

Министерство науки и высшего образования РФ
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

Синтез полигидроксиалканоатов с использованием гидролизатов
топинамбура в качестве С-субстрата

Руководитель _____
подпись, дата

доцент, канд. техн. наук—
должность, ученая степень

Е.Г.Киселёв
инициалы, фамилия

Выпускник _____
подпись, дата

А.А.Будник
инициалы, фамилия

Красноярск 2022

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Синтез полигидроксиалканоатов с использованием гидролизатов топинамбура в качестве С-субстрата» содержит 40 страниц текстового документа, 32 использованных источника, 5 таблиц и 16 рисунков.

Ключевые слова: *CUPRIAVIDUS NECATOR*, ФРУКТОЗА, ГЛЮКОЗА, ПГА, ГИДРОЛИЗАТЫ ИЗ ТОПИНАМБУРА

Цель работы: оценить использование биомассы топинамбура (*Helianthus tuberosus*) в качестве углеродного субстрата для биосинтеза ПГА. Для достижения поставленной цели реализовались следующие задачи:

1. Получить гидролизаты из клубней и вегетативной части топинамбура и оценить возможность их использования в качестве С-субстратов для синтеза ПГА.

2. Исследовать и сравнить продукционные характеристики бактерий штамма *Cupriavidus necator* В-10646 на различных гидролизатах топинамбура, глюкозе и фруктозе.

3. Изучить и сравнить физико-химические свойства образцов ПГА, синтезированных на различных гидролизатах топинамбура, глюкозе и фруктозе.

Актуальность: оценка использования альтернативных субстратов (в данной работе гидролизатов из топинамбура) для синтеза полигидроксиалканоатов – главный вопрос на пути к снижению себестоимости ПГА.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 Литературный обзор	6
1.1 Общая характеристика полигидроксиалканоатов	6
1.1.1 Многообразие полигидроксиалканоатов	7
1.2 Биосинтез ПГА	9
1.3 Источники С-субстрата для синтеза ПГА	10
1.3.1. Химический состав топинамбура	12
1.3.2. Гидролизаты из растительного сырья	14
2. Материалы и методы исследования	16
2.1. Объект исследования	16
2.2. Культивирование бактерий	16
2.3 Анализ проб	17
2.3.1 Измерение оптических показателей культуры	17
2.3.2 Определение сухой биомассы клеток	17
2.3.3 Определение количества клеток	17
2.3.4 Определение концентрации фруктозы	19
2.3.5 Определение концентрации глюкозы	20
2.4 Расчет кинетических параметров роста культуры	21
2.5 Определение процентного содержания полимера в клетках	22
2.6 Выделение полимера	22
2.7 Физико-химические свойства ПГА	23
2.8 Метод наработки опытной партии гидролизата	24
3 Результаты	26
ВЫВОДЫ	36
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	37

ВВЕДЕНИЕ

С увеличением численности населения, возрастает и количество отходов, в том числе и пластиковых изделий всех видов. Ежегодно во всем мире производится около 350 миллион тонн пластмассы, а перерабатывается около 10%.

Синтетические пластмассовые материалы обладают высокой устойчивостью к воздействию температуры, солнечной радиации, воды и микроорганизмов. Но несмотря на огромный список преимуществ из-за широкомасштабного использования пластмасс, полученных из не возобновляемых материалов, быстро сократились запасы сырой нефти и усугубилась экологическая обстановка. Так на свалках скорость деградации пластмассы чрезвычайно низка, а сжигание приводит к образованию токсичных продуктов [1]. Переработка возможна, но это обходится очень дорого. Таким образом, в последнее время ученые активно занимаются разработкой и внедрением пластмасс с использованием возобновляемого сырья, которые способны к биоразлагаемости.

Альтернативной заменой синтетическим полимерам являются биоразлагаемые пластмассы, такие как полигидроксиалканоаты (ПГА), которые производятся микроорганизмами из возобновляемых ресурсов. ПГА более перспективны благодаря присущей им биоразлагаемости, устойчивости и экологическим свойствам. Так ПГА полностью разлагается бактериями в активной микробиологической среде (почва, вода) в течение 6-12 месяцев до углекислого газа, воды и гумуса [2]. Стоимость ПГА в большей степени зависит от сырья, поэтому в настоящее время ученые работают над расширением сырьевой базы. Для этого хорошо подойдет растение топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.)

Цель работы: оценить использование биомассы топинамбура (*Helianthus tuberosus*) в качестве углеродного субстрата для биосинтеза ПГА.

Задачи:

1. Получить гидролизаты из клубней и вегетативной части топинамбура и оценить возможность их использования в качестве С-субстратов для синтеза ПГА.
2. Исследовать и сравнить продукционные характеристики бактерий штамма *Cupriavidus necator* В-10646 на различных гидролизатах топинамбура, глюкозе и фруктозе.
3. Изучить и сравнить физико-химические свойства образцов ПГА, синтезированных на различных субстратах: гидролизаты топинамбура, глюкоза, фруктоза.

1 Литературный обзор

1.1 Общая характеристика полигидроксиалканоатов

На сегодняшний день разработано большое количество биоразлагаемых материалов, которые способны конкурировать с синтетическим пластиком. Одним из таких материалов являются полигидроксиалканоаты (ПГА). Они представляют собой сложные полиэфиры гидроксиалкановых кислот, запасаемые и синтезируемые бактериями в качестве резервного источника углерода и энергии в ответ на экзогенные раздражители или лимитирование питательных веществ (азота, фосфата, кислорода) [3;4]. ПГА в бактериальной клетке накапливается в виде гранул, которые окружены фосфолипидной однослойной мембраной. [5]

На рисунке 1 показаны электро-микроскопические снимки штамма бактерий *C. necator* DSM 545, на которых заметно присутствие внутриклеточных включений ПГА при различных увеличениях. [6]

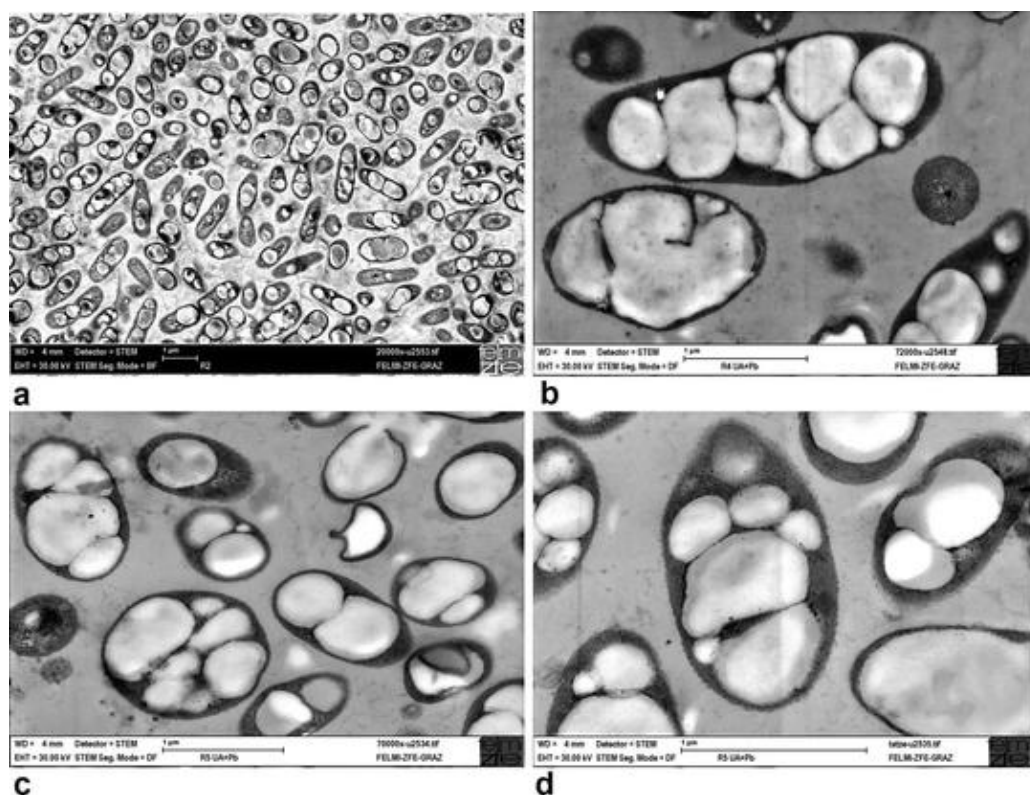


Рисунок 1- Электронно-микроскопические фотографии клеток *Cupriavidus necator* DSM 545, богатых ПГА[6]

На ПГА возложены большие надежды, так как он обладает рядом преимуществ:

- высокая биосовместимость ПГА обусловлено тем, что мономер из которого состоит данный полимер является естественным продуктом метаболизма клеток;

- ПГА не способны растворяться в жидких средах, поскольку деградация данного полимера происходит клеточным и гуморальными путями и является истинно биологической

- наличие широкой базы сырья для синтеза ПГА, к ним относят субстраты 1 поколения (пищевые отходы), 2 поколения (жидкие углеводороды) и субстраты 3 поколения (оксидазы углеводов, газообразные углеводороды, углекислота, водород);

- Кристалличность, механическая прочность, температурные показатели и скорость биораспада- это свойства ПГА, которыми можно управлять в процессе ферментации [7].

Полигидроксиалканоаты имеют огромное количество потенциальных применений это обусловлено их биологической природой. Так ПГА используется в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, радиоэлектронике и фармакологии. Одной из наиболее важных применений материалов, полученных из ПГА, является медицинский сектор, поскольку они биосовместимы. В частности, ПГА очень популярны в тканевой инженерии из-за их антибактериальных и антиоксидантных свойств. [8] [9].

1.1.1 Многообразие полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты классифицируются в зависимости от набора мономеров, которые образуют полимер. Если полимер представлен одним

мономером, то его принято называть гомополимером, в случае наличия различных мономеров говорят о гетерополимерах или сополимерах.

ПГА принято классифицировать в зависимости от длины углеродной цепи, образующей полимер на 3 группы:

1. Короткоцепочечные ПГА_{кц} (short-chain-length, SCL), состоящие углеродной цепи от 3 до 5 углеродных атомов. К ним относят поли (3-гидроксибутират)(ПГБ), и его сополимеры с гидроксивалератом. Поли (3-гидроксибутират) обладает высокой кристалличностью, а изделия на его основе имеют довольно низкую ударную прочность, но его сополимеры поли(3-гидроксибутират) и поли (3-гидроксивалерат) обладают более сниженной степенью кристалличности.

2. Среднецепочечные ПГА_{сц} (medium-chain-length, MCL), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода. К ним относится поли (3-гидроксиоктаноат) продуцирует *Pseudomonas mendocina*. ПГА со средней длиной цепи являются эластомерными, но имеют очень низкую механическую прочность, что ограничивает применение этих ПГА

3. Длинноцепочечные ПГА_{дц} (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот C17 и C18. К ним относится поли (3-гидроксипентадеканоат) производит *Pseudomonas aeruginosa*. [10], [11]

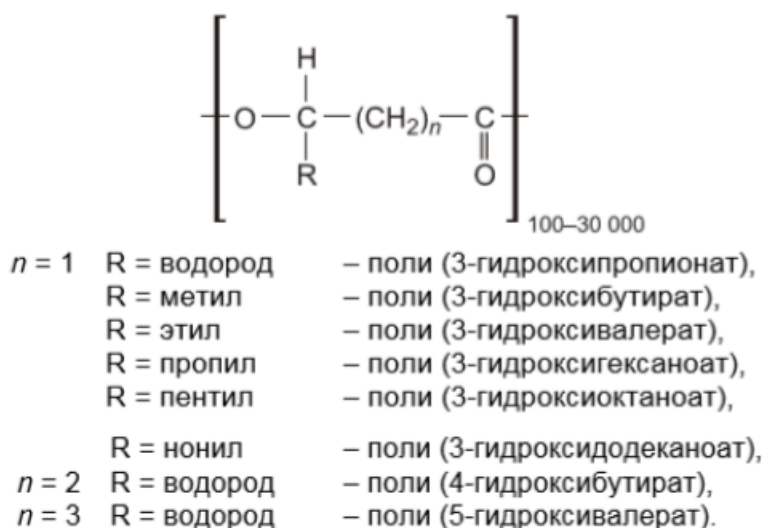


Рисунок 2- Структура полигидроксиалканоатов [12]

Различие между группами главным образом связано с субстратной специфичностью ПГА синтетаз.

1.2 Биосинтез ПГА

Пути биосинтеза ПГА неразрывно связаны с метаболическими путями бактерии, такими как цикл Кребса β -окисление, синтез жирных кислот *de novo*, катаболизм аминокислот, цикл Кальвина и сериновый путь. [13]

Как правило, у бактерий существует три естественных пути биосинтеза ПГА.

- 1 Путь. По этому пути две молекулы ацетил-КоА (из цикла трикарбоновых кислот) конденсируются в молекулу ацетоацетил-КоА с помощью фермента β -кетотиолазы. Затем ацетоацетил-КоА превращается в 3-гидроксибутирил-КоА ферментом НАДФН-ацетоацетил-КоА-редуктазой. После этого молекулы 3-гидроксибутирил-КоА связываются с ПГБ-полимеразой; с последующим действием ПГА-синтазы, которая, наконец, катализирует образование сложноэфирной связи в 3-гидроксибутирил-КоА с образованием поли (3-гидроксибутират).

- 2 Путь. В этом пути субстраты происходят от пути β -окисления жирных кислот, поскольку жирные кислоты являются подходящим источником

углерода для производства ПГА. Метаболизм жирных кислот генерирует различные мономеры гидроксиалканоата под действием (R) -еноил-КоА-гидратазы, ацил-КоА-оксидазы и 3-кетоацил-КоА-редуктазы. Затем фермент ПГА-синтаза катализирует полимеризацию мономеров гидроксиалканоата.

- 3 Путь. Микроорганизмы могут получать из окружающей среды (сточные воды, активный ил, животные жиры, углеводороды) такие источники углерода, как глюкоза, сахароза и лактоза. Начинается все с преобразования (R) -гидроксиацильных промежуточных продуктов из их формы белка-носителя ацила в КоА форма под действием ацил-АСР-КоА трансацетилазы, а затем гидроксиалканоатных мономеров в конечном итоге полимеризуется полимеразой РНА. [11]

Успешный синтез ПГА зависит как от используемого микроорганизма, так и от условий его культивирования. Тем не менее, бактерии, не обладающие ПГА-синтетазой не способны накапливать ПГА. [14]

1.3 Источники С-субстрата для синтеза ПГА

Стоимость ПГА в значительной степени зависит от субстрата, по этой причине они по-прежнему несопоставимы с пластиками на нефтяной основе. Поэтому для сокращения производственных затрат и увеличения коммерческой привлекательности ищут альтернативное углеродное сырье. [15]

Чаще всего в качестве источника углерода используют чистое сырье, состоящее из чистых углеводов (глюкоза, сахароза, мальтоза, крахмал), жирных кислот и их производных, метанола и алканов, но в последнее время все больше сил направлено на изучение комплексных соединений, в том числе отходов различных производств. (Таблица 1)

Таблица 1 – Затраты и стоимость сырья для синтеза ПГА (Madison and Huisman, 1999)

Субстрат	Стоимость субстрата, \$ США/т	Выход полимера, т/т субстрата	Стоимость субстрата \$ США/т
Глюкоза	439	0,38	1300
Сахароза	290	0,40	720
Метанол	180	0,43	420
Этанол	502	0,50	1000
Уксусная кислота	595	0,38	1560
Декстроза	360	0,33	1180
Тростниковый сахар	200	0,33	1180
Меласса	220	0,42	520
Молочная сыворотка	71	0,33	220
Гемицеллюлозные экстракты	69	0,2	340

Для снижения стоимости полимера проводят поиск более дешевых субстратов. Например, можно использовать побочные продукты биодизельного топлива и тогда стоимость продукта снижается до 1,1\$/кг [16]. В настоящее время водород рассматривают как альтернативный субстрат по отношению к сахарам, но возникают сложности в его использовании, связанные с взрывоопасностью и плохой растворимостью газового субстрата. Эффективность биосинтеза ПГА на водороде очень высока, так экономический коэффициент равен 1, что указывает на перспективность данного субстрата. [17].

В качестве потенциальных сахаросодержащих субстратов для биосинтеза ПГА рассматривают гидролизаты различного происхождения. Stanislav Obrusa и коллеги исследовали процесс биосинтеза ПГА бактерией *Burkholderia cepacia* с использованием в качестве субстрата гидролизатов из отработанной кофейной гущи, выход ПГА составил 57 % [18]. Гидролизаты, полученные из бурых

водорослей, имели невысокий выход сахаров 5,9 г/л, при культивировании выход ПГА составил 49% [19]. В другом исследовании использовали лигниноцеллюлозу, полученную из древесины. Путем гидролиза проводили преобразование сахаров, затем использовали в качестве субстрата. Но при использовании гидролизатов из древесины в качестве единственного источника углерода выход ПГА относительно низок. [20]. Индийские ученые проводили исследования биосинтеза ПГА бактериями *Halomonas campisalis* МСМ В-1027 с использованием гидролизатов из кожуры багасса в качестве источника углерода, таким образом, выход ПГА составил 47 % [21]. При изучении использования гидролизатов пшеничной соломы в качестве субстрата для синтеза биополимера, было получено накопление ПГА 74% [22] и др.

Результаты исследований свидетельствуют о перспективе использования растительных гидролизатов для продуктивных процессов биосинтеза биопластика. На спектр и содержание сахаров, а также количество примесей гидролизатов влияют способ и условия гидролиза. Как правило, в состав гидролизатов, кроме глюкозы и фруктозы, входят такие сахара, как галактоза, манноза (продукты гидролиза гексоз), арабиноза, ксилоза (продукты гидролиза пентоз).

1.3.1. Химический состав топинамбура

Перспективным субстратом для синтеза может служить сахара экстрагированные из топинамбура. Топинамбур, также известный как земляная груша (*Helianthus tuberosus*), является однолетним растением семейства Asteraceae с высокой урожайностью — до 40-70 т / га клубней. [23] Используется как питание человека, корм для животных, и производство биоэнергетических и биохимических продуктов, и это культура, которую можно выращивать в различных условиях окружающей среды. Клубни топинамбура имеют неправильную сферическую или веретенообразную форму и содержат высокие уровни инулина.

Инулин, преимущественно находящийся в клубнях, представляет собой линейный полимер фруктозы, связанный β (2,1) гликозидной связью и оканчивающийся молекулой D-глюкозы, как в сахарозе и имеет эмпирическую форму $(C_6H_{10}O_5)_n$ (рисунок 3).[24] В клетке инулин локализуется в вакуолях в виде сферокристаллов (рисунок 4). Длина цепи, состав и полидисперсность инулина зависят от вида растений, условий сбора урожая, а также процессов сушки, и эти параметры определяют его биологические и технологические свойства.[25] Инулин, извлеченный из природных источников, характеризуется степенью полимеризации (DP) от 2 до 60 единиц. Олигосахариды инулина с DP менее 10 единиц, называемые фруктоолигосахаридами (ФОС), являются одними из наиболее известных пребиотиков. Инулин и ФОС считаются функциональной пищей, которая полезна для здоровья человека за счет снижения риска некоторых заболеваний, таких как рак толстой кишки, кишечных инфекций, диабета, запоров, ожирения, и увеличения всасывания в кишечнике некоторых минералов, таких как кальций и магний, в тонком кишечнике.[26] Инулин может быть полностью гидролизован до фруктозы. Перспективными субстратами являются экстракты клубней топинамбура, так как они содержат 55-77% инулина и вегетативной части.

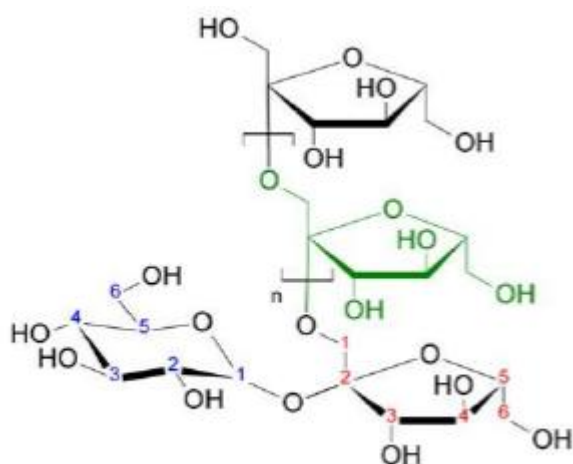


Рисунок 3-Химическая структура инулина(фрагмент).

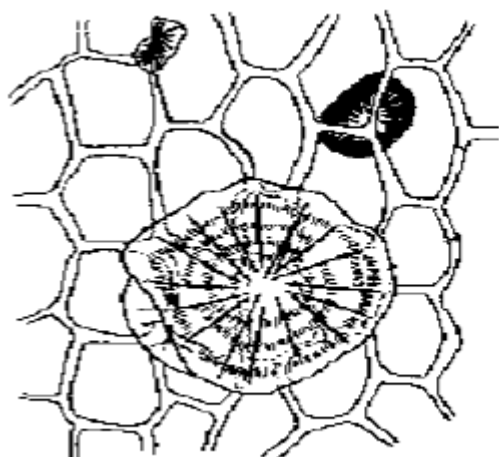


Рисунок 4-Локализация инулина в растительной клетке.

Топинамбур богат пектиновыми веществами, массовая доля которых может достигать 11 %, гемицеллюлозой, органическими кислотами, витаминами, минеральными веществами и микро-и макроэлементами. Таким образом, топинамбур является культурой многоцелевого использования с благоприятным биохимическим составом [27].

1.3.2. Гидролизаты из растительного сырья

Существует множество способов проведения гидролиза растительного сырья. Так, по виду активности применяемого катализатора различают автогидролиз, гидролиз разбавленными и концентрированными кислотами (органическими и неорганическими), солями и ферментами. В зависимости от концентрации катализатора различают гидролиз разбавленными кислотами, концентрированными кислотами, газообразными или жидкими галогеноводородами. По температурному фактору процесс гидролиз может быть при замораживании (-10°C), низкотемпературный ($25-40^{\circ}\text{C}$), при повышенной температуре ($100-180^{\circ}\text{C}$), высокотемпературный ($200-250^{\circ}\text{C}$). По способу подачи энергии и активации гидролиз может быть термический, механохимический, радиационный и каталитический. К тому же гидролиз может проходить в статистических условиях, в потоке, в режимах идеального вытеснения, перемешивания, в замкнутой или открытой, в стационарной или

нестационарной системах. По величине отношения массы абсолютно сухого сырья к массе жидкости он может быть низко- или высокомолекулярным [28].

Наиболее распространенным в промышленности является кислотный гидролиз с использованием в качестве катализатора кислот (серная, соляная, щавелевая, лимонная и др.). Ускорение процесса происходит при жестких условиях гидролиза (рН от 1 до 2 и температуре от 80 °С до 100 °С), но при этом часть фруктозы деградирует с образованием фенолов и формальдегидов. При кислотном гидролизе растительной ткани происходит сложный комплекс различных реакций [8].

Вся технология получения готовых гидролизатов сводится к следующим операциям: подготовка и обработка сырья, прессование и/или экстрагирование, гидролиз, фильтрация, нейтрализация, упаривание, розлив. Как итог получается фруктозо-глюкозный сироп без осадка, посторонних включений и помутнений. На вкус готовый гидролизат сладкий, запах практически отсутствует.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Объект исследования

В работе использовался штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* В-10646. Этот штамм зарегистрирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Штамм является одним из вариантов, выделенных из культуры *Ralstonia eutropha* В-8562 и способен синтезировать ПГА различного состава [18].

C. necator является грамотрицательной, палочковидной, факультативной хемолитоавтотрофной β -протеобактерией. Данный вид обладает широким органотрофным потенциалом и способен использовать в качестве источников углерода различные субстраты.

2.2. Культивирование бактерий

Бактериальную культуру получили методом ресуспендирования музейной культуры. Бактерий выращивали в жидкой питательной минеральной среде Шлегеля, которая содержит: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 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 готовились 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) [29]. В качестве источника углерода использовали гидролизаты топинамбура с разной концентрацией глюкозы и фруктозы.

Инкубация бактерий проходила в термостатируемом шейкере-инкубаторе Innova «New Brunswick Scientific» (США) при температуре 30°C и 200 оборотах (рисунок-5). Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5л и 1л. Время культивирования составило 48 и 72 ч.



Рисунок 5-Шейкер-инкубатор Innova 44

2.3 Анализ проб

2.3.1 Измерение оптических показателей культуры

На протяжении культивирования периодически отбирали пробы бактериальной культуры и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при разведении культуры дистиллированной водой 1:5 и длине волны $\lambda=440$ нм (фотоэлектрокалориметр «UNICO 2 100», США).

2.3.2 Определение сухой биомассы клеток

Урожай биомассы бактерий в культуре (X г/л) определяли весовым методом. Для этого 15мл бактериальной суспензии центрифугировали 5 мин при 6000 об/мин. После чего промывали осадок дистиллированной водой. Данную процедуру выполняли дважды. Полученный промытый осадок переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы с биомассой сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение 24 часов. После этого бюксы охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Вес биомассы бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

2.3.3 Определение количества клеток

Для контроля роста культуры использовали метод прямого подсчета в камере Горяева, поскольку измерение оптической плотности было затруднено из-за темного цвета раствора.

Для определения количества клеток использовали метод прямого подсчета в камере Горяева. Счетная камера Горяева представляет собой специальное предметное стекло, в центральной части которого имеется углубление, глубина которого во всех своих частях одинакова. На дне этого углубления выгравирована сетка, разделенная на квадраты определенной площади.

Покровное стекло тщательно притирали. Бактериальную суспензию окрашивали, после чего небольшую каплю наносили на площадку камеры Горяева. Количество клеток в 1 мл суспензии рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{A \times 10^3}{h \times S} n \quad (1)$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии;

A – среднее число клеток в 1 квадрате сетки;

h – высота камеры, мм;

S – площадь 1 квадрата сетки, мм;

10^3 – коэффициент перевода кубических сантиметров в кубические миллиметры;

n – разведение исследуемой суспензии [30].

В результате был построен график для перехода от количества клеток к массовым единицам измерения (рисунок 6).

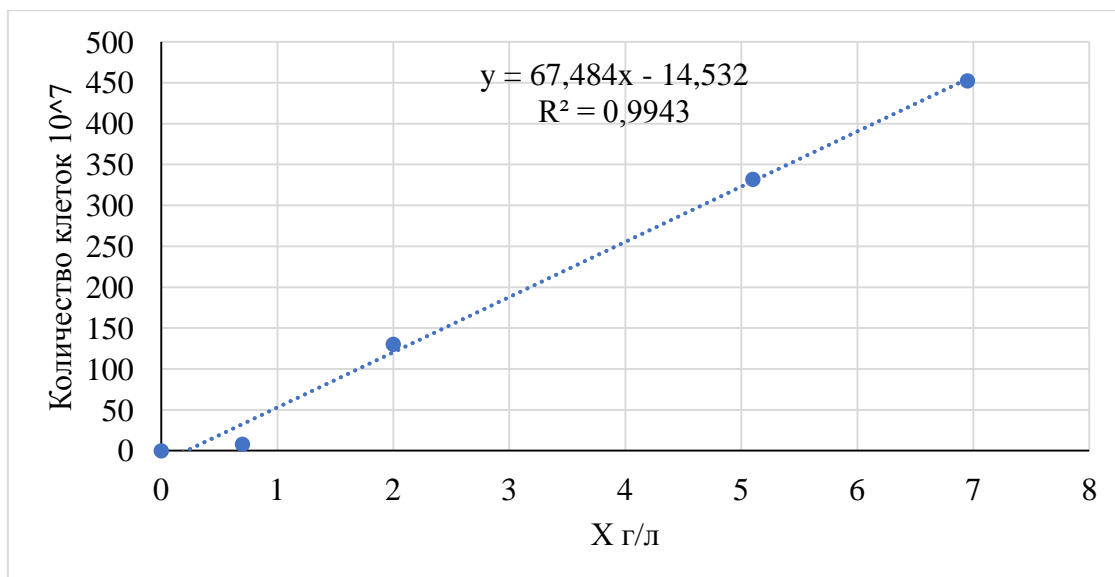


Рисунок 6 – Калибровочный график для перехода от количества клеток к биомассе.

График показывает линейную зависимость, вероятность аппроксимации составила 0,9943.

2.3.4 Определение концентрации фруктозы

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом [31]. Для проведения анализа отбирали 2 мл культуральной жидкости, центрифугировали и супернатант разводили в 50 раз. Далее к 1 мл приготовленной пробы добавляли 1 мл спиртового резорцина (100 мг резорцина разводили в 100 мл 95%-ного этилового спирта) и 3 мл раствора соляная кислота: дистиллированная вода (5:1). Для приготовления контроля вместо разведенного супернатанта использовали дистиллированную воду. Пробирки с контролем и пробой помещали в водяную баню ($t=80^{\circ}\text{C}$) и выдерживали 20 минут. По истечению времени пробирки охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре UNICO 2100 в кюветах с длиной оптического пути 5 мм при длине волны 540 нм. Концентрацию фруктозы рассчитали по калибровочному графику (рисунок 7).

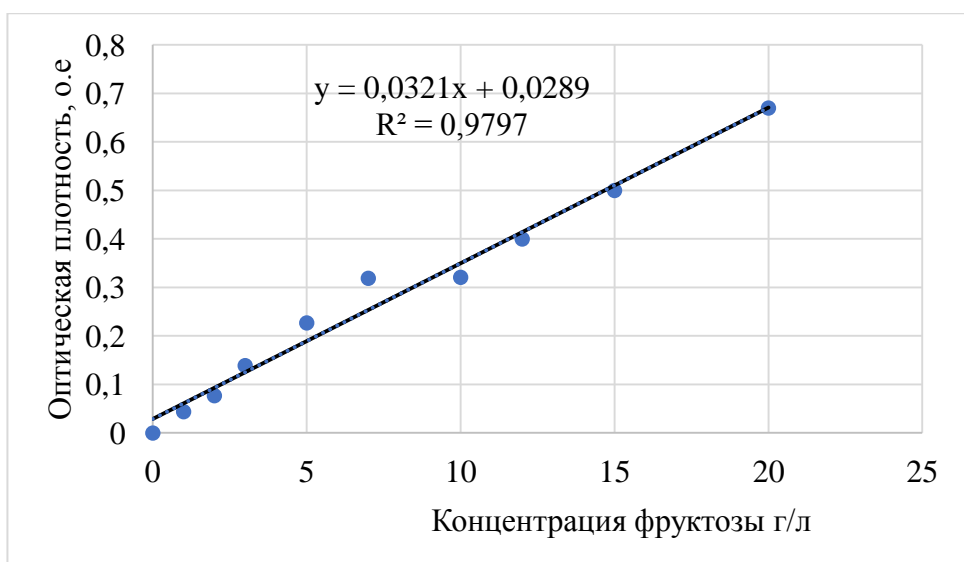


Рисунок 7 – Калибровочный график для определения концентрации фруктозы.

2.3.5 Определение концентрации глюкозы

Для определения концентрации глюкозы применяли набора «Глюкоза-ФКД» В комплект набора входит:

- таблетка с ферментно–хромогенной смесью (ФХС);
- калибратор (раствор глюкозы с известной концентрацией).

Таблетку ФХС растворяли в 100 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивая.

Для измерения отбирали 2 мл культуральной жидкости и центрифугировали в течение 2 мин. При 6000 об/мин. Далее 1 мл фугата разбавили дистиллированной водой в соотношении 1:4.

В три пробирки налили по 2 мл ФХС. В качестве контрольной пробы в первую пробирку добавили 40 мкл дист. воды. Во вторую пробирку добавили 40 мкл калибратора (калибровочная проба). В третью пробирку добавили 40 мкл разведенной жидкости (опытная проба). Выдерживали пробы в течение 25 минут при комнатной температуре. По истечению времени проводили измерения оптической плотности в полученных растворах и определяли концентрацию глюкозы по формуле:

$$K = \frac{ОП_о}{ОП_к} \times 9, \quad (2)$$

где:

ОП_о - оптическая плотность опытной пробы, о.е.;

ОП_к - оптическая плотность калибровочной пробы, о.е.;

9 – концентрация глюкозы в калибраторе, г/л. [32]

2.4 Расчет кинетических параметров роста культуры

Удельную скорость роста культуры (μ , ч⁻¹) определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{x_k}{x_n}\right)}{\Delta t}, \quad (3)$$

где:

x_n -начальная концентрация бактерий, г/л;

x_k - конечная концентрация бактерий, г/л;

Удельную скорость синтеза полимера (μ_β , ч⁻¹) рассчитывали из уравнения:

$$\mu_\beta = \ln\left(\frac{ПГА_k}{ПГА_n}\right) / \Delta t, \quad (4)$$

где:

ПГА_н, ПГА_к – начальная и конечная концентрация полимера в клетках, кг/м³.

Экономический коэффициент имеет четкий физический смысл и позволяет оценить эффективность используемого субстрата для получения целевого продукта. Эта важная характеристика культивирования связана с продуктивностью процесса и определяет себестоимость продукта. Экономический коэффициент культуры по продукту Y (г/г) рассчитывали по формуле:

$$Y = \frac{x_k - x_n}{S_k - S_n}, \quad (5)$$

где:

x_n - начальная концентрация бактерий, г/л;

x_k - конечная концентрация бактерий, г/л;

S_n - начальное содержание используемого субстрата, г/л;

S_k - конечное содержание используемого субстрата, г/л.

2.5 Определение процентного содержания полимера в клетках.

Для определения внутриклеточной концентрации и состава ПГА использовали хроматографию метиловых эфиров жирных кислот после предварительной этерификации образцов на газовом хроматографе Agilent Technologies 7820A. Эфиры жирных кислот получали следующим образом: к навеске образцов (навеска 3-4 мг) добавляли 0,85 мл метанола, 1 мл хлороформа и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Выдерживали на водяной бане с обратным холодильником в течение 3 часов. По окончании этерификации в колбу добавляли по 2 мл дистиллированной воды. Полученные пробы хроматографировали на хромато-масс-спектрометре.

2.6 Выделение полимера.

Исходный образец биомассы экстрагируют этанолом при 70°C, 250 об/мин в течение часа. При обработке этанолом происходит обезвоживание клетки и разрушение бислойной клеточной мембраны. Происходит агрегация липидов внутри нее и накопление воды, что приводит к снижению барьерных функций мембраны. Также происходит ослабление жесткости и структурной организации клетки, она становится менее вязкой и более текучей. В целом, экстракция этанолом позволяет повысить чистоту полимера, а также обеспечить максимальное высвобождение полимерных молекул при экстракции дихлорметаном.

После чего биомассу фильтруют от экстракта (этанол). Экстракт (этанол) отправляется в собирательную ёмкость и экстрагируется дихлорметаном при 40°C, 250 оборотах в минуту в течение суток. После полученный экстракт

(ДХМ) фильтруется. Жидкая фракция экстракта заканчивается в осадитель. Затем в осадительной ёмкости к полученному экстракту добавляется этанол из расчета 2 части этанола на одну часть экстракта. Полученная смесь фильтруется.

После фильтрации полимер вместе с фильтром отправляется на сушку при комнатной температуре в течение суток.

2.7 Физико-химические свойства ПГА

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия). Значение средней числовой молекулярной массы рассчитывали по формуле:

$$M_n = \Sigma(N_i \times \frac{M_i}{N}), (6)$$

где:

N_i – количество молекул массы I ;

N – общее количество молекул;

M_i – масса молекул длины I .

Вес средней молекулярной массы определяли по формуле:

$$M_w = \Sigma(w_i \times M_i), (7)$$

где:

w_i – доля массы ($w_i = N_i \times M_i / \Sigma(N_i \times M_i)$).

Полидисперсность, позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментов с различными размерами молекул, вычисляли из соотношения:

$$PD = M_w / M_n, (8)$$

где:

M_w – средневесовая молекулярная масса (г/моль);

M_n – среднечисловая молекулярная масса (г/моль).

Термический анализ биополимеров исследовали методом дифференциально-сканирующей калориметрии DSC-1 «Mettler Toledo» (Швейцария). Образцы ПГА навеской 4 мг помещали в алюминиевые тигли,

нагревали со скоростью 5 °С/мин до 200°С, затем охлаждали до -20°С и повторно нагревали до 320°С. По пикам на термограммах с помощью программного обеспечения «StarE» определяли температуру плавления, температуру термической деградации и кристаллизации.

Рентгеновские эксперименты для определения степени кристалличности образцов выполнены на дифрактометре «D8 ADVANCE» («Bruker AXS», Германия) с линейным детектором «VANTEC».

2.8 Метод наработки опытной партии гидролизата.

Гидролизаты получали двумя способами (рисунок 8).

Первый способ заключался в использовании последовательной двухфазной схемы: проведение водной экстракции при 80°С в течение 24 часов, после чего фильтровали и нерастворимый остаток (шлам) промывали еще раз, затем полученный экстракт подвергали кислотному гидролизу при 60°С.

Второй способ заключался в одновременном проведении экстракции и гидролиза сахаров в слабокислой среде при 80°С [23].

Чистые клубни размалывали в мясорубке, таким образом получили пасту с 74 % влажности. По первому способу брали навеску из 100г измельченных клубней, заливали водой в соотношении 1:7 и настаивали в течение 24 часов при 80°С. Полученный экстракт фильтровали и добавляли серную кислоту. Далее проводили гидролиз олигосахаридов экстракта при 60°С в течение 24 часов.

По второй схеме использовали 100г измельченных клубней топинамбура заливали водой в соотношении 1:7, добавляли серную кислоту и выдерживали при 80°С 24 часа. Далее полученный гидролизат отфильтровывали через бумажный фильтр. Кислотные гидролизаты нейтрализовали 0,5Н КОН до pH = 6,5–7 и упаривали для повышения концентрации сахаров.

При подготовке гидролизатов из вегетативной части топинамбура, включающей в себя листья и стебли брали навеску 50 г и готовили по той же схеме, что и клубни.

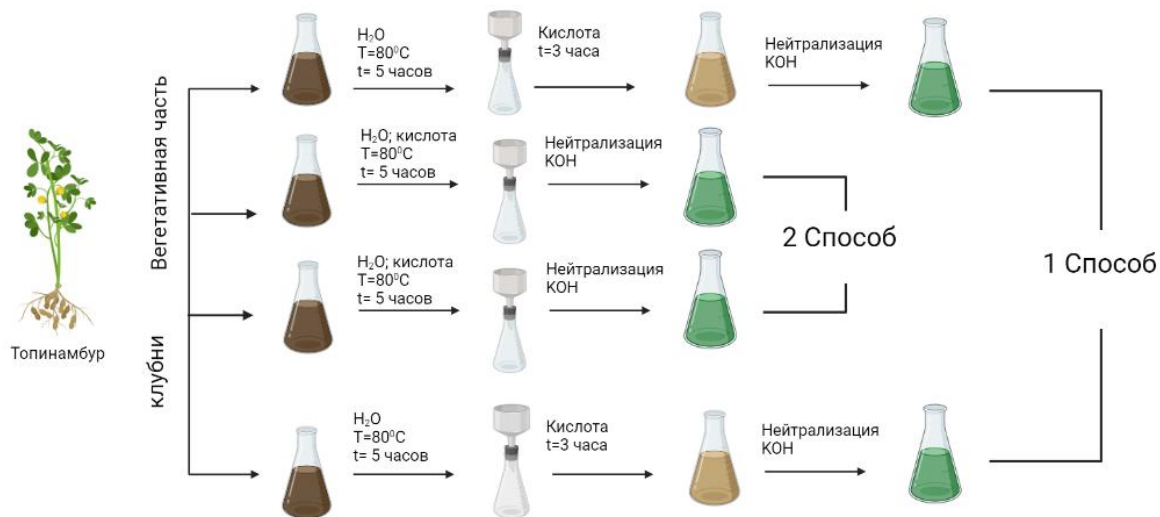


Рисунок 8 – Схема получения гидролизатов из клубней и вегетативной части топинамбура.

3 Результаты

Изъяты страницы 26-35 в связи с авторскими правами

ВЫВОДЫ

1. Путем экстракции и гидролиза получены гидролизаты из клубней и вегетативной части топинамбура. Исследование составов, полученных С-субстратов показало высокое содержание глюкозы с фруктозой и незначительное содержание галактозы. Гидролизаты из клубней топинамбура в основном содержали фруктозу (45-58% от РВ), а гидролизаты из вегетативной части – глюкозу (34-44% от РВ).

2. Проведено исследование продукционных характеристик бактерий штамма *Cupriavidus necator* В-10646 на различных гидролизатах топинамбура и сравнение с культивированием на глюкозе и фруктозе. Установлено, что показатели, полученные при использовании гидролизатов из топинамбура сопоставимы с показателями культивирования на чистых сахарах. Максимальное производство биомассы было достигнуто при синтезе на гидролизате клубней, полученном экстракцией с последующим гидролизом, и составило 7 г/л при содержании ПГА 70%. Удельная скорость роста в процессе культивирования составила $0,07 \text{ ч}^{-1}$, экономический коэффициент – 0,3 г биомассы/г субстрата.

3. Исследованы физико-химические свойства полученных образцов ПГА, синтезированных на различных С-субстратах. Результаты показали, что значение M_w и M_n ниже по сравнению со значениями, полученными при синтезе на глюкозе и фруктозе. Проведен анализ термических свойств образцов полученных при культивировании на гидролизатах топинамбура $T_{пл} = 176-178$, $T_{дегр} = 293-296$. Полученные температурные характеристики ПГА сопоставимы с результатами культивирования *Cupriavidus necator* В-10646 на глюкозе и фруктозе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boey, J.Y.; Mohamad, L.; Khok, Y.S.; Tay, G.S.; Baidurah, S. A review of the applications and biodegradation of polyhydroxyalkanoates and poly(lactic acid) and its composites. *Polymers* 2021, 13, 1544
2. Ларионов В. Г. Саморазлагающиеся полимерные материалы // *Полимеры для пищевой промышленности*. 1993, № 4. С. 36-39.
3. Carvalheira M. et al. Polyhydroxyalkanoates from industrial cheese whey: production and characterization of polymers with differing hydroxyvalerate content // *Current Research in Biotechnology*. – 2022.
4. Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? / J.Możejko-Ciesielska, R.Kiewisz // *Microbiological research*. – 2016. – R. 192. – q. 271-282.
5. Yu, J. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources / J. Yu. - 2007. - p. 585-610.
6. Koller, M. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials / M. Koller, A. Atlic, M. Dias // *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. - 2010. - № 1. - p. 85-119.
7. Биомедицинский потенциал разрушаемых полигидроксиалканоатов: экспериментально-клинические исследования/Т.Г. Волова, Ю.С. Винник, Е.И. Шишацкая, Н.М. Маркелова. - Красноярск:Версо,2014.-332 с.
8. Емелина Т. Н. Комплексная переработка вегетативной части топинамбура с получением продуктов микробного синтеза : дис. – Сибирский государственный технологический университет, 2003
9. Palmeiro-Sánchez T., O’Flaherty V., Lens P. N. L. Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future // *Journal of Biotechnology*. – 2022. – Т. 348. – С. 10-25
10. Volova T. G. et al. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates from CO₂ and H₂ of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646 // *Bioresource technology*. – 2013. – Т. 146. – С. 215-222.

11. Sharma V., Sehgal R., Gupta R. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and modifications //Polymer. – 2021. – Т. 212. – С. 123161.
12. Волова, Т.Г. Полиоксиданканоаты (ПГА) – Биоразрушаемые полимеры для медицины: монография / Т.Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая. - Новосибирск: Издательство СО РАН, 2003. – 330 с.
13. Tan G. Y. A. et al. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review //Polymers. – 2014. – Т. 6. – №. 3. – С. 706-754.
14. Kung S., Chuang Y., Chen C., Chien C. Letters in Applied Microbiology// 2007. №4. – С. 364.
15. Aslan A. K. H. N. et al. Polyhydroxyalkanoates production from waste biomass //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2016. – Т. 36. – №. 1. – С. 012040.
16. Techno-economic evaluation and life-cycle assessment of poly(3-hydroxybutyrate) production within a biorefinery concept using sunflower-based biodiesel industry by-products
17. Киселев Е. Г., Шишацкий О. Н., Дж С. Э. Техничко-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов //Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2012. – Т. 5. – №. 3. – С. 300-310.
18. Obruca S. et al. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds //Process biochemistry. – 2014. – Т. 49. – №. 9. – С. 1409-1414.
19. Muhammad M. et al. Production of polyhydroxyalkanoates and carotenoids through cultivation of different bacterial strains using brown algae hydrolysate as a carbon source //Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2020. – Т. 30. – С. 101852.
20. Li J. et al. Efficient and economical production of polyhydroxyalkanoate from sustainable rubber wood hydrolysate and xylose as co-substrate by mixed microbial cultures //Bioresource Technology. – 2022. – С. 127238.

21. Kulkarni, S.O.; Kanekar, P.P.; Jog, J.P.; Sarnaik, S.S.; Nilegaonkar, S.S. Production of copolymer, poly(hydroxybutyrate-co- hydroxyvalerate) by *Halomonas campisalis* MCM B-1027 using agro-wastes. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015, 72, 784–789.
22. Saratale, G.D.; Saratale, R.G.; Varjani, S.; Cho, S.K.; Ghodake, G.S.; Kadam, A.; Mulla, S.I.; Bharagava, R.N.; Kim, D.S.; Shin, H.S. Development of ultrasound aided chemical pretreatment methods to enrich saccharification of wheat waste biomass for polyhydroxybutyrate production and its characterization. *Ind. Crops Prod.* 2020, 150, 112425
23. Volova T. G. et al. Production and Properties of Microbial Polyhydroxyalkanoates Synthesized from Hydrolysates of Jerusalem Artichoke Tubers and Vegetative Biomass // *Polymers*. – 2021. – Т. 14. – №. 1. – С. 132.
24. Rubel I. A. et al. Inulin rich carbohydrates extraction from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers and application of different drying methods // *Food Research International*. – 2018. – Т. 103. – С. 226-233.
25. Alabadi A. M. D., Abood S. C. MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF INULIN FROM JERUSALEM ARTICHOKE AND PARTIAL ACID HYDROLYSES // *The Iraqi Journal of Agricultural Science*. – 2020. – Т. 51. – №. 1. – С. 401-410.
26. Назаренко М. Н. Совершенствование технологий получения инулина и фруктозо-глюкозного сиропа из топинамбура и их применения в производстве функциональных молочных продуктов // *Элек. сб. матер. I межд. науч.-практич. конф., посвященной 30-летию кафедры технологии и организации питания*. – 2014. – С. 278
27. Холькин Ю.Н. *Технология гидролизных производств*. - М.: Лесн. пром-сть, 1989.-496 с.
28. Киселев Е. Г., Васильев А. Д., Волова Т. Г. Синтез и характеристики многокомпонентных ПГА // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. – 2021. – Т. 14. – №. 1. – С. 97-113.

29. Park, S. J. Metabolic Engineering of *Ralstonia eutropha* for the Production of Polyhydroxyalkanoates From Sucrose / S. J. Park, Y. A. Jang, W. Noh // *Biotechnology and bioengineering*. - 2015. - № 3. - p. 38-43.
30. Прунтова О. В., Сахно О. Н. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – 2005.
31. Ермаков А. И. и др. Методы биохимического исследования растений //Л.: Агропромиздат. – 1987. – Т. 143.
32. Комарова, В.И. Простой метод количественного определения глюкозы в плодах и напитках / В.И. Комарова, С.М. Тырина // РЖ 19Р-1. Химия и технология пищевых продуктов, раздел рубрикатора 7. контроль качества и безопасности продукции АПК, Москва: ООО «НТИ-КОМПАКТ». -2005. - Т. 23.


Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

«24» июня 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез полигидроксиалканоатов с использованием гидролизатов
топинамбура в качестве С-субстрата

Руководитель



подпись, дата

доц. к.т.н

должность, ученая степень

Е.Г.Киселёв

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

А.А.Будник

инициалы, фамилия

Красноярск 2022