

Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары – 17: «Қазіргі аграрлық ғылым: цифрлық трансформация» атты халықаралық ғылыми – тәжірибелік конференцияға материалдар = Материалы международной научно – теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 17: «Современная аграрная наука: цифровая трансформация», посвященной 30 – летию Независимости Республики Казахстан.- 2021.- Т.1, Ч.1 - С.378-380

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРАТА (ПГБ) ПРИ ОБЛУЧЕНИИ УЛЬТРАФИОЛЕТОМ

*Рысбек А.Б. PhD докторант,
Курманбаев А.А. заведующий лабораторией экологической
биотехнологии.*

*¹Евразийский Национальный Университет им. Л.Н. Гумилева, г. Нур-
Султан.*

^{1,2}РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии» г. Нур-Султан.

Актуальным направлением в современной биотехнологии, является развитие индустрии экологически чистых биоразлагаемых пластиков. Такая востребованность связана с колоссальными загрязнениями окружающей среды в мировом масштабе отходами синтетических пластиков.

Основными драйверами роста потребления биоразлагаемых пластиков являются законодательные запреты в ряде стран по использованию обычных пластиков в упаковке и спрос со стороны развивающихся высокотехнологичных производств (медицина, косметология и др.).

Одним из перспективных биопластиков является поли-3-гидроксибутират (ПГБ). Эти сложные полиэфиры включают повторяющиеся гидроксиацильные мономеры общей формулы: $[-O-CH(R)-CH_2-CO-]_n$, где $R = CH_3$, и имеют важное коммерческое значение благодаря его биоразлагаемости и термопластичным свойствам [1]. Полигидроксибутираты по ряду физико-химических свойств имеют схожие характеристики с широко применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах неразрушающимися в природной среде синтетическими полимерами (полипропиленом, полиэтиленом). Помимо термопластичности, полигидроксиалканоаты обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, они характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью. Полигидроксибутират называют биоматериалом будущего, представляет собой натуральный и экологически чистый полимер, полученный из более чем 300 различных видов микроорганизмов. Бактерии способны накапливать полиэфиры на относительно недорогих субстратах (ацетат, глицерин, меласса, метанол, глюкоза, сахароза, этанол) при постоянном ограничении

некоторых минеральных элементов питания таких как азот, фосфора также кислород [2].

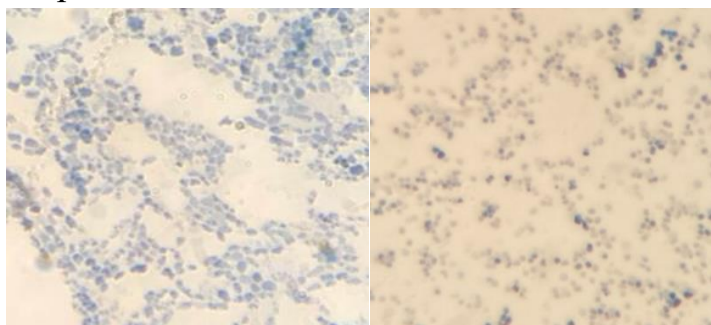
Целью нашего исследования было выделение и получение эффективного продуцента ПГБ.

Из региональных каштановых почв было выделено 10 штаммов продуцентов ПГБ, из которых были отобраны 3 эффективных продуцента.

Бактериальная клетка использует ПГБ как протекторную систему при различных стрессовых ситуациях, поэтому мы решили создать стрессовую ситуацию облучением клеток ультрафиолетовым излучением (УФ) [3,4]. Штаммы бактерий культивировали в модифицированной минеральной среде Law and Slepescu и в среде Берка для азотфиксирующей бактерий [5,6]. В качестве стрессовых агентов использовали УФ-лучи (длина волны 200-400 нм), источником которых служила бактерицидная лампа (ВИО-2, Россия, «Фимет») с расстояния 10 см. Природный штамм *Bacillus megaterium* и *Azotobacter chroococcum* выращивали на минеральных средах в условиях лимитации азотом. Клетки, находящиеся в фазе активного роста, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, дважды промывали 0,1 М раствором $MgSO_4$ и суспендировали в 0,1 М $MgSO_4$ [7]. Суспензию клеток облучали УФ с расстояния 10 см, время облучения варьировало от 2 до 10 минут. Облученную и контрольную суспензии далее использовали для приготовления разведений и посева клеток.

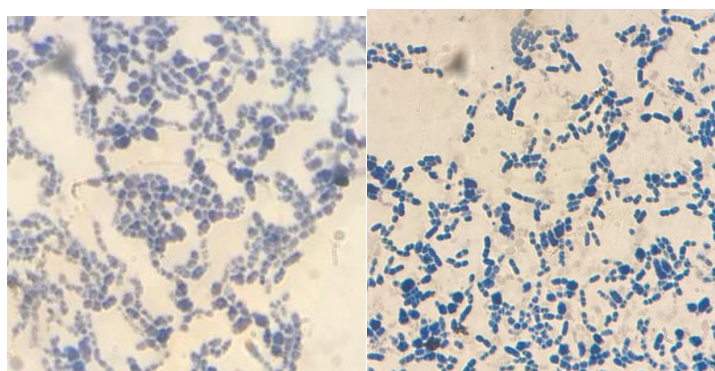
Из обработанной и контрольной суспензий готовили ряд стандартных разведений и высевали на чашки Петри. Чашки инкубировали в термостате при температуре 30°C в течение 48 ч. После этого подсчитывали количество выросших колоний. Анализировали те чашки, где процент выживаемости облученных клеток составлял менее 1%. Для скрининга накопления ПГБ бактериями, мазки окрашивали красителем Судан В и фото окрашенных клеток с микроскопа сравнивали с контрольными образцами [8].

С каждого штамма дикого типа после УФ облучения отобрали как минимум по 2 продуцента. У колоний бактерий наблюдался диморфизм морфологии: с гладкой поверхностью S-формы с ровными краями и R-формы с шероховатой поверхностью, складчатые колонии.



K1

K2



А

Б

Рисунок 1. Клетки окрашенные после облучения УФ в течение 10 минут. А – *Bacillus megaterium* RA-5 и Б – *Azotobacter chroococcum* RAz-3. К1 и К2 – контрольные образцы, без облучения.

Клетки S и R формы, как показано на рисунке 1 имели более насыщенное окрашивание Суданским черным В.

Накопление ПГБ в клетках отмечали окрашиванием липофильным красителем Суданским черным В. Инструментальными методами были подтверждены чистота полученного образца ПГБ и изучены ее физико-химические свойства. Точка плавления образца ПГБ, синтезируемого штаммом *Bacillus* составила 170°C, тогда как в контрольном образце от SigmaAldrich, Germany - 176°C, а ПГБ штамма *Azotobacter chroococcum* имел точку плавления 150°C.

Таким образом, были получены эффективные продуценты ПГБ, после облучения УФ исходных штаммов бактерий.

Список литературы

1. Page, W. J. Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future // Canadian Journal of Microbiology. – 1995. – Vol. 41, No (13). – P. 1-3.
2. Cesário M.T., Raposo R.S., de Almeida MCMD, van Keulen F., Ferreira B.S. and da Fonseca M.M.R. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates // New Biotechnology. – 2014. - Vol. 31. – P. 104-113.
3. Романов В.И. // Успехи биологической химии. - 1977. - Т. 18. - С. 211–230.
4. Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y. // Appl. Environ. Microbiol. - 2003. - V. 69. - P. 3244–3250.
5. Law J.H., Slepecky R.A. // J. Bacteriol. – 1961. - V. 82. - No 1. - P. 33–36.
6. Aslim, B., Caliskan, F., Beyatli, Y. & Gunduz, U. Poly-bhydroxybutyrate production by lactic acid bacteria // FEMS Microbiology Letters 159. - 1998, - P.293–297.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Под. ред. С.И. Алиханяна. М.: Мир. - 1976. - 436 с.

8. Legat A., C. Gruber, K. Zangger, G. Wanner and H. Stanlotter. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* -2010. Vol. 87(3). P. 1119–1127.