканоаты.	8
1.1.1 Роль ПГА в жизнедеятельности микробной клетки и его синтез.	11
1.1.2 Многообразие ПГА.	12
1.1.3 Поли(3-гидроксибутират)	14
1.1.4 Модели гранулообразования.	16
1.1.5 Физико-химические свойства ПГА.....	17
1.2 Организмы синтезирующие ПГА	18
1.3 Субстраты, используемые для синтеза ПГА.	22
1.4 Сополимеры П(ЗГБ/ЗГВ) и П(ЗГБ/4ГБ).....	26
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.1 Объект исследования	32
2.2 Процесс культивирования и измерение параметров процесса .	32
2.3 Исследование содержания и состава ПГА	35
2.4 Определение молекулярной массы полимера	35
2.5 Идентификация штамма	37
2.6 Определение жирнокислотного состава липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Морфолого-культуральные характеристики нового штамма <i>Cupriavidus necator</i>	Ошибка! Закладка не определена.
Царство Procariotae	Ошибка! Закладка не определена.
Класс <i>Betaproteobacteria</i>	Ошибка! Закладка не определена.
Семейство <i>Burkholderiaceae</i>	Ошибка! Закладка не определена.
Род <i>Cupriavidus</i>	Ошибка! Закладка не определена.



..... Ошибка!

Закладка не определена.

Заклучение 44

Список литературных источников 45

Реферат магистерской диссертации

Тема магистерской диссертации: Характеристика нового штамма *Cupriavidissp.*, синтезирующего полигидроксиалканоаты

Автор магистерской диссертации: Колкова Анастасия Андреевна

Научный руководитель магистерской диссертации: к.б.н., доцент базовой кафедры биотехнологии ИФБиБТ СФУ

Сведения об организации-заказчике: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» Институт фундаментальной биологии и биотехнологии. Базовая кафедра биотехнологии

Актуальность темы исследования: Пластмассы играют важную роль в нашей повседневной жизни и используются для различных целей. Они являются неотъемлемой частью нашей повседневной жизни. Есть две основные проблемы, связанные с использованием пластмасс.

Во-первых, так как они стабильны, они накапливаются в окружающей среде в течение десятилетий и вызывают ряд экологических проблем.

Во-вторых, из-за неизбежного сокращения нефтяных ресурсов, возникает необходимость разработать альтернативные методы производства пластмасс.

Биоразлагаемые полимеры, производимые микроорганизмами, могут использоваться в качестве заменителей обычных пластиков, полученных из нефтехимических источников, поскольку они имеют сходство по своим свойствам, и больше полезных качеств, по сравнению с синтетическими полимерами. Актуальность данной работы заключается в поиске новых штаммов микроорганизмов способных давать высокие выходы полимера.

Цель работы: ввести в культуру новый штамм, выделенный из почвы, и охарактеризовать его.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать культурально-физиологические особенности штамма;
2. Провести молекулярно-генетический анализ на основании 16spРНК;
3. Изучить способность данного штамма расти в автотрофных и гетеротрофных условиях, и синтезировать полигидроксиалканоаты;
4. Изучить жирнокислотный состав липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов;
5. Изучить способность штамма синтезировать сополимеры с 4-гидроксибутиратом и 3-гидроксиивалератом.

Структура работы: Работа состоит из трех глав. Первая глава посвящена теоретическим аспектам, связанным с общим представлением о ПГА и его биосинтезе. В ней мы рассмотрели:

- Общую характеристику ПГА, их многообразие. Роль в клетке;
- Общую характеристику поли(3-гидроксибутирата);
- Модели гранулообразования;
- Организмы и субстраты для производства ПГА;
- Сополимеры

Во второй главе мы описали методы культивирования в автотрофных и гетеротрофных условиях, методы исследования определения концентрации биомассы, содержания полимера, жирнокислотного состава липидов, молекулярной массы полимера.

Третья глава была посвящена результатам и обсуждениям проводимого исследования.

Введение

Пластмассы играют важную роль в современной жизни и используются для различных целей. Они являются неотъемлемой частью нашей повседневной жизни. Ежегодно в мире производится около 140 миллионов тонн пластмасс. Производство этих материалов резко возросла из-за их низкой стоимости, долговечности, хороших механических и термических свойств. Они используются в медицинских учреждениях, телекоммуникации, в мебельной промышленности, как упаковочные материалы, в производстве одежды для покупок и мешков для мусора, как контейнеры для жидкости, обуви, игрушек, товаров для дома, промышленных товаров и строительных материалов. Есть две основные проблемы, связанные с использованием пластмасс.

Во-первых, они достаточно стабильны. Накапливаясь в окружающей среде в течение десятилетий, вызывают ряд серьезных экологических проблем.

Во-вторых, из-за неизбежного сокращения нефтяных ресурсов, как основных субстратов, возникает необходимость разрабатывать альтернативные методы производства пластмасс.

Биологически разлагаемые полимеры, производимые микроорганизмами, могут использоваться в качестве заменителей обычных пластиков, полученных из нефтехимических источников, поскольку они имеют сходство по своим свойствам, но больше полезных качеств, по сравнению с синтетическими полимерами. Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются одними из таких биополимеров, которые накапливаются внутри клеток микроорганизмов в виде гранул. Исследования микробной продукции ПГА должны быть направлены на выявление экономически эффективных субстратов, а также на определение наиболее пригодного штамма для их производства.

Современным крупномасштабным направлением, является развитие индустрии экологически чистых биологически деградируемых пластиков. Связано это с тем, что объемы производства синтетических пластмасс

составляют более 140 млн. тонн в год, и постоянно растут. Огромная часть пластмасс аккумулируется в виде отходов на свалках, как на суше, так и в океане, причиняя глобальный ущерб природе. Учитывая, то что 90 % пластмасс производится из нефти и газа (не возобновляемых природных ископаемых) поиск альтернативных источников очень актуален.

За рубежом биосинтезом, как коммерческой деятельностью полигидроксиалканоатов (ПГА) занимаются многие промышленные фирмы и компании («Monsanto Company», «Bioscience Ltd.», «Metabolix Inc.», «Merck», «Procter & Gamble», «Tepha», «Berlin Packaging Corp.», «BioVentures Alberta Inc.» и др.), разрабатывающие технологии биосинтеза ПГА, используя разные субстраты, в том числе отходы [1]

Цель работы – охарактеризовать новый штамм *Cupriavidus sp.*, выделенный из почвы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

6. Охарактеризовать физиолого-культуральные свойства исследуемого штамма
7. Изучить способность штамма расти в автотрофных и гетеротрофных условиях
8. Изучить общий жирнокислый состав липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов
9. Изучить способность штамма синтезировать сополимеры с 4-гидроксибутиратом и 3-гидроксивалератом

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Полигидроксиалканоаты.

Биологические материалы, такие как полинуклеотиды, полиамиды, полисахариды, полиоксоэфирсы, политиоэфирсы, полиангидриды, полиизопреноиды и полифенолы являются потенциальными кандидатами на замещение синтетических пластиков [3]. Среди выше перечисленных, особую роль играют полигидроксиалканоаты (ПГА). Эти соединения относятся к группе полиоксоэфиров. Они привлекают особое внимание, так как обладают биоразлагаемыми и термопластичными свойствами.

В природе существуют микроорганизмы, способные накапливать вещества, которые по своим физико-химическим свойствам близки с широко применяемым и выпускаемым в огромных количествах полиэтиленом и полипропиленом. Объемы выпуска данных материалов, получаемых в процессах нефтяного органического синтеза, огромны – 140млн. тонн в год [3]. В отличие от полиэтилена и полипропилена, которые не разрушаются в природной среде, продукты жизнедеятельности микроорганизмов биосовместимы и биоразрушаемы. Эти продукты жизнедеятельности, которые синтезируют и накапливают бактерии, относятся к классу полигидроксиалконатов (ПГА).

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются биополимерами, синтезируемыми микроорганизмами как липидные включения для накопления энергии в гранулированных формах внутри клеток [4].

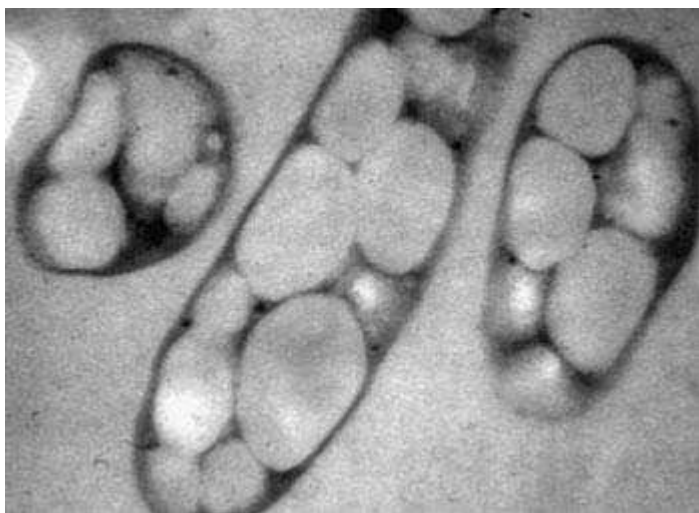


Рисунок 1. — Гранулы ПГА в культуре клеток бактерий *Azotobacter chroococcum* (трансмиссионный электронный микроскоп)

Французский ученый Лемуань впервые обнаружил ПГА в *Bacillus megaterium* в форме поли (3-гидроксибутирата) (ПЗГБ) в 1925 г. [5] ПГА являются природными сложными полиэфирами 3-, 4-, 5- и 6-гидроксиалкановых кислот, которые достаточно термопластичны. Молекула ПГА обычно состоит из 600-35000 (R) мономерных звеньев гидроксигирных кислот. Каждое мономерное звено содержит R-группу боковой цепи, которая обычно представляет собой насыщенную алкильную группу, но также может принимать форму ненасыщенных алкильных групп, разветвленных алкильных групп и замещенных алкильных групп, хотя эти формы встречаются реже.

ПГА нерастворимы в воде, обладают хорошей устойчивостью к гидролитическому воздействию, устойчивы к ультрафиолетовому излучению, погружаясь в воду, что способствует анаэробной биодegradации в отложениях. Кроме того, они являются биосовместимыми и биоразлагаемыми (например, подвергаются деградации в почвах) [6]. ПГА также имеют хиральные молекулы, они, как правило, определяют степень деградации ПГА, которая напрямую зависит от их типа и состава. Учитывая вышесказанное можно сделать вывод о том, что биодegradация ПГА зависит от типа и состава полимера, условий окружающей среды, процесса культивирования, и микроорганизма-

продуцента (разные микроорганизмы продуцируют различные ПГА-деполимеразы). [7]ПГА растворимы в хлороформе и других хлорированных растворителях. Их температура стеклования колеблется от -50 до 4°C , температура плавления от 40 до 180°C . Температура термодегградации, предел прочности, модуль Юнга, прохождения пара и кислорода зависит от состава мономерной единицы. Из-за структурных изменений в мономерах, составляющих ПГА, они различаются по свойствам и химическому составу как гомо, так и сополимеры.

Полигидроксиалканоаты обладают многочисленными свойствами, что вызывает повышенный интерес в различных сферах жизни человека, включая биомедицину. К преимуществам этого класса биоматериалов относят следующие:

- высокая совместимость ПГА – связана с тем, что мономер, образующий этот полимер – 3-гидроксимасляная кислота – естественный метаболит клеток и тканей организмов;
- ПГА не гидролизуется в жидких средах, т.к. деградация ПГА является естественной биологической особенностью и происходит клеточным и гуморальными путями; образующиеся при этом мономеры гидроксимасляной кислоты не вызывают резкого окисления тканей и, следовательно, выраженной воспалительной реакции;
- ПГА получают методом прямой ферментации, их производство не требует серии технологических этапов (синтез мономеров, полимеризация, добавления пластификаторов и модифицирующих компонентов);
- сырьем для синтеза ПГА могут быть сахара, органические кислоты, спирты, смеси CO_2 и H_2 , продукты гидролиза растительного сырья, промышленные отходы производства сахара, пальмового масла,

водосодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина [3];

Полигидроксиалконаты как внутриклеточный материал используется для хранения углерода и энергии в клетках прокариот.

1.1.1 Роль ПГА в жизнедеятельности микробной клетки и его синтез.

ПГА играет ключевую роль в приспособлении микроорганизмов к выживанию при стрессе. ПГА способствует долгосрочному выживанию бактерий в условиях дефицита питательных веществ, выступая в качестве запасов углерода и энергии для не споровых и спорообразующих форм бактерии. Кроме того, бактерии, содержащие ПГА, показали усиление устойчивости к стрессу при кратковременных неблагоприятных воздействиях окружающей среды, таких как ультрафиолетовое (УФ) излучение, нагревание и осмотический шок.

Биосинтетические пути ПГА неразрывно связаны с центральной частью бактерии. Метаболические пути, включая гликолиз, цикл Кребса, β -окисление, синтез жирных кислот *de novo*, аминокислотный катаболизм, цикл Кальвина и сериновый путь. Многие общие промежуточные звенья также разделяются между ПГА и этими метаболическими путями, в частности, ацетил-КоА.

В условиях, богатых питательными веществами, производство большого количества кофермента А из цикла Кребса, блокирует синтез ПГА путем ингибирования 3-кетотиолазы, таким образом, что ацетил-КоА направляется в Цикл Кребса для производства энергии и поддержания роста клеток [19]. И наоборот, при несбалансированных условиях питательных веществ (то есть, когда такие важные питательные вещества, как азот и фосфор ограничены), уровни коэнзима А не являются ингибирующими, что позволяет направлять ацетил-КоА к синтетическим путям для накопления ПГА [19,20]. Эта стратегия метаболической регуляции позволяет микробам, накапливающим ПГА,

максимизировать питательные ресурсы при их адаптации к условия окружающей среды.

1.1.2 Многообразие ПГА.

Полигидроксиалканоаты классифицируются в зависимости от набора мономеров, образующих полимер. Так, если в полимере представлен только один тип мономера, он будет называться – гомополимер, и если же полимер построен из различных мономеров, его принято называть гетерополимером, или сополимером.

Среди известных ПГА встречаются полиэфиры различной химической структуры, от высоко кристаллических термопластов до термолабильных резиноподобных эластомеров. К настоящему времени известно более 150 различных по структуре мономеров, входящих в состав ПГА [3].

В зависимости от длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры разной структуры, ПГА подразделяют на три основные группы:

1. Короткоцепочечные – ПГАкц, состоящие из кислот с длинной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;
2. Среднецепочечные – ПГАсц, в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;
3. Длинноцепочечные – ПГАдц с содержанием кислот C17 и C18 [5].

Наиболее изученными являются короткоцепочечные ПГА – поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) и сополимеры 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом [4]

Биополимеры также могут быть разделены на различные классы [13] на основе их производства.

1. Полимеры, извлеченные / удаленные непосредственно из биомассы, такие в виде полисахаридов (крахмал, целлюлоза и белки).

2. Полимеры, полученные микроорганизмами или генетически модифицированными бактериями. На сегодняшний день эта группа биооснованных полимеров состоит в основном из полигидроксиалканоатов, но разработки с бактериальной целлюлозой продолжаются.

3. Полимеры, полученные классическим химическим синтезом с использованием возобновляемых биооснованных мономеров. Хороший пример представляет собой полимолочную кислоту, биополиэфир, полимеризованный из молочнокислых мономеров.

4. Полимеры, полученные обычным синтезом из синтетических мономеров. Примерами являются алифатические и ароматические сложные полиэферы.

Поликапралактон, полимолочная кислота и полигидроксибутират – валерат – это первые полностью биоразлагаемые синтетические полимеры, которые стали доступны на рынке с 1990 года. Как правило, эти синтетические полимеры, сырьем для которых служили натуральные ресурсы, дороже, чем полимеры получаемые на основе нефти [19]. Различные типы рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* способны синтезировать ПГА до высоких внутриклеточных уровней, а некоторые подходят для генетически опосредованных систем лизиса, чтобы облегчить высвобождение гранул ПГА. Хотя микробные пластмассы имеют явное преимущество перед обычными пластмассами, получаемыми на основе нефти, основным их недостатком является, высокая стоимость связана с ферментативным производством.

Основные факторы, влияющие на себестоимость продукции, включают в себя источники углерода, текущие затраты на ферментацию, производительность процесса, урожайность биомассы и последующая обработка [8]. Несмотря на прекрасные свойства ПГА, они все еще не сопоставимы с пластмассами на нефтяной основе, из-за связанных с этим

затратна их производство в 5–10 раз выше, чем у обычного пластика на основе нефтехимии, такого как полиэтилен. Стоимость углеродного субстрата является основным фактором, составляющим 50% от общей стоимости всего объема производства. Поэтому мировой исследовательский интерес сосредоточен на снижении себестоимости продукции с использованием различных отходов, таких как источник углерода [7].

1.1.3 Поли(3-гидроксибутират)

Многие прокариоты способны накапливать резервные материалы, такие как цианофицин (резерв азота и углерода), ПГА (резерв углерода), и полифосфат (резерв фосфора) в виде инертных осмотических включений.

П(ЗГБ) является наиболее распространенным типом ПГА среди бактерий. Содержание П(ЗГБ) в клетках микроорганизмов может составлять до 90% от сухой массы клеток [39].

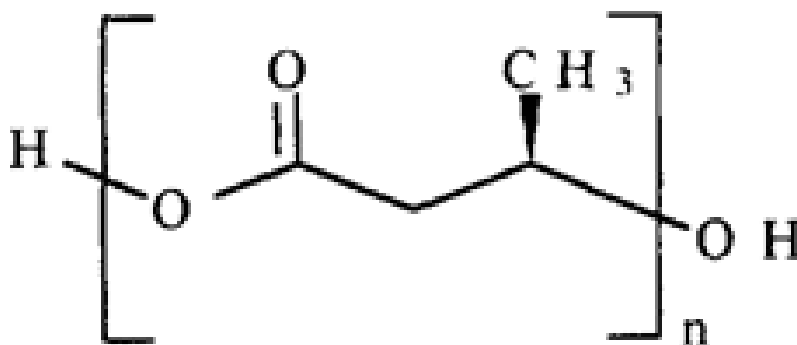


Рисунок 2. Общая формула молекулы поли-3- гидроксibuтирата.

П(ЗГБ) накапливается в цитоплазме бактерий в виде включений в различном количестве и размерах в зависимости от условий культивирования [35]. В процессе роста и накопления ПГА, бактериальные клетки увеличивают свою длину, но ширина остается постоянной. Таким образом, бактерии точно

контролируют свои размеры и форму для того, чтобы наиболее эффективно импортировать питательные вещества.

Есть, как правило, 8-12 гранул/клетку, их диаметр составляет от 0,2 до 0,5 мкм в *Ralstonia eutropha*.

П(ЗГБ) является наиболее распространенным типом ПГА. Биосинтез и биодegradация П(ЗГБ), а также других типов ПГА изучались в нескольких лабораториях в течение последних 25 лет [39].

Гранулы полигидроксibuтирата - это важные соединения для хранения углерода и энергии у многих прокариот, место локализации гранул - цитоплазма. В условиях ограниченного доступа питательных веществ гранулы П(ЗГБ) позволяют выживать клеткам [23]. Когда наступают более благоприятные условия для репликации, биополимеры деградируют, и освобожденная энергия и мономеры клетка использует на рост и деление [19].

Гранулы в клетке окружены мембраной, толщиной около 2 нм [4]. Они состоят из аморфного полимерного ядра, окруженного плотным белковым поверхностным слоем. Полимер и поверхностный слой представляет собой многофункциональный комплекс, для которого был предложен термин «carbonosome».

Поверхностный слой гранул П(ЗГБ) представляет собой сложноорганизованную систему, которая включает много разных компонентов. По крайней мере описано 17 белков, которые имеют важное значение для биосинтеза, хранения и внутриклеточного использования П(ЗГБ): пять белков-фазинов - PhaP1 - PhaP5, они располагаются на поверхности гранул П(ЗГБ); семь П(ЗГБ)-деполимераз (PhaZs), две ПЗГБ-гидролазы (PhaZb, PhaZc или PhaYs), регулятор белка ФАР и три главных П(ЗГБ) -биосинтетических фермента [β -кетотиолаза (PhaA), ацетоуксусная-CoAредуктаза (PhaB1) и П(ЗГБ)-синтаза (PhaC1)] из phaCAB оперона [38].

Фазины - маленькие амфифильные белки, которые определяют количество и размер накопленного П(ЗГБ) [39]. Основная функция фазинов - контролирование свойств поверхности гранул ПГА. Эти белки прочно прикрепляются к гидрофобной поверхности растущей ПГА гранулы, чтобы заблокировать связывание других белков [30].

П(ЗГБ)-синтаза (PhaC1) является ключевым ферментом синтеза П(ЗГБ) и катализирует процесс полимеризации 3-гидроксibuтирил-CoA. Функция второй - каталитически неактивной – П(ЗГБ)-синтазы - PhaC2 неизвестна, но она обладает способностью связываться с П(ЗГБ) гранулами в естественных условиях. Фазины (PhaPs), в частности PhaP1, охватывают большую часть поверхности гранул и предотвращают слипание гранул между собой. П(ЗГБ) деполимеразы (PhaZs) имеют важное значение для реутилизации (мобилизации) полимера во время голодания. Олигомеры гидролазы (PhaZb, PhaZc) участвуют в расщеплении промежуточно олигомера 3-гидроксibuтирата (ЗГБ) образуемого во время мобилизации. Регуляторные белки (PhaRs) регулируют экспрессию выбранных генов фазинов.

Известно много различных PGAPs, но мало известно об организации этих PGAPs на поверхности гранул ПГА. В частности, не известно, организованы они случайным образом на поверхности П(ЗГБ) или существуют конкретные белок-белковые взаимодействия между некоторыми PGAPs, которые приводят к упорядоченной структуре на поверхности [38].

1.1.4 Модели гранулообразования.

На сегодняшниймомен существуют три модели гранулообразования:

1. Мицелиальная модель. Удлиняющиеся цепи ПЗГБ ковалентно связаны с синтазой, изначально собранной в мицелиальную структуру;

2. Модель «почкования». Гидрофобная ПГА-синтаза связывается с внутренней поверхностью плазматической мембраны и отпочковывается из этой мембраны, после чего перемещается к поверхности гранулы, покрытой липидным монослоем. В этой модели для образования гранулы задействованы как биологические системы клетки, так и физические свойства самого полимера.

3. Тиан с соавторами предложил третью модель образования гранул ПГА у *R. eutropha*. Авторы наблюдали тёмноокрашенные удлинённые структуры, или «элементы-посредники», в центре клетки с прикрепленными маленькими гранулами. В старой культуре эти элементы отсутствовали, что по всей видимости может означать, что они разрушились, либо покрылись гранулами. Авторы предположили, что данные элементы-посредники могут служить в качестве каркасов, обеспечивая для ПГА-синтазы инициацию образования гранул [3].

1.1.5 Физико-химические свойства ПГА.

Строение ПГА, определяет их свойства, и прежде всего они зависят от строения в полимерной цепи боковых групп, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле. В ходе изучения ПГА стало ясно, что свойства этих полимеров меняются очень значительно в зависимости от типа и соотношения мономеров в полимерной цепи [5].

Молекулярная масса, одно из наиболее важных макроскопических параметров, характеризующих свойства определенных полимеров. Она же определяет технологические свойства материала и возможности его переработки. На величину молекулярной массы влияют, условия культивирования, методы экстракции полимера и непосредственно, тип микроорганизма-продуцента. Молекулярная масса полигидроксиалканоата очень неустойчивый показатель. Например, у поли(3-гидроксибутирата)

молекулярная масса может меняться от нескольких сотен до миллионов кДа с полидисперсией от 2,3 до 3,2 [5].

Термомеханические свойства полимера определяют его способность кристаллизоваться в нативном состоянии. Величина данного параметра заметно различается для каждого отдельного типа полимера в зависимости от состава сополимеров. Некоторые ПГА, в том числе и полиоксибутират, не могут находиться в газовом состоянии. Это связано с тем, что небольшое увеличение температурного воздействия приводит к сильной деформации материала. Поэтому был определен основной тип агрегатного состояния полимеров - конденсированное состояние (кристаллическое, стеклообразное, жидкое и вязко-текучее) [5]. Температура плавления полимеров варьирует в зависимости от фракции определенного компонента в полимере [3].

1.2 Организмы синтезирующие ПГА

Признак биоаккумуляции ПГА широко распространен среди бактериальных и архейных доменов, встречающиеся более чем в 70 бактериальных и архейных родах [4]. Биоаккумуляированные ПГА хранятся в виде внутриклеточных липидных гранул в этих микробных клетках [4].

До настоящего времени известно более 300 микроорганизмов, синтезирующих полигидроксиалканоаты. Но для промышленного применения изучается, следующие штаммы: *Cupriavidus latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, несколько штаммов метилотрофов и трансгенные штаммы *Escherichia coli*, *Cupriavidus eutrophus*, *Klebsiella aerogenes*. Именно эти виды обладают свойствами, необходимыми для промышленного продуцента биопластиков [2].

Бактерии, способные продуцировать и накапливать ПГА в клетке могут быть разделены на две группы. В первой группе относятся бактерии, которым для накопления ПГА нужны условия ограничения питательных веществ такие

как фосфор, азот, кислород или магний, они не накапливают ПГА во время фазы роста. Ко второй группе относятся бактерии, накапливающие ПГА во время фазы роста, и не требующие ограничения питательных веществ. Например, бактерии *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* и *Pseudomonas* относятся к первой группе, в то время как рекомбинантная кишечная палочка относится ко второму.

Различные бактерии производят разные типы ПГА. Например, хорошо известно, что флуоресцентные штаммы *Pseudomonas* имеют mcl-ПГА-синтазы для синтеза ПГА и 6–14 атомы углерода.

Pseudomonas putida имеет тенденцию синтезировать ПГА путем включения различных функциональных групп, таких как фенил, феноксил, олефин, галогены, алкилы и сложные эфиры при выращивании на субстратах, содержащих соответствующие химические структуры [9].

Ralstonia eutropha – типичный модельный организм, синтезирующий ПГА. Этот организм является наиболее изученным. Микроорганизмы этого вида могут накапливать до 80-90% поли(3-гидроксибутирата) (ПЗГБ) на простом углеродном субстрате при лимитировании фосфором, азотом или кислородом [3, 30]. *Ralstonia eutropha* – это перспективный продуцент, так как он аккумулирует ПГА даже на отходах промышленных и сельскохозяйственных производств [19].

Существуют бактерии синтезирующие и накапливающие одновременно несколько типов ПГА. К таким видам относятся *Pseudomonas sp.* 61-3. Этот микроорганизм синтезирует два типа ПГА: поли(3-гидроксибутират) – ПГА1, и поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксиалконат) (ПГА2). ПГА1 является гомополимером, а ПГА2 – гетерополимером, состоящим из 3 гидроксиалконоатных единиц, содержащих 4-12 атомов углерода. При помощи электронной микроскопии было обнаружено, что в *Pseudomonas sp.* 61-3, ПГА1 и ПГА2 накапливаются в виде различных гранул в одной и той же клетке [30].

Кроме *R. eutropha* и *Pseudomonas* sp., ПГА накапливают *Caryophanon latum* [22], *Rhodococcus ruber*, *Acinetobacter* sp., *Chromatium vi nosum*, *Bacillus megaterium*, *Paracoccus denitrificans* [30], *Rhizobium etli* [15] и многие другие штаммы.

Накопление ПГА наблюдается и у грамотрицательных экстремофильных бактерий. Эти бактерии накапливают ПГА в уникальных условиях культивирования с высокой соленостью или повышением температуры. Галофильный *Halomonas boliviensis* LC1 (DSM 15516) может расти и производить 56% CDM scl-ПГА ПЗГБ из гидролизата крахмала в умеренно солевых условиях (0,77 М NaCl) [6], в то время как термофильный *Thermus thermophilus* HB8 (ATCC 27634) синтезировал до 35,6% CDM сополимера scl-mcl-ПГА из сыворотки при высокой температуре культивирования 70°C. По сравнению с другими грамотрицательными бактериями, экстремофилы выгодны, с точки зрения их более низкого спроса на стерильность, а также их высокого потенциала для непосредственного применения с отходами.

Однако основной проблемой грамотрицательных бактерий является наличие липополисахарида (ЛПС), эндотоксинов в наружной клеточной мембране бактерий, которые могут совместно очищаться с неочищенным полимером ПГА в процессе экстракции [7]. Эндотоксин ЛПС является пирогеном, который может вызывать сильный воспалительный процесс [10], что делает полимер ПГА неподходящим для биомедицинского применения. Удаление ЛПС, эндотоксина может быть достигнуто обработкой полимера ФГА окислителями (то есть натрием) гипохлорита и NaOH, озона, пероксида водорода и бензоилпероксида), с многократным растворителем экстракции или экстракцией растворителем с последующей очисткой активированным углем [7,3,10]. Однако эти методы увеличивают общую стоимость производства ПГА и приводят к изменениям в самих молекулах ПГА и свойствах полимера (то есть происходит снижение молекулярной массы и полидисперсности полимера).

Производство ПГА в грамположительных бактериях было зарегистрировано в родах *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* [4]. По сравнению с грамотрицательными бактериями грамположительные бактерии в основном обнаруживается продуцирование scl-ПГА и при более низком содержании ПГА, примерно от 2 до 50% CDM, поэтому грамположительные бактерии еще не применяются для коммерческого ПГА производства. Ранее сообщалось о высоком содержании scl-ПГА, составляющем 82% CDM, для *Streptomyces sp.* (ATCC 1238). Некоторые штаммы микроорганизмов способны синтезировать сополимеры mcl-ПГА или scl-mcl-ПГА. В той же бактерии, образование исключительно mcl-ПГА (48% CDM) наблюдали при культивировании на октановой кислоте в отсутствие азота.

Несмотря на то, что в целом в грамположительных клетках накапливается меньшее количество ПГА, они полезнее грамотрицательных бактерий из-за отсутствия у них ЛПС, что может сделать их лучшим источником ПГА как сырья для биомедицинских применений.

ПГА также обнаружен у архей, но до настоящего времени его открытие было ограничено галоархеальными видами, а именно родами *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* и *Natronorubrum*.

Сообщалось, что *Haloarchaea* синтезирует ПГА из глюкозы, летучих жирных кислот и других веществ, сложных источников углерода, таких как крахмал, сывороточный гидролизат, виньяс и сырой глицерин [9].

В настоящее время лучшим производителем ПГА является *Haloferax mediterranei* (DSM 1411). Для его роста требуется NaCl и он может накапливать высокие уровни ПГА между 50 и 76% CDM [9]. *H. mediterranei* (DSM 1411) может быть привлекательным кандидатом для производства ПГА.

Однако когда по сравнению с умеренно галофильными бактериями, такими как *H. boliviensis* LC1 (DSM 15516), экстремальная соленость, требуемая галоархеями, может стать препятствием для производства ПГА, поскольку высокая концентрация соли требует дополнительных вложений в производство, а высококонцентрированные солевые среды, ускоряют коррозию ферментеров из нержавеющей стали. Не смотря на негативные моменты, галоархеи имеют преимущество перед галофильными бактериями в легкости восстановления ПГА. Восстановление ПГА от галофильных бактерий обычно требует использование химического, ферментативного или механического метода для разрушения клеточной стенки и высвобождения внутриклеточных гранул ПГА, и эти методы могут составлять до 50% или более от общей себестоимости производства ПГА. Растворители для экстракции, такие как хлороформ и ацетон также представляет потенциальную опасность для окружающей среды в случае неправильного использования и утилизации. Когда как наоборот, галоархеи подвергаются лизису клеток в дистиллированной воде и выделяют гранулы ПГА, которые могут быть восстановлены с помощью низкоскоростного центрифугирования [42]. Это делает процесс восстановления ПГА из галоархии относительно легким, менее химически и энергозатратным процессом, который приводит к снижению затрат на добычу и снижает вредный экологический след.

1.3 Субстраты, используемые для синтеза ПГА.

В зависимости от физико-биохимических свойств, экономической выгоды, и областью применения конечного продукта, а именно полимера, выбирают тип основного ростового субстрата, используемого для синтеза

полигидроксиалканоатов. ПГА являются очень важным и значимым материалом для использования в медицине, фармакологии, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, поэтому масштаб производства полимера может варьировать, от минимальных до сотен тысяч тонн в год. Требования, предъявляемые к стоимости и качеству сырья для различных объемов производств ПГА, различны. Сырьем для получения ПГА потенциально могут быть самые разнообразные субстраты. Разные субстраты имеют различную степень восстановленности, энергосодержание, и стоимость. Несмотря на громкие свойства ПГА, они все еще не сопоставимы с пластмассами на нефтяной основе из-за связанных с этим затрат производство в 5–10 раз выше, чем у обычного пластика на основе нефтехимии, такого как полиэтилен. Стоимость углеродного субстрата является основным фактором, составляющим 50% от общего объема производства. Для биосинтеза ПГА используется широкая линейка разных субстратов. Среди них: водород и углекислый газ, спирты, сахара, органические кислоты, а также отходы, получаемые при производстве: гидролизатов, сахаров, масел и необычные субстраты, включая токсичные [10]. Поэтому мировой исследовательский интерес сосредоточен на снижении себестоимости продукции с использованием различных отходов, таких как источник углерода.

Сыворотка, пшеничные и рисовые отруби как источники углерода

Сыворотка является побочным продуктом производства сыра и казеина и составляет до 90% объема обработанного молока. Половина этой сыворотки превращается в полезные продукты для человека и животных, а остальные обычно выбрасываются в окружающую среду. Предпринимались попытки использовать сыворотку как источник углерода для роста бактерий в качестве дешевого субстрата для стратегии производства ПГА. Сообщалось о выходе ПГА 1,27 г / л с выходом биомассы 5,0 г / л с использованием *P. Hydrovovora*.

Пшеница культивируется во всем мире в больших количествах. Отруби это внешний слой зерна пшеницы, который является твердым и состоит из околосемянки и алейрона, и является одной из составных частей зерна. Он содержит белки, углеводы и другие минералы, и его утилизация может быть проблематичной. Испытания, с использованием отходов отрубей пшеницы в качестве источника углерода для роста бактерий и производства ПГА, приводили к выходу биомассы около 3,19 г / л и ПГА 1,08 г / л. С другой стороны, существует еще один доступный компонент, как источник углерода – рис. Рис еще одна показательная культура, культивируемая во всем мире, которая может так же использоваться, как источник углерода для роста бактерий. Было отмечено высокое содержание биомассы 140 г / л и накопление ПГА 55,6% (мас. / мас.) при культивировании на рисе. Таким образом, использование этих отходов может стать надежной альтернативой для производства ПГА, и уменьшить проблемы их утилизации в окружающей среде.

Крахмал как источник углерода

Крахмал является потенциальным дешевым материалом, доступным на рынке, однако он имеет довольно сложную природу, которая ограничивает возможности многих штаммы бактерий, чтобы гидролизовать его и продуцировать α -амилазу. Следовательно, внешний источник этого фермента требуется таким микроорганизмам для гидролиза крахмала и использования его в качестве источника углерода. Бактерия *H. mediterranei* с ферментативным экстрадированным крахмалом давала выход биомассы 1,14 г / л с накоплением ПГА 43% (вес / вес). Картофельный крахмал, как единственный источник углерода, представлял собой хорошие условия культивирования для бактериального штамма *Ralstonia eutropha* NCIM 5149, а общая клеточная биомасса составила 179 г / л с содержанием ПГА до 55% (мас. / мас.)

Сахарная патока как источник углерода

Сульфурированная и не сульфированная патока - это два типа патоки, которые представляют собой вязкие побочные продукты экстракции сахарного тростника с добавлением или бездобавления диоксида серы в качестве стабилизатора. В патоке сахарного тростника содержится сахароза, глюкоза, фруктоза в дополнение к железу, магнию, кальцию, калий и витамины, включая В7, все из которых подходят для роста бактериальных клеток. До 6,0 г / л составил выход ПГА, при культивировании, в условиях, когда патока сахарного тростника была использована в качестве источника углерода. При накоплении ПГА с использованием патоки сахарного тростника, с более низким рН, происходит процесс брожения с образованием масляной и валериановых кислот, в то время как при более высоком рН, образуется уксусная и пропионовая кислоты – они являются основными продуктами. Высокая концентрация аммиака имела негативное влияние на накопление ПГА. *L. fluorescens* A2a5, при выращивании на дешевой ликворной среде сахарного тростника. Выход ПГА составил до 70% (мас. / мас.), таким образом, была значительно снижена стоимость производства ПГА.

Поиск экономически выгодного субстрата для синтеза ПГА, одно из приоритетных направлений современных мировых исследований.

Для получения ПГА возможно привлечение разнообразных субстратов. Среди известных – индивидуальные соединения (углекислый газ и водород, сахара, спирты, органические кислоты), отходы спиртовой, сахарной, гидролизной промышленности, производства оливкового и пальмового масла и др., а также необычные субстраты, включая токсичные (октан) [2].

К основным проверенным и используемым субстратам относят: углеводы: глюкоза, сахароза, декстроза, фруктоза; спирты- метанол, этанол, а так же уксусная кислота, водород, тростниковый сахар, меласса, молочная сыворотка.

Лучшими субстратами для производства полимера являются меласса и тростниковый сахар.

Наиболее эффективно и выгодно применение возобновляемых углеродных субстратов. Это не только экологически чисто, но еще и дешево. Потенциальные источники углеводов – растительные масла и жирные кислоты, а так же отходы пищевой промышленности богатые жирами. Преимущества данных субстратов в отличии от традиционных сахаров в более низкой стоимости.

В частности олеиновая кислота является наиболее перспективным субстратом для синтеза полимера. Применение олеиновой кислоты в качестве дополнительного источника углерода у штамма *R.eutropha* DSM 545 приводило к увеличению продукции ПГА. Добавление олеиновой кислоты как вспомогательного субстрата так же приводило к увеличению концентрации биомассы в 2-7 раз по сравнению с ростом на глюкозе у этого же штамма.

При росте на комбинации фруктозы и олеиновой кислоты так же отмечались более высокие выходы биомассы. У штамма *Alcaligenessp* NCIM 5085. Максимальных выход биомассы, а соответственно и полимера при росте на комбинации олеиновой кислоты и фруктозы составил 7.1 г/л и 59% от всей биомассы. Следует отметить, так же, что стоимость ферментов, может привести к увеличению общей стоимости.

1.4 Сополимеры П(ЗГБ/ЗГВ) и П(ЗГБ/4ГБ).

В большинстве случаев бактерии производят ПГБ. Также во многих случаях короткоцепочечные цепи (scf) ПГА-сополимеры синтезируются в составе C3и C5 в том числе поли [(R) -3-гидроксипропионат-со- (R) -3-гидроксibuтират], поли [(R) -3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират], поли [(R) -3-гидроксibuтират-со- (R) -3-гидроксивалерат] и поли [(R) -3-гидроксibuтирата-со (R) -3-гидроксивалерат-со-4-гидроксibuтират]

Многие виды *Pseudomonas spp.* способны накапливать mcl ПГАсополимеры, содержащие C6–C12 мономеры. Типичными mcl ПГА являются поли [(R) -3-гидроксигексаноат-со- (R) -3-гидроксиоктаноат-со- (R) -3-гидроксидеканоат] и поли [(R) -3-гидроксигексаноат-со- (R) -3-гидроксиоктаноат-со- (R) -3-гидроксидеканоат- (R) -3-гидроксидодеканоат].

В последнее время учеными, в лабораториях, удалось получить поли [(R) -3-гидроксидеканоат- (R) -3-гидроксидодеканоат]

Сополимеры scl и mcl ПГА обладают многими полезными свойствами, так же они достаточно гибкие.

Блок-сополимер ПГА синтезировали ПГА-содержащие блок-сополимеры в *Cupriavidus necator* (также называемый *R. eutropha*) с использованием периодического добавления субстрата. ПГБ сегменты пластмассы, полностью синтезированные бактериями.

Импульсная подача пентановой кислоты привела к синтез (R) -3-гидроксивалератных (3HV) мономеров, образующих случайные ПГБ сополимеры.

Полигидроксибутират (ПГБ) впервые был описан еще в 1926 году. В суспензии *Bacillus megaterium* в анаэробных условиях была обнаружена р-гидроксимасляная кислота. Источником ее появления был определен ПГБ.С конца 50-х годов XX века, исследователи стали проявлять большой интерес к ПГБ. Начали активно изучаться его некоторые физическо- химические свойства, а так же, влияние различных методов экстракции ПГБ на молекулярную массу полимера. Не менее интересным оказалось открытие кристаллической структуры ПГБ, морфологии и свойств гранул. Все больше знаний накапливалось о методах качественного и количественного определения ПГБ, а также об аспектах, связанных с биосинтезом и деградацией этого полимера. Долгое время ПГБ оставался единственным известным бактериальным ПГА.

В настоящее время известны уже более 150 сополимеров этого класса. Свойства каждого ПГА варьируются в широких пределах от характерных для

жестких термопластов с высокой степенью кристалличности до эластичных материалов и даже мягких липких композиций. Все чаще появляются новые сополимеры и модификации различных ПГА.

Наиболее широкому распространению и изучению подверглись ПГБ и полигидроксивалериат (ПГВ — второй гомолог ряда), а также их сополимеры различного состава. Молекулярную массу ПГА можно варьировать в широком интервале, изменяя концентрацию источников углерода и рН в среде роста микроорганизмов, а также используя различные микроорганизмы. ПГБ — биологический полимер, который накапливается бактериями, и представляет собой запасное питательное вещество клетки. Высокая способность биodeградировать под воздействием различных микроорганизмов, определяется его естественным происхождением. Несомненным преимуществом полимера станет его способность синтезироваться из любых отходов сахарного производства, а так же на различных комбинированных субстратах, к примеру фруктоза и олеиновая кислота.

До сегодняшнего дня процесс получения биологического полимера всё ещё значительно дорогостоящий процесс, но в перспективе, беря во внимание всемирный нефтяной кризис, материал, получаемый из воспроизводимого сырья, очень выгодно отличается от полимеров, синтезируемых из производных нефти.

Все же, несмотря на дороговизну, ряд зарубежных фирм производят полигидроксibuтират, полигидроксивалериат и их сополимеры методом ферментативного синтеза по сей день.

В России ПГБ промышленным образом не производится, ведутся лишь лабораторные исследования в институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино, Институте биосинтеза им. А. Н. Баха РАН в Москве, в Институте биофизики РАН в г. Красноярске. Поскольку ПГБ, произведенный с помощью биотехнологий, в лабораторных условиях можно

получать в исключительно чистом виде, именно такой полимер используется как модельная система в фундаментальных исследованиях. Давно хорошо изучены структура, физические и механические свойства ПГБ и его сополимеров.

Установлено, что ПГБ является полимером с высокой степенью кристалличности (60—80%), температурой плавления около 180С и температурой стеклования от 0 до +6С. Энтальпия плавления составляет 146 кДж/кг [10]. Чистый ПГБ имеет плотность аморфных областей $\rho_a = 1,17$ г/см³ и плотность кристаллитов $\rho_k = 1,26$ г/см³. ПГБ хорошо растворяется в ряде растворителей, таких как хлороформ, метиленхлорид, дихлорметан, ли-, три-, тетрачлоретан, дихлорацетат, уксусный ангидрид, диметилформаид, уксусная кислота, спирты с числом атомов углерода более трёх. Не столь хорошими, но всё же растворителями для него являются диоксан, толуол, октанол и пиридин. Кристаллическая структура ПГБ идентифицирована методами рентгеноструктурного анализа.

При помощи конформационного анализа было показано, что молекулы природного ПГБ представляют собой левозакрученную спираль, что связано с его 100% изотаксичностью. Типичные размеры кристаллитов ПГБ, по литературным данным, составляют 5—15 нм. При комнатной температуре ПГБ являются довольно хрупкими веществами. Кристаллическая структура ПГБ была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа ориентированных в пространстве фибрилл. С его помощью были обнаружены повторяющиеся вдоль полимерной цепи структуры с шагом 0,596 нм, соответствующие длине двух кислотных остатков. Они оказываются, упакованы в орторомбическую ячейку с размерами 0:576 нм × 1:320 нм × 0.596 нм. Исходя из конформационного анализа, основанного на расчетах внутримолекулярной энергии, было установлено, что молекулы ПГБ имеют левозакрученную 21-спиральную конформацию.[11] Рядом исследователей при изучении одиночных кристаллов ПГБ была показана структура полимера, в

которой цепь укладывается примерно по 10 звеньев в специальные структуры – ламели. Однако в то время как монокристаллы полимера, складываясь, образуют монокристаллическую систему, реальные полимерные объекты, такие как пленки, изделия и др. образуют мультиламеллярные кристаллы, складывающиеся в сферолиты, в которых эти кристаллы укладываются в радиальные стеки. Все это говорит нам о том, что данный тип биополимеров имеет сложную пространственную укладку, что задает большинство его физико-механических свойств.

Молекулярная масса синтезируемого полимера колеблется от 10 до 3000 кДа с индексом полидисперсности около 1. Температура стеклования ПГБ около 4 °С, в то время, как температура плавления колеблется в районе значения 180 °С, что было определено калориметрическим методом. Плотность аморфного и кристаллического ПГБ составляет, соответственно 1,26 г/см³ и 1,18 г/см³.

Модуль Юнга составляет примерно 3,5 ГПа, а предел прочности на разрыв – 43 МПа. При этом растяжение на разрыв составляет всего 5%, что говорит нам о том, что ПГБ – это довольно жесткий и хрупкий материал. Такие механические свойства не всегда подходят для решения задач, связанных с использованием каркасных полимерных структур для создания имплантов. Поэтому было проведено множество работ, направленных на выяснение природы хрупкости ПГБ, а также путей изменения его физико-механических свойств. Одним из наиболее эффективных подходов по изменению механических свойств является создание сополимеров, например с 3-оксипальмитиновой, 4-оксипальмитиновой или 3-оксигексановой кислотой.

Также сильное влияние на механические свойства оказывает молекулярная масса полимера: например, предел прочности на разрыв начинает резко снижаться при снижении молекулярной массы ниже порогового значения в районе 100 кДа.

Также одним из наиболее важных свойств полимера является его гидрофобность. Она влияет на взаимодействие полимера с внутренней средой организма при имплантации. Биосовместимость данного полимера, также является не менее важным параметром, например при разработке систем доставки лекарств.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования являлся природный штамм *Cupriavidus sp.*, выделенный из агрогенно-преобразованной полевой почвы (поселок Минуно, Сибирский регион, Красноярский край, Россия).

2.2 Процесс культивирования и измерение параметров процесса

Выращивание бактерий проводили на солевой среде Шлегеля: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025, NH_4Cl – 1, 0 (г/л). Микроэлементы вносили в среду из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 0,228, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008, $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05, NiCl – 0,008 (г/л).

При автотрофном культивировании в качестве основного ростового субстрата использовали газовую смесь в соотношении $\text{CO}_2:\text{O}_2:\text{H}_2 = 1:2:7$ по объёму, которая из металлических газгольдеров объемом 50 л под небольшим избыточным давлением поступала в колбы, размещенные в шейкере-инкубаторе «IncubatorShakerInnova®» серии 44 («NewBrunswickScientific», США). При гетеротрофном культивировании в качестве источника углерода и энергии использовали кристаллическую глюкозу (Китай) или фруктозу (EU).

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5 л с коэффициентом заполнения от 0,2 до 0,4 при 30 °С и 200 об/мин. (Рис.3). Для образования мономеров 3-гидроксивалерата (ЗГВ) при синтезе сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ) в состав среды на 24 ч культивирования вносили валерат натрия в концентрации 1 г/л, являющийся субстратом-предшественником мономеров ЗГВ («AcrosOrganics», США).



Рисунок 3. - Фото шейкеров-инкубаторов «Incubator Shaker Innova 44 для культивирования бактерий в колбах

В ходе экспериментов периодически отбирали пробы бактериальной культуры и измеряли их оптическую плотность на спектрофотометре при разведении культуры дистиллированной водой 1:5 и $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм).

Концентрацию биомассы бактерий регистрировали весовым способом. Для этого 20 мл бактериальной суспензии центрифугировали 10 минут на центрифуге («Eppendorf», Германия) при 6000 об/мин. Далее клетки бактерий отмывали от солей дистиллированной водой (дважды) и снова центрифугировали. Бактериальные клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса в эксикаторе. Бюксы сушили в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при температуре 105 °С в течение 24 ч, охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах (Mettler Toledo, Швейцария). Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса с клетками и весом пустого бюкса.

Определение концентрации глюкозы в культуральной среде проводили с использованием глюкозооксидазного метода, применяя набор реагентов «Глюкоза – ФКД» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия). В комплект набора входят раствор глюкозы с известной концентрацией

- 10 ммоль/л – калибратор и ферментно–хромогенная смесь (1 таблетку растворяли в 100 мл дистиллированной воды). Для измерения концентрации глюкозы в среде к 1 мл надосадочной жидкости добавляли 4 мл дистиллированной воды. Далее в три пробирки вносили по 2 мл ферментно-хромогенной смеси, а потом в первую пробирку вносили 40 мкл дистиллированной воды, во вторую пробирку – 40 мкл калибратора, в третью пробирку – 40 мкл разведённой надосадочной жидкости. Пробирки оставляли при комнатной температуре на 25 минут. Полученный окрашенный продукт измеряли на спектрофотометре при длине волны 490 нм в кюветах с длиной оптического пути 5 мм, сравнивая оптическую плотность рабочей и калибровочной проб против холостой пробы. Концентрацию глюкозы вычисляли по формуле:

$$C = (E_0 / E_k) \times 10,$$

Где С – концентрация глюкозы, ммоль/л;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы;

10 – концентрация глюкозы в калибраторе, ммоль/л.

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого супернатант разводили в 50 раз. Далее 1мл пробы наливали в пробирку и добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (100мг резорцина растворяли в 100 мл 95%-ного этилового спирта) и 3 мл раствора соляная кислота:дистиллированная вода (5:1). В качестве контроля использовали раствор следующего состава: 1 мл дистиллированной воды, 1 мл спиртового раствора резорцина и 3 мл раствора соляной кислоты и дистиллированной воды. Пробирки с контролем и пробой помещали в водяную баню ($t=80^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. По истечении этого времени контроль и пробу охлаждали до комнатной температуры. Концентрацию фруктозы измеряли на спектрофотометре UNICO 2100в кюветах с длиной оптического пути 5 мм при длине волны 540 нм. Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику.

2.3 Исследование содержания и состава ПГА

Внутриклеточное содержание сополимера в клетках и его состав определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A с масс детектором Agilent Technologies 5975C («Agilent», США). Метанолиз проб проводили следующим образом: к навеске сухой биомассы (4,0-4,5 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 ч 40 мин на водяной бане при температуре 80 °С. По окончании метанолиза добавляли 1 мл дистиллированной воды. При этом происходило разделение жидкостей. Нижний хлороформенный слой использовали для анализа.

2.4 Определение молекулярной массы полимера

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяли с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов AgilentPS-HEasiVial. Находили средневесовую (M_B) и среднечисловую (M_C) молекулярную массу, а также полидисперсность (ПД), растворяя образцы сополимерных ПГА навеской 10-12 мг в 2 мл хлороформа с дальнейшей их фильтрацией.

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости, вычисляли из соотношения:

$$\text{ПД} = M_B / M_C$$

Идентификация штамма с использованием общепринятых методов на основании культуральных, морфологических признаков и стандартных биохимических тестов

Морфологию бактериальных клеток изучали в мазках по Граму. Микрофотографии получены с применением цифровой камеры *DSC-W100* («Sony», Япония). Идентификацию штамма проводили общепринятыми методами на основании культуральных, морфологических признаков и стандартных биохимических тестов, приведенных в определителях. [34]

Для определения каталазной активности клетки бактерий с помощью бактериальной культур перенесли на предметное стекло. Поместили одну каплю 3%-ного раствора перекиси водорода на материал расположенный на стекле. Положительная реакция проявлялась быстрым появлением пузырьков газа. При отрицательной реакции в течении 20 секунд выделение пузырьков не происходило.

Способность восстанавливать нитраты у исследуемого штамма изучали на среде Абдельмалека, которая имеет следующий состав(г/л): МПБ(бульон-15.0, пептон-10.0), глюкоза-1.0, KNO_3 - 1.0, агар- 0.3. Растворили МПБ, глюкозу и KNO_3 довели рН до 7.0. Внесли агар, расплавили, разлили в пробирки по 10 мл. Засев проводили уколом, после чего заливали голодным агаром. Посев описывали через 6 дней. Отмечали наличие роста по уколу и наличие полостей между средой и столбиком голодного агара.

Для выявления амилолитической активности использовали среду следующего состава(г/л): пептон – 10.0; KH_2PO_4 -5.0; растворимый крахмал – 2.0; агар – 15.0; рН среды 6,8-7.0. Среду стерилизовали при 1ати и разлили в стерильные чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования составила 7 суток, при температуре 33⁰С. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой поверхности раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливали 3-5 мл раствора Люголя, после чего среда окрашивалась в синий цвет, а зоны гидролиза крахмала приобретали красно-бурую окраску.

Протеолитическую активность изучали путем посева исследуемой культуры на мясопептонную желатину. К 100 мл МПБ добавили 15 г желатины, оставили на 15 минут, что бы она набухла, затем нагрели на водяной бане до

полного растворения желатины и разлили в пробирки по 10 мл. Посев проводили уколом. Продолжительность культивирования 10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечали визуально.

Потребность в факторах роста исследуемых культур изучали на среде Фратера, состав (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1.0; K_2HPO_4 -0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0.25; глюкоза-10.0; водопроводная вода; pH 6.0-7.0. Приготовили среду, разлили в пробирки по 7мл. Культивировали в течении семи дней при температуре 33°C. Визуально отмечали рост колоний в виде пленки, способность после посева с богатой среды адаптироваться к новым условиям.

Оксидазную активность выделенных изолятов бактерий определяли с помощью окситеста (MIKRO-LA-TEST).

Способность исследуемых культур ферментировать углеводы изучали на универсальных средах Гисса. В состав этих сред входят: панкреатический гидролизат кильки, индикатор различных углеводов (глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, манит). Среду готовили следующим образом – 15 грамм препарата размешивали в одном литре воды дистиллированной, кипятили до полного растворения. Разливали в стерильные пробирки, стерилизовали в автоклаве при температуре 110°C в течении 20 минут. Засев проводили уколом, культивировали в течении 3 дней. Визуально отмечали образование газа и кислоты.

2.5 Идентификация штамма

Для идентификации исследуемого штамма применяли молекулярно-генетические методы. ДНК выделяли с использованием набора реактивов *AquaPure Genomic DNA Isolation* («Bio-Rad», США) по рекомендованному производителем протоколу. Ген 16S рРНК бактерий амплифицировали с использованием универсальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), соответствующих позициям 8-27 и 1510-1492 *Escherichia coli*, соответственно. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе *Mastercycler Gradient* («Eppendorf», Германия) в общем объеме

50 мкл, содержащем 50-100 нг ДНК-матрицы, 1х реакционного буфера, 0,3 мкМ каждого праймера, 0,2 мкМ каждого дНТФ, 2 мкМ MgSO₄ и 1 ед. высокоточной *Platinum Taq* полимеразы («Invitrogen», США), в следующем режиме: первичная денатурация 95 °С – 3 мин.; 25 циклов: 94 °С – 30 сек., 55 °С – 40 сек., 68 °С – 1 мин. 30 сек.; финальная элонгация 68 °С – 10 мин. Размер, количество и чистоту ПЦР продуктов проверяли электрофорезом в 1,5 %-ном агарозном геле с использованием 0,5 %-ного TAE буфера. Визуализацию проводили окрашиванием бромистым этидием с последующим документированием на трансиллюминаторе *Doc Print* («Vilber Lourmat», Франция).

Для получения качественных сиквенсов неочищенные ПЦР продукты клонировали в векторе *pCR4-TOPO*(«Invitrogen», США), которым трансформировали клетки *E. coli* TOP10. Полученные клоны проверяли рестрикционным анализом на наличие в векторе вставки нужного размера. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора *PureLink Quick Plasmid Miniprep* («Invitrogen», США) по рекомендованному производителем протоколу. Секвенирование выполнено в двух направлениях на автоматическом ДНК анализаторе *ALFexpress II* («Amersham Pharmacia Biotech Ltd.», США) с использованием универсальных праймеров T3 и T7 и набора *Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator*. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями баз данных GenBank, EMBL и DDBJ с помощью программы поиска высокоомологичных последовательностей BLAST веб-ресурса NCBI[35].

Для филогенетического анализа нуклеотидные последовательности были выровнены с наиболее гомологичными последовательностями культивируемых штаммов из баз данных с использованием программы *ClustalW*, версия 1.81. Филогенетический анализ выполнен по однопараметрической модели Джукеса и Кантора с использованием метода максимального сходства в пакете программ *MEGA*, версия X. Статистическую достоверность порядка ветвления определяли

на основе «*bootstrap*» – анализа путем построения 500 альтернативных деревьев.

2.6 Определение жирнокислотного состава липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов

Выделение липидов производили из сырой биомассы бактерий смесью хлороформа с этанолом (2:1) по методу Фолча. Экстракт, содержащий липиды и полимер, отделяли от биомассы фильтрованием в колбы. Растворитель отгоняли на роторном испарителе при $t=45^{\circ}\text{C}$. Далее полигидроксиалканоаты отделяли от липидов. Для этого экстракт растворяли в 5 мл дихлорметана и добавляли двойной объем (10 мл) гексана. Полимер выпадал в осадок в виде хлопьев, которые отделяли от липидов фильтрованием. Выделенный полимер взвешивали. Смесью растворителей с липидами (внутриклеточные липиды) собирали во взвешенную колбу, растворитель отгоняли на роторном испарителе при $t=45^{\circ}\text{C}$. Колбы с липидами помещали в эксикатор. После доведения липидов до постоянного веса их опять взвешивали и по разности определяли содержание внутриклеточных липидов в сухой биомассе. Биомассу, содержащую прочносвязанные липиды (липополисахариды), помещали в колбу, добавляли 1-2 мл спиртового раствора щелочи (1,2 г NaOH в 3 мл дистиллированной воды и доводили до 10 мл этанолом) и помещали на водяную баню при температуре 80°C с обратным холодильником на 2 ч. По истечении этого времени добавляли двойной объем дистиллированной воды, подкисляли серной кислотой до $\text{pH}=2-3$ и 1 мл гексана. Далее содержимое переносили в делительную воронку и экстрагировали липиды гексаном (3 раза). Гексановый слой пропускали через безводный сернокислый натрий и растворитель удаляли при использовании роторного испарителя. Для получения метиловых эфиров жирных кислот к липидам добавляли 1 мл смеси метанол: концентрированная серная кислота (19:1) и 1-2 капли бензола. Липиды поместили на водяную баню при температуре 80°C с обратным холодильником на 2 ч. По окончании процесса сняли колбы, добавили 1 мл дистиллированной

воды и 2 мл гексана. Затем перелили смесь в делительную воронку, добавили 10 мл дистиллированной воды, слили из воронки нижний водный слой, повторно добавили и слили 10 мл дистиллированной воды. Верхний слой, состоящий из гексана с растворенными метиловыми эфирами ЖК, пропустили через слой Na_2SO_4 в грушевидную колбу, затем испарили гексан на роторном испарителе. Готовые метиловые эфиры ЖК хранили в морозильной камере непосредственно до проведения газовой хроматографии.

Результаты исследования

1. Исследованы культурально-физиологические особенности нового штамма, выделенного из почвы, и выполнен молекулярно-генетический анализ на основании 16s РНК, что позволило отнести исследуемый штамм к р. *Cupriavidus*.

2. Исследован рост нового штамма *Cupriavidus* sp. в автотрофных и гетеротрофных условиях (субстраты – фруктоза и глюкоза). Показано, что исследуемый штамм способен расти в автотрофных условиях и накапливать полимер до 55% за 120 ч культивирования. Более высокое накопление биомассы и полимера отмечено в гетеротрофных условиях роста. К концу культивирования концентрация биомассы и содержание полимера составляли соответственно 7,5-7,8 г/л и 80-85%.

3. Исследован жирнокислотный состав липидов цитоплазматической мембраны и липополисахаридов *Cupriavidus* sp., культивируемого на глюкозе и фруктозе. Показано, что в начале культивирования бактерией основными жирными кислотами липидов цитоплазматической мембраны были насыщенная пальмитиновая и моноеновые пальмитолеиновая и цис-вакценовая кислоты. К концу культивирования произошло снижение моноеновых кислот и увеличение циклопропановых жирных кислот. Жирнокислотный состав липополисахаридов значительно отличался от липидов цитоплазматической мембраны, в составе которых основными кислотами были миристиновая кислота и 3-гидроксимиристиновая кислота.

4. Показана способность исследуемого штамма синтезировать сополимеры с 3-гидроксивалератом и 4-гидроксибутиратом при росте на сахарах с добавлением соответственно валерата калия и капролактона. Показано, что в конце культивирования (72 ч) содержание 3ГВ и 4ГБ составляло соответственно 21-22 и 14-15 мол.%

Выводы

1. Исследуемый штамм бактерий выделен из почвы и на основании генетического анализа и физико-культуральных свойств определен как *Cupriavidus necator*

2. Данный штамм синтезируется с высоким содержанием биомассы и полимера на субстратах глюкозы и фруктозы, а так же в автотрофных условиях. Определен состав полярных липидов и липополисахаридов

3. Доказано, что данный штамм может синтезировать сополимеры 4-гидроксибутират и 3-гидроксивалерат

Заключение

Биоразлагаемые полимеры постепенно внедряются во многие сферы нашей повседневной жизни. Они «наступают на пятки» синтетическим пластикам, и не удивительно их превосходство над ними.

Несмотря на их большое количество положительных сторон, нет оснований полагать, что в ближайшем будущем они смогут стать чем-то большим, чем материалы, занимающие только небольшой сегмент общего рынка пластмассовых материалов. Конечно же, это связано в первую очередь с дорогостоящим и трудоемким процессом культивирования продуцентов этих полимеров. Тем не менее, растущая экологическая озабоченность потребителей, и правительственная политика, которая поощряет сохранение природных ресурсов, стимулируют рост продаж биоразлагаемых полимеров. Основная задача современного научного сообщества это ежедневная подпитка интереса, поддержания массовой идеи, того что это такие технологии действительно нужны и полезны. Полезно для каждого человека в частности и для будущего нашей «здоровой» планеты. На практике же, конечно необходимы и дешевые субстраты и неприхотливые, дающие большой выход полимера, продуценты. Слаженная работа научного сообщества и правительственных сил, даст шанс нашей планете не погрязнуть в горах мусора, а медицине сделать огромный шаг в совершенствовании многих методов лечения и диагностики.

Список литературных источников

1. Plastic from Bacteria, 2010; Laycock et al., 2013; Tan et al., 2014; Saharan et al., 2014; Shankar et al., 2015; Rebouillat, Pla, 2016; Koller et al., 2017; Kourmentza et al., 2017.
2. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh., H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci. - 2000.- C.1503-1555.)
3. Riedel, SL Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations/ SL Riedel, J Bader, CJ Brigham, CF Budde, ZA Yusof, C Rha, AJ Sinskey// Biotechnol Bioeng. - 2012. – p.74–83.
4. Rodríguez-Contreras, A. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderias acchari*. / A. Rodríguez- 136 Contreras, M. Koller, M.M. de Sousa Dias, M.Calafell-Monfort, G.Braunegg, M.S. Marqués-Calvo //Biochem. Eng. J. - 2015.- p. 50–57.
5. Saharan, B. S. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments/B. S. Saharan, A. Grewal, P. Kumar //Chinese Journal of Biology. -2014.- 18 p.
6. Sato, S. Regulation of 3-hydroxyhexanoate composition in PHBH synthesized by recombinant *Cupriavidus necator* H16 from plant oil by using butyrate as a cosubstrate/ S. Sato, H. Maruyama, T. Fujiki, K. Matsumoto// J.Biosci. Bioeng, 2015. – p. 246–251.
7. Serafim, L. S. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials /L. S. Serafim, P. C. Lemos, M. G. E. Albuquerque, and M. A. M. 137 Reis //Applied Microbiology and Biotechnology. - 2008. - vol. 81, no. 4, p. 615– 628.
8. Shankar, Aditi Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from novel sources/ Aditi Shankar, Shalet D'Souza, Manish

Narvekar, Pranesh Rao, Katyayini Tembadmani //International Journal of Research in Biosciences. -October 2015.- Vol. 4 Issue 4.- p. 16-28.

9. Albuquerque, M. G. E. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties/ M. G. E. Albuquerque, V. Martino, E. Pollet, L. Av´erous, and M. A. M. Reis //Journal of Biotechnology. - 2011.-vol. 151.- №. 1, p. 66–76.

10. Anterrieu, S. Integration of biopolymer production with process water treatment at a sugar factory/ L. Quadri, B. Geurkink, I. Dinkla, S. Bengtsson, M. ArcosHernandez, T. Alexandersson, F. Morgan-Sagastume, A. Karlsson, M. Hjort // New Biotechnol. - 2014. - p. 308–323. 6. Antonio, R. V. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli* / R. V. Antonio, A. Steinbüchel, B.H.A. Rehm// FEMS Microbiol. Lett. . -2000. - p.111–117.

11. Gumel et al., 2012; Riedel et al., 2012; Saharan et al., 2014; Tan et al., 2014; Shankar et al., 2015; Koller et al., 2010; 2017; Kourmentza et al., 2017; Sabbagha, Muhamada,2017; Kootstra et al., 2017.

12. Sudesh K, Iwata T, Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean – Soil, Air, Water* 2008;36:433-442.

13. Snell KD, Peoples OP. PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries. *Biofuels, Bioproduct and Biorefining*2009;3;456-467

14. Wallen LL, Rohwedder WK. Poly-b-hydroxyalkanoate from activated sludge. *Environmental Science and Technology* 1974;8;576-579.

15. Sudesh K, Iwata T. Sustainability of biobased and biodegradable plastics. *Clean-Soil, Air, Water* 2008;36:433-442.

16. Snell KD, Peoples OP. PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2009;3:456-467.

17. Steinbüchel A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience* 2001;1:1-24.

18. Albuquerque MGE, Eiroa M, Torres C, Nunes BR, Reis MAM. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *Journal of Biotechnology* 2007;130:411-421.

19. Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999;63:21-53.

20. Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1988;170:5837-5847

21. Schubert P, Steinbüchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1988;170:5837-5847

22. Yu I, Stahl H, Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology* 2008;99:8042-8048

23. Волова Т.Г. Влияние экстремальных температур на метаболизм водородокисляющих бактерий. /Волова Т.Г., Трубочев

И.Н., Калачева Г.С., Барашков В.А. // Микробиология. -1982. -51, в.3. - С.386-391.

24. Барашков В.А. К вопросу комплексного использования бактериальной биомассы. / Барашков В.А., Калачева Г.С. // Сибирский экологический журнал. -1997. -5. -С.533-536

25. Волова Т.Г. Получение и исследование микробных гетерополимерных полиоксиалканоатов. / Волова Т.Г., Беляева О.Г., академик Гительзон И.И., Калачева Г.С., Плотников В.Ф., Луковенко С.Г. // Докл.АН. -1996. -347. -С.256-258.

26. Волова Т.Г. Исследование разрушаемости микробных полиоксиалканоатов. / Волова Т.Г., Беляева О.Г., Калачева Г.С., Луковенко С.Г. // Сибирский экологический журнал. -1997, №5. -С.505-510

27. Шишацкая Е.И. Гигиеническая оценка полиоксиалканоатов – природных полиэфиров нового поколения. / Шишацкая Е.И., Есимбекова Е.Н., Волова Т.Г., Калачева Г.С., Кратасюк В.А. //Гигиена и санитария. -2002, №4. -С.59-63.

28. Волова Т.Г. Динамика активности ферментов клеточного цикла полигидроксиалканоатов у *Ralstoniaeutropha*. / Калачева Г.С., Горбунова О.В., Жила Н.О. // Прикладная биохимия и микробиология. - 2004. -40, в. 2. -С.170-177.

29. Волова Т.Г. Синтез сополимеров гидроксибутирата и гидроксивалерата [поли(2ГБ/3ГВ)] бактериями *Ralstoniaeutropha*. / Волова Т.Г., Калачева Г.С. // Микробиология. -2005. -74, № 1. -С.1-7.

30. Волова Т.Г. Опытное производство биоразрушаемых полимеров. / Волова Т.Г., Войнов Н.А., Муратов В.С., Бубнов Н.В., Гурулев К.В., Калачева Г.С., Горбунова Н.В. Плотников В.Ф. Жила Н.О. Шишацкая Е.И. Беляева О.Г. Кожевников И.В. // Биотехнология. - 2006, №6. -С.28-34.

31. Volova T.G. Physiological-biochemical properties and the ability to synthesize polyhydroxyalkanoates of the glucose-utilizing strain of the hydrogen bacterium *Ralstonia eutropha* B8562. /Volova T.G., Trusova M.Y., Kalacheva G.S., Kozhevnicov I.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. -2006. -73. -P.429-433.
32. Zhila N. Synthesis of biodegradable polymers (polyhydroxyalkanoates) of given structure by *Ralstonia eutropha*. / Zhila N., Kalacheva G., Volova T. // New biotechnology. -2009. -25. -P.254-255.
33. Волова Т.Г. Синтез сополимеров 3-гидроксипропионата-со-4-гидроксипропионата водородокисляющими бактериями / Волова Т.Г., Жила Н.О., Калачева Г.С., Соколенко В.А., Сински Э.Дж. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. –47, № 5. – С. 544–550.
34. Волова Т., Севастьянов Е., Шишацкая Е., Полиоксиалканоаты – биоразрушаемые полимеры для медицины (под ред. Академика В. И. Шумакова). // 2-е издание допол. и переработ.- Красноярск.- Изд-во группа компаний «Платина»-2006.-С.288.
35. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria 1997, 2005, 2009.36.36

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

Фундаментальной биологии и биотехнологии

институт
Базовая кафедра биотехнологии

кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

Волова Т.Г.

фамилия подпись

« 5 » июля 20 19г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ


Характеристика нового штамма *Cupriavidis sp.*, синтезирующего
полигидроксиалканоаты

06.04.01. биология

06.04.01. 00. 01 Микробиология и биотехнология

код и наименование магистерской программы


Научный руководитель

 к.б.н., доцент Жила Н.О.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник

 Колкова А.А.
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент

 к.б.н., с.н.с. Трусова М.Ю.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2019 г.